



Mestrado em Engenharia Ambiental

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

DISSERTAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO ISOLADAS NA RPPN DO CARAÇA, MG

AUTOR: IVAN CEZARINI PATRÍCIO

OURO PRETO, MG

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação Engenharia Ambiental
Mestrado em Engenharia Ambiental

Ivan Cezarini Patrício

**“CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE
BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO ISOLADAS NA
RPPN DO CARAÇA, MG”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título: “Mestre em Engenharia Ambiental – Área de Concentração: Saneamento Ambiental”

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Célia da Silva Lanna

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Silvana de Queiroz Silva

Ouro Preto, MG

2009

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho contou com a ajuda de várias pessoas, tanto de maneira direta quanto indiretamente, aos quais agradeço:

- Em primeiro lugar meus pais e familiares, que sempre me apoiaram para a continuidade de meus estudos e meu ingresso na universidade;
- À Prof^a. Dr^a. Maria Célia da Silva Lanna, que me proveu com a possibilidade de estagiar no Laboratório de Microbiologia do ICEB-UFOP e com os meios necessários à realização do presente trabalho;
- À Prof^a. Dr^a. Silvana de Queiroz Silva, que como minha co-orientadora deu importantes contribuições para a realização do trabalho;
- À todos os professores substitutos que, na sua passagem pela instituição, forneceram valiosas sugestões para os experimentos realizados e para outras atividades que realizei durante meu período no laboratório;
- Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, Luís e Marli, pela prontidão e ajuda que sempre prestaram;
- À todos os meus companheiros estagiários, bolsistas e mestrandos que se encontram atualmente ou mesmo já passaram pelo laboratório durante meu estágio, pela ajuda na confecção dos experimentos, realização dos trabalhos e apoio;
- Aos meus professores, pela instrução e apoio;
- Aos estudantes do Laboratório de Microscopia e Microanálise (Microlab) do Departamento de Geologia da UFOP (DEGEO), pela disponibilidade de tempo e materiais para a realização de algumas análises;
- Aos alunos e pesquisadores do DEGEO, que realizaram a coleta das amostras utilizadas neste trabalho;
- Aos meus grandes amigos da República DNA, da qual fui morador, que sempre me apoiaram de várias formas e com os quais sempre pude contar;
- Por fim, aos meus amigos e colegas de turma e alojamento, assim como aos funcionários da UFOP de diversos setores, que sempre me ofereceram a amizade e ajuda nas mais diversas dificuldades.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	08
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1	Ecologia e Caracterização dos Grupos de Bactérias Redutoras de Sulfato.....	10
2.2	Bioquímica e Fisiologia das Bactérias Redutoras de Sulfato.....	12
2.3	Classificação Taxonômica e Caracterização dos Grupos de BRS.....	15
2.4	Utilização das BRS em Biolixiviação e Biorremediação.....	18
2.5	Estudo de BRS em Biorreatores.....	19
2.6	BRS Associadas às Corrosões Metálicas.....	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1	Área de Estudo e Amostragem.....	17
3.2	Cultivo Inicial das Amostras.....	22
3.3	Isolamento das Culturas Puras de Bactérias Redutoras de Sulfato.....	23
3.4	Caracterização dos Isolados Obtidos.....	24
3.4.1	<i>Caracterização Morfológica.....</i>	<i>24</i>
3.4.2	<i>Caracterização Bioquímica.....</i>	<i>25</i>
3.5	Identificação Taxonômica dos Isolados.....	27
3.6	Métodos para Escolha de Cepas para Testes Fisiológicos.....	28
3.6.1	<i>Determinação do Tempo de Redução de Sulfato em Relação ao pH.....</i>	<i>28</i>
3.6.2	<i>Determinação do Número de Células dos Isolados após Redução de Sulfato em Diferentes Valores de pH.....</i>	<i>29</i>
3.7	Determinação das Curvas de Crescimento e Tempo de Geração dos Isolados.....	29
3.8	Quantificação do Consumo de Sulfato pelos Isolados.....	31
3.9	Quantificação da Produção de Sulfeto pelos Isolados.....	32
4	RESULTADOS.....	33
4.1	Amostras Positivas para Redução de Sulfato.....	33
4.2	Linhagens de BRS Isoladas.....	34
4.3	Caracterização Morfológica dos Isolados de BRS.....	35
4.3.1	<i>Morfologia ao Microscópio Ótico (M.O.).....</i>	<i>35</i>

4.3.2	<i>Morfologia ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)</i>	36
4.4	Caracterização Bioquímica dos Isolados de BRS.....	38
4.5	Identificação Taxonômica Presuntiva dos Isolados de BRS.....	41
4.6	Escolha de Cepas para Testes Fisiológicos.....	42
4.7	Curva de Crescimento e Tempo de Geração dos Isolados.....	42
4.8	Quantificação do Consumo de Sulfato e Produção de Sulfeto pelos Isolados...	44
5	DISCUSSÃO.....	50
6	CONCLUSÕES.....	53
7	PERSPECTIVAS.....	54
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
9	ANEXOS.....	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1: Ciclo biogeoquímico do enxofre.....	11
FIGURA 2.2: Redução assimilativa e dissimilativa do sulfato.....	13
FIGURA 2.3 A E B: Modelo de Ress.....	14
FIGURA 2.4: Árvore filogenética baseada em seqüências de RNA ribossomal descritas em bactérias redutoras de sulfato.....	17
FIGURA 3.1: Região do Rio Conceição, MG.....	21
FIGURA 4.1: Crescimento dos indivíduos em meio sólido de Postgate C após enriquecimento e espalhamento das amostras.....	33
FIGURA 4.2: Isolados de BRS das amostras R1A e R3A apresentando rendimento diferenciado na redução de sulfato.....	34
FIGURA 4.3: Isolados bacterianos ao microscópio eletrônico.....	37
FIGURA 4.4: Teste de desnitrificação de dois dos isolados.....	40
FIGURA 4.5: Curvas de crescimento dos isolados e equação de sua fase exponencial...	43
FIGURA 4.6: Valores das concentrações de sulfato e sulfeto do isolado R102A em crescimento controlado.....	45
FIGURA 4.7: Valores das concentrações de sulfato e sulfeto do isolado R106A em crescimento controlado.....	46
FIGURA 4.8: Valores das concentrações de sulfato e sulfeto do isolado R112A em crescimento controlado.....	46
FIGURA 4.9: Valores das concentrações de sulfato e sulfeto do isolado R304A em crescimento controlado.....	47
FIGURA 4.10: Valores das concentrações de sulfato e sulfeto do isolado R307A em crescimento controlado.....	47
FIGURA 4.11: Valores das concentrações de sulfato e sulfeto do isolado R313A em crescimento controlado.....	48
FIGURA A1: Curva padrão de glicose.....	60
FIGURA A2: Curva padrão de sulfato.....	60
FIGURA A3: Curva padrão de sulfeto.....	61

LISTA DE TABELAS E QUADROS

QUADRO 2.1: Diferenciação de subgrupos de 1 à 4 de bactérias dissimilativas de sulfato ou enxofre.....	16
QUADRO 3.1: Siglas usadas para identificação dos isolados de bactérias redutoras de sulfato segundo seu local de coleta e origem.....	24
QUADRO 4.1: Características das colônias das linhagens isoladas observadas em meio Postgate C.....	35
QUADRO 4.2: Características morfológicas ao M.O. das linhagens isoladas após técnica de coloração de Gram.....	36
QUADRO 4.3: Características metabólicas gerais dos isolados incubados em anaerobiose à 32 °C por 48 horas.....	38
QUADRO 4.4: Diferenciação dos isolados quanto à atividade de catalase e Desnitificação.....	39
QUADRO A1: Características dos isolados quanto à utilização de diferentes substratos como fonte de carbono. Incubação à 32 °C em anaerobiose por uma semana. Amostras R1A.....	62
QUADRO A2: Características dos isolados quanto à utilização de diferentes substratos como fonte de carbono. Incubação à 32 °C em anaerobiose por uma semana. Amostras R3A.....	63
TABELA 4.1: Número médio de UFC's entre as amostras positivas para redução de sulfato.....	12
TABELA 4.2: Valores da absorbância dos isolados de BRS ao longo do tempo em cultivo controlado.....	42
TABELA 4.3: Valores calculados para a o consumo de sulfato e produção de sulfeto para os isolados de BRS.....	44
TABELA A1: Determinação do tempo de início de redução do sulfato pelos isolados em diferentes valores de pH.....	64
TABELA A2: Determinação do tempo de redução completa de sulfato pelos isolados em diferentes valores de pH.....	65
TABELA A3: Determinação do número de células em cada isolado após redução total do sulfato nos diferentes valores de pH testados.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFS: Adenosina Fosfosulfato.

BRS: Bactérias Redutoras de Sulfato.

DEGEO: Departamento de Geologia.

FAFS: FOSFOADENOSINA FOSFOSULFATO.

Fig.: Figura/Figuras

ICEB: Instituto de Ciências Exatas e Biológicas.

MEV : Microscópio Eletrônico de Varredura.

MICROLAB: Laboratório de Microscopia e Microanálise do Departamento de Geologia.

M.O.: Microscópio ótico.

UFC's: Unidades Formadoras de Colônias.

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto.

RESUMO

O estudo sobre bactérias redutoras de sulfato (BRS) têm focado entre vários aspectos a sua identificação e a importância das mesmas na remediação de ambientes contaminados por diferentes substâncias, visto as crescentes preocupações com relação às questões do meio ambiente. O uso de microrganismos na remediação requer um conhecimento detalhado sobre a sua fisiologia e bioquímica, sendo o mesmo subsidiado por diversas pesquisas visando o aprimoramento de técnicas de isolamento e identificação das diversas características que tornam este grupo de bactérias de grande utilidade nestes processos. Além disso, muitos avanços têm ocorrido quanto à identificação das BRS sendo que muitos trabalhos têm proposto várias características tanto bioquímicas quanto morfológicas, além de se utilizarem de ferramentas moleculares, para obter uma melhor caracterização das espécies.

No presente trabalho, analisaram-se as características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e moleculares de seis espécies de BRS isoladas de duas amostras de sedimentos coletados de uma região Rio Conceição localizada na RPPN do Caraça em Minas Gerais. Os parâmetros citados permitiram pressupor a identificação taxonômica de alguns deles como pertencentes a família Firmicutes (Gêneros *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* ou aproximados) e a família Desulfobulbaceae (Gêneros *Desulfobulbus*, *Desulfacinum* ou aproximados). A investigação da fisiologia dos isolados por meio da determinação da redução de sulfato e produção de sulfeto pelos mesmos foi realizada por métodos turbidimétricos e colorimétricos.

Os resultados se mostraram muito satisfatórios, pois a capacidade de utilizar muitos compostos diferentes de carbono em seu metabolismo permite várias opções para o cultivo dos isolados. Além disso, a fisiologia de consumo de sulfato e concomitante produção de sulfeto mostra que os isolados podem ser utilizados tanto em remediar águas residuárias com grandes concentrações de sulfato quanto em processos de lixiviação, uma vez que o sulfeto produzido reage com metais de importância econômica que podem ser recuperados destas águas, processo este que também pode ser utilizado como uma forma de reduzir níveis de metais pesados das mesmas, diminuindo os poluentes do ambiente.

1 INTRODUÇÃO

Bactérias redutoras de sulfato (BRS), é uma designação usual para alguns grupos bacterianos de vida livre, no meio ambiente. Estes são organismos que utilizam formas oxidativas de enxofre, ao invés do oxigênio, comoceptor final de elétrons, tendo como produto dessa reação o gás sulfídrico (H_2S), processo esse denominado de “respiração do sulfato” ou também de redução dissimilatória do enxofre.

Atualmente, dezenas de gêneros de bactérias redutoras de sulfato são conhecidos, podendo ser distribuídos em vários grupos. As BRS apresentam algumas características específicas. Apresentam um bom desenvolvimento em uma faixa ampla de pH, podendo ser mesófilas, ou seja, a temperatura ideal de crescimento é de $20^{\circ}C$ a $40^{\circ}C$, ou termófilas crescendo a temperatura de até $70^{\circ}C$. Algumas destas são bactérias GRAM-positivas e outras são GRAM-negativas.

A literatura registra vários trabalhos subsequentes a descoberta das BRS, entretanto não se identifica continuidade nos trabalhos iniciais. Provavelmente este fato possa ser atribuído à dificuldade de isolamento e manutenção das culturas puras, pois essas são bactérias anaeróbicas e o contato com o oxigênio pode inativar ou inibir muitas enzimas ou proteínas utilizadas no processo de redução. Entretanto, mais recentemente, tem sido detectados alguns desses microrganismos com uma certa habilidade na utilização de oxigênio. Já foi comprovado a presença da enzima catalase nesses organismos, fato que justifica o possível manuseio em aerobiose.

Este grupo de bactéria é bastante difundido na natureza podendo ser encontrado tanto no ambiente aquático quanto no ambiente terrestre, mas ocorre principalmente na superfície do sedimento, onde as condições redutoras são mais favoráveis e por serem quimioheterotróficos utilizam compostos orgânicos de baixo peso molecular, tais como: lactose, acetato e propionato, além do H_2 , como doadores de elétrons e fonte de energia para o seu crescimento. Os compostos de enxofre mais utilizados como aceptores finais de elétrons pelas BRS, são sulfitos (SO_3^{2-}), tiosulfatos ($S_2O_3^{2-}$) e sulfato (SO_4^{2-}). Entretanto, a redução do sulfato (SO_4^{2-}), forma mais oxidativa do enxofre, é a mais difundida devido à abundância do mesmo no ambiente.

Outro aspecto relevante com relação à redução dissimilatória do sulfato, é importância geológica dessas bactérias, visto liberam gás sulfídrico H_2S durante o seu metabolismo, e este pode reagir com metais presente no ambiente levando a formação de

sulfetos metálicos. Evidências dessa atuação podem ser remetidas à participação das BRS na formação de depósito de Pirita (FeS_2). O conhecimento desse processo permitiu investigar o uso dessas bactérias em processos de remediação de metais pesados no ambiente.

O sucesso de um programa de estudo sobre a caracterização de determinado microrganismo para uma futura aplicabilidade dependerá em parte de um bom planejamento inicial sobre isolamento. O isolamento permite estudar com mais detalhes as vias metabólicas, enzimas, produtos intermediários dentre outros.

Com a crescente preocupação com relação às questões ambientais, a investigação científica das BRS tornou-se relevante. As BRS são importantes no ciclo do carbono e do enxofre, em condições anaeróbicas. Com isso, muitos estudos sobre a sua dinâmica biogeoquímica, problemas-chaves de filogenia e relação evolutiva, fisiologia celular, ecologia microbiana e aplicabilidade industrial vem sendo realizados.

O presente projeto é oportuno, considerando a possível variabilidade desse grupo de microrganismos na região, inserida no quadrilátero ferrífero e engloba os seguintes objetivos:

1. Isolar bactérias redutoras de sulfato de amostras de corpos d'água e sedimentos;
2. Avaliar o poder de redução de sulfato dos isolados por meio da sua capacidade em precipitar ferro (Fe) em presença do ácido sulfídrico (H_2S) produzido;
3. Caracterizar e identificar os isolados, levando em consideração seus aspectos morfológicos e metabólicos;
4. Investigar possíveis adaptações fisiológicas ao ambiente, assim como a produção de alguns tipos de metabólitos;
5. Identificar os possíveis gêneros taxonômicos dos isolados segundo resultados dos testes supracitados;
6. Determinar as curvas de crescimento dos isolados e seu tempo de geração, podendo inferir sobre sua velocidade de crescimento;
7. Determinar, por meio da investigação da fisiologia dos isolados, a capacidade dos mesmos em reduzir o sulfato e, conseqüentemente, produzir o sulfeto;
8. Identificar os isolados de maior rendimento na redução de sulfato e que, por esta característica, podem ser empregados em processos industriais diversos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ecologia e Caracterização dos Grupos de Bactérias Redutoras de Sulfato

No mundo dos procariotos existem diversos organismos que são capazes de realizar vários tipos diferentes de metabolismos, sendo que entre eles existem os que possuem a capacidade única de viverem em ambientes totalmente isentos de oxigênio; realizando assim reações bioquímicas que conservam energia por meio da redução dos mais diferentes tipos de compostos que agem como aceptores finais de elétrons, entre os quais se podem citar o nitrato, manganês, ferro, enxofre (em diferentes formas), dióxido de carbono, bem como formas oxidadas de compostos naturalmente menos abundantes como o arsenato, cromato, selenato e urânio (RABUS et al., 2006).

Entre estes organismos existe um grupo de grande interesse, as Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), que se apresentam na forma de células esféricas, ovóides, bastonetes ou vibrióides, com diâmetro em torno de 0,3 a 0,4 μm , ocorrendo sozinhas, em pares ou, algumas vezes, em agregados; são imóveis ou móveis com flagelos polares ou peritríquios; vivendo principalmente em ambientes anóxicos aquáticos e sedimentos (HOLT et al., 1994), e perfazem o único grupo de organismos procariotos com a habilidade comum de conservar energia por meio da redução dissimilativa de sulfato (SO_4^{2-}) para gás sulfídrico (H_2S) (LLOYD et al., 2000).

Por redução dissimilativa de sulfato entende-se a utilização conjunta da oxidação de compostos orgânicos ou hidrogênio molecular (H_2) com a redução de sulfato como um acceptor externo de elétrons sobre condições anaeróbicas (TEBO e OBRAZTSOVA, 1998); tal processo se diferencia em muito da redução assimilativa de sulfato, onde o mesmo é convertido a enxofre molecular na forma de aminoácidos e segue por diferentes vias bioquímicas (MADIGAN et al., 2009). Observa-se assim que este grupo de bactérias é importante não apenas pelo seu óbvio papel no ciclo biogeoquímico do enxofre (Figura 2.1), como também pela produção do gás sulfídrico que não só é conhecido pela sua toxicidade e cheiro característico, como também pela sua alta reatividade que causa um grande impacto na química do ambiente (RABUS et al., 2006).

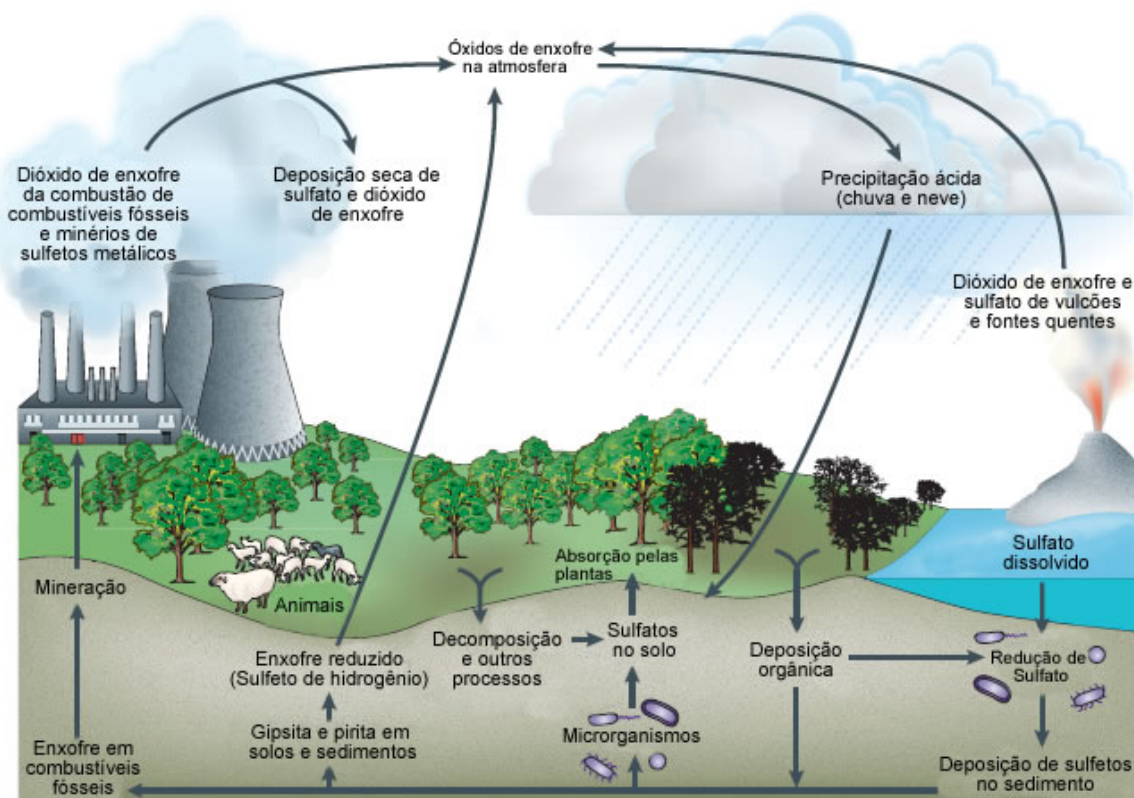


Figura 2.1: Ciclo biogeoquímico do enxofre. Adaptado de Muyzer e Stams (2008).

Deve-se citar que, embora as BRS sejam consideradas amplamente distribuídas em grandes profundidades; uma vez que a grande maioria de suas espécies tenham sido identificadas principalmente em ambientes considerados anóxicos como minas profundas de ouro da África do Sul e aquíferos basálticos profundos em Washington, EUA (BAKER et al., 2003), além de poços petrolíferos do Golfo do México (MIRANDA-TELLO et al., 2004); muitos pesquisadores a exemplo de Wieringa et al. (2000) evidenciam as cada vez mais freqüentes descobertas de BRS com capacidade de sobreviver em condições óxicas, sendo relatada a presença de enzimas de proteção à metabolismos de redução de oxigênio como, por exemplo, a catalase e a superóxido desmutase. Além disso, Lemos et al. (2001) demonstraram a presença de metabolismo oxidativo em um exemplar de BRS, a espécie *Desulfovibrio gigas*, cujo gênero, a exemplo do gênero *Desulfomicrobium*, é amplamente relatado como capaz de sobreviver ao oxigênio, tendo espécies identificadas em condições oligotróficas (BADE et al., 2000 e SASS et al., 1997).

Assim, vários estudos recentes mostram que este grupo de microrganismos pode ser identificado em diversos ambientes como, por exemplo, na rizosfera de algumas plantas (CIFUENTES et al., 2003); em solos diversos (MILETTO et al., 2007), bem como em solos úmidos usados para o cultivo de arroz (LIU et al., 2009) onde os seus representantes

Gram-positivos já foram identificados como de grande importância nos processos biogeoquímicos destes locais (STUBNER e MEUSER, 2000); em sedimentos marinhos (ISHII et al., 2004), de estuários (DEVEREUX et al., 1996), e de lagos de água doce e salgada (PEDUZZI et al., 2003 e LI et al., 1999); no trato gastrointestinal de humanos e animais (DETHLEFSEN et al., 2006 e LIN et al., 1997), e até mesmo associadas à doenças periodontais em humanos (LANGENDIJK et al., 2000), sendo estes dois últimos aspectos melhor discutidos posteriormente, bem como a identificação de exemplares deste grupo em áreas com contaminantes diversos.

2.2 Bioquímica e Fisiologia das Bactérias Redutoras de Sulfato

Segundo Rabus et al. (2006) existem cinco importantes aspectos referentes ao metabolismo das BRS que são explorados na maioria dos estudos realizados atualmente:

1. O metabolismo de sulfato a sulfeto que é bioquimicamente mais complicado do que a redução do oxigênio pelas bactérias aeróbicas;
2. A ampla variedade de compostos orgânicos que podem ser utilizados pelas BRS;
3. O fluxo que ocorre entre doadores e aceptores de elétrons associado à cadeia respiratória e que envolve uma grande quantidade de carreadores;
4. A capacidade de alguns grupos de síntese celular utilizando CO₂ durante seu crescimento na presença de H₂ e sulfato;
5. A sua regulação metabólica, que é seu aspecto menos explorado.

Quanto ao metabolismo as BRS são um grupo formado essencialmente por bactérias quimiolitotróficas organotróficas, embora os representantes de alguns gêneros como *Desulfosarcina*, *Desulfonema*, *Desulfococcus*, *Desulfobacterium*, *Desulfotomaculum* e algumas espécies de *Desulfovibrio* apresentem a capacidade de crescer com metabolismo quimiolitotrófico autotrófico, utilizando H₂ como doador de elétrons e CO₂ como fonte de carbono (MADIGAN et al., 2009). Porém, embora ocorram tipos diferentes de metabolismo em algumas espécies, todas as BRS possuem a capacidade de utilizar o sulfato como seuceptor final de elétrons, sendo a rota bioquímica por elas utilizada hoje muito bem conhecida ocorrendo a participação na mesma de diversas enzimas específicas (Figura 2.2). As taxas de crescimento das BRS sugerem que para cada sulfato reduzido há

a formação de uma molécula de ATP (MADIGAN et al., 2009), além disso, diferente de algumas espécies de bactérias redutoras de nitrato, as BRS usualmente não excretam intermediários de seu metabolismo, liberando assim apenas o produto final do mesmo, o ácido sulfídrico (RABUS et al., 2006).

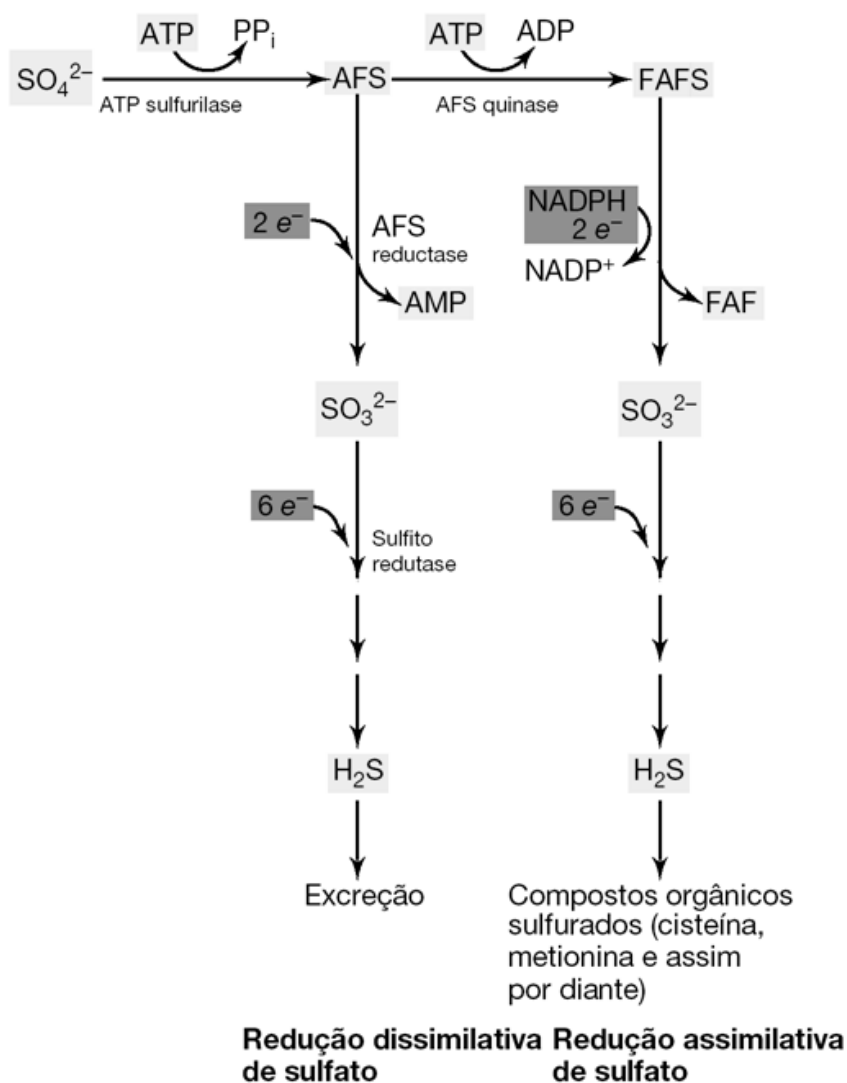


Figura 2.2: Redução assimilativa e dissimilativa do sulfato. Adaptado de Madigan et al., 2009.
AFS: Adenosina Fosfosulfato.
FAFS: Fosfoadenosina fosfosulfato.

A rota demonstrada na figura 2.2 é baseada no modelo proposto por Ress publicado em 1973, sendo que, mais recentemente Brunner e Bernasconi (2005) propuseram, em um trabalho de revisão, adições ao mesmo levando em conta observações de diversos pesquisadores. Assim, segundo a revisão do modelo de Ress proposta por ambos (Figura 2.3 A e B), a redução do sulfito para a formação do gás sulfídrico possui diversos passos

com a formação de vários compostos intermediários como, por exemplo, o tiosulfato, trithionato e o bisulfito, além disso, pode ser observado um fluxo inverso para algumas dessas reações.

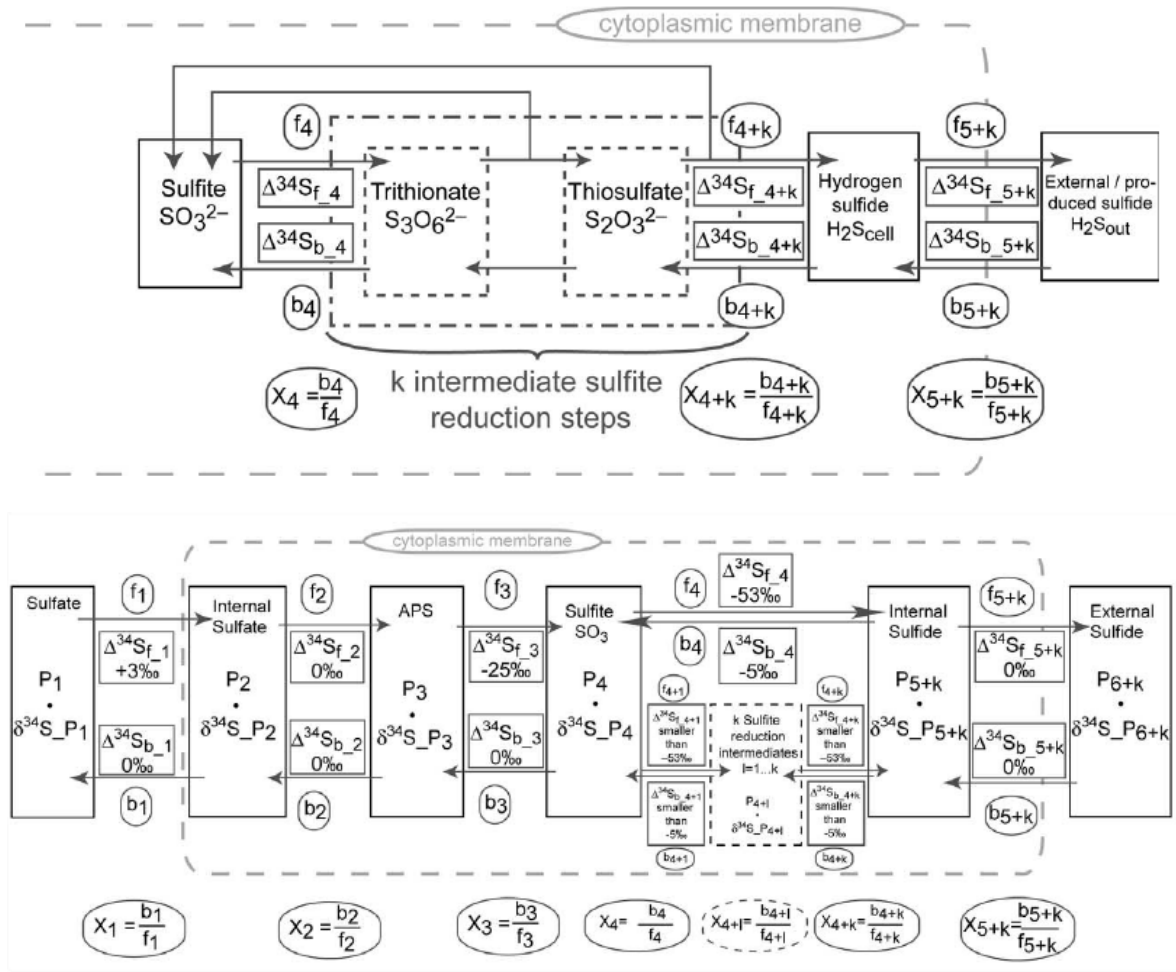


Figura 2.3 A e B: Modelo de Ress revisado segundo Brunner e Bernasconi (2005).

O metabolismo de redução de sulfato apresenta uma enorme variedade de possíveis compostos que podem vir a ser utilizados pelas BRS como aceptores finais de elétrons, sendo que, Madigan et al. (2009) e Rabus et al. (2006), evidenciam, além do sulfato, o enxofre orgânico, sulfeto, enxofre elementar, tiosulfato, sulfeto, sulfonatos, dimetilsulfoxido, nitrato (desnitrificação), nitrito, arsenato, oxigênio, fumarato, acrilato, urânio entre outros. Além disso, os autores ressaltam que compostos como o gás hidrogênio, lactato, etanol, acetaldeído, acetona, açúcares, glicolato, malato, fumarato, succinato, aminoácidos, compostos aromáticos polares, hidrocarbonetos aromaticos, hidrocarbonetos saturados, metano, acetato, propionato, formato, butirato e ácidos graxos diversos entre outros já foram identificados como doadores de elétrons, assim como a fermentação de alguns compostos orgânicos como o piruvato formando acetato, H_2 e CO_2

também já foi relatada. Por serem de grande interesse em vários processos industriais, alguns aspectos do metabolismo de alguns compostos citados pela ação das BRS serão mais bem discutidos posteriormente.

Outra interessante via que podemos citar é a capacidade de redução de alguns metais pesados utilizados como aceptores finais de elétrons. Embora não se tenha detectado crescimento significativo das culturas nas condições propensas à tais reações (LLOYD et al., 2000 e TEBO E OBRAZTSOVA, 1998), Cheung e Gu (2003), realizaram estudos com BRS em relação à redução de cromo hexavalente (Cr^{6-}); subproduto altamente tóxico e cancerígeno oriundo de vários tipos de indústrias, e obteve muitos resultados positivos quanto a inativação deste metal para formas menos perigosas, demonstrando como pode ser de grande valia o uso destas bactérias na biotecnologia industrial.

Logo, a gama de possíveis compostos, todos com estados de oxidação diversos, que estas bactérias podem utilizar em diferentes etapas de seu metabolismo, mostra como as mesmas podem estar presentes em ambientes diversos e assim participar dos processos bioquímicos dos mesmos.

2.3 Classificação Taxonômica e Caracterização dos Grupos de BRS

Embora, como visto, haja diversos estudos recentes sobre as BRS, as mesmas são conhecidas há muito tempo, sendo que os pesquisadores Ferdinand Cohn em 1867 e *Lothar Meyer* em 1964 foram os primeiros a identificar a redução biológica do sulfato como a responsável por crescentes concentrações de gás sulfídrico em habitats aquáticos (RABUS et al., 2006). No entanto, apenas em 1895 o professor holandês Martinus W. Beijerinck (1851 – 1931) da Escola Politécnica de Delft isolou as primeiras culturas puras de BRS por meio do conceito e metodologia, por ele mesmo formulados, de “cultura de enriquecimento” (MADIGAN et al., 2009).

Desde esta época muitos avanços têm ocorrido quanto à identificação das BRS, uma vez que muitos trabalhos têm proposto várias características tanto bioquímicas quanto morfológicas visando a construção de uma chave para os grupos. Em seu livro, Holt et al. (1994), propõem uma divisão em quatro subgrupos levando-se em consideração características morfológicas e bioquímicas, sendo estas últimas ligadas a oxidação dos

substratos orgânicos até CO₂ (Quadro 2.1). Nas demais chaves presentes no livro grupo são propostas diversas outras características para identificação de gêneros e espécies para cada grupo.

Quadro 2.1: Diferenciação de subgrupos de 1 à 4 de bactérias dissimilativas de sulfato ou enxofre. Adaptado de Holt et al., 1994.

Caraterísticas	1. BRS* formadoras de esporos	2. BRS* não formadoras de esporos; oxidação incompleta de substratos	3. BRS* não formadoras de esporos; oxidação completa de substratos	4. Bactérias redutoras de enxofre
Sulfato reduzido à sulfito	+	+	+	-
Enxofre reduzido à sulfito	-	+ ou -	-	+
Substratos orgânicos completamente e reduzidos à CO₂	+ ou -	-	+	+

* **BRS:** Bactérias Redutoras de Sulfato.

Muitos outros autores também citam a oxidação completa de compostos orgânicos como uma característica muito importante para a caracterização destas bactérias (CASTRO et al., 2000 e MADIGAN et al., 2009), sendo que a oxidação do acetato é muito conhecida e considerada relevante, embora a energética de sua reação ainda não tenha sido identificada, o seu mecanismo é muito bem conhecido (MADIGAN et al., 2009). Além desta, dentre as principais características citadas para identificação estão a motilidade, forma da célula e tipo de reação ao método de coloração de Gram (CASTRO et al., 2000).

Embora estas características bioquímicas e morfológicas sejam até hoje muito utilizadas para a identificação das BRS, deve-se salientar que vários trabalhos têm se utilizado de ferramentas moleculares (CASTRO et al., 2000 e STACKEBRANDT et al., 1997), buscando melhores formas de identificar e catalogar as diversas espécies que atualmente passam de 220 estando divididas em cerca de 60 gêneros diferentes (BARTON e FAUQUE, 2009).

Um trabalho muito interessante neste sentido foi realizado por Muyzer e Stams (2008), que agruparam grande parte das espécies conhecidas de BRS em uma árvore filogenética confeccionada segundo sequencias de RNA ribossomal presentes em banco de

dados (SILVA - <http://www.arb-silva.de/>); sendo que o resultado pode ser conferido na figura 2.4.

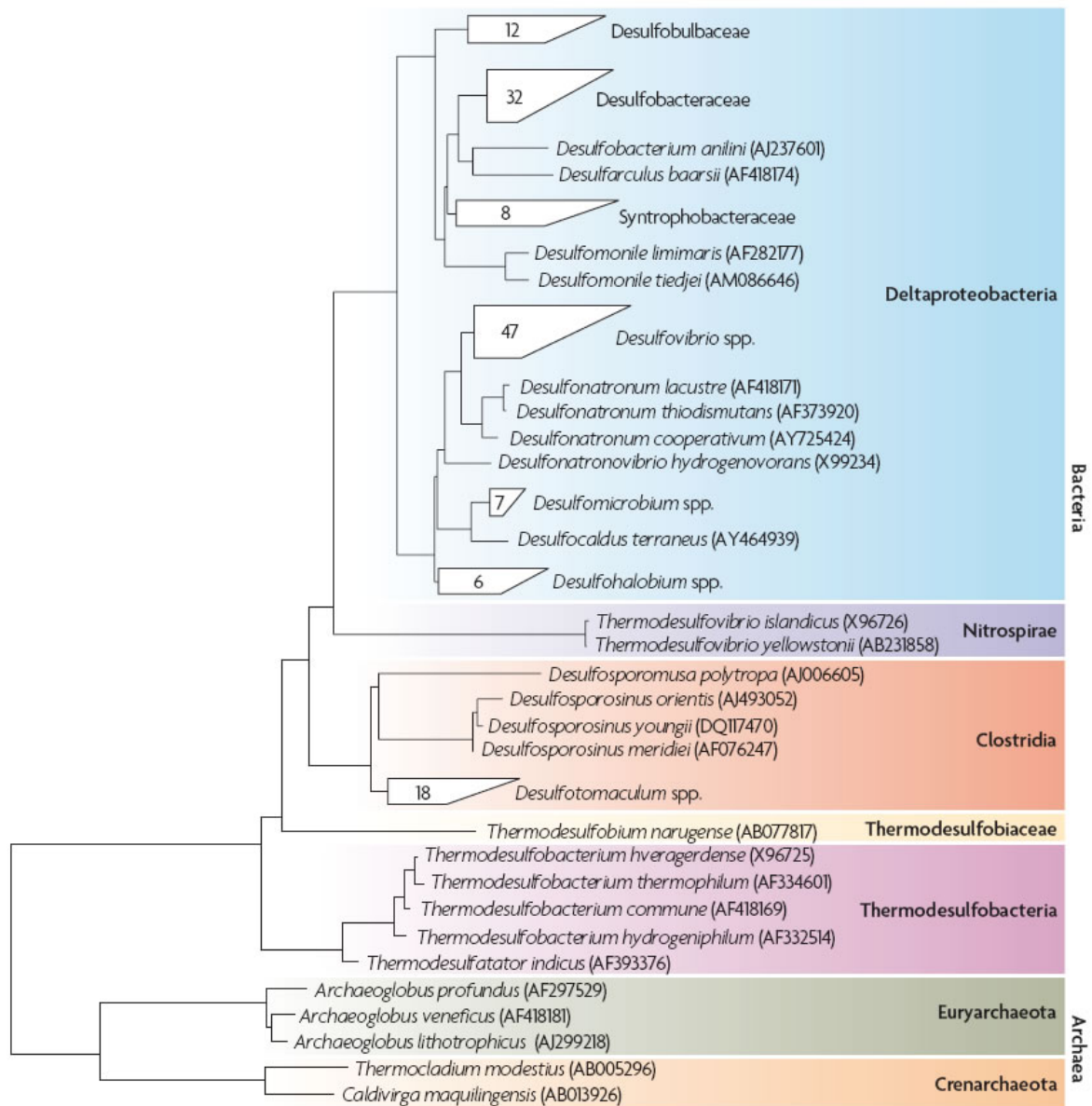


Figura 2.4: Árvore filogenética baseada em seqüências de RNA ribossomal descritas em bactérias redutoras de sulfato, os números dentro dos quadros indicam o número de espécies diferentes presentes em um determinado grupo. Adaptado de Muyzer e Stams (2008).

Por meio da figura 2.4 pode-se notar que, segundo Muyzer e Stams (2008), as BRS fazem parte de cinco subdivisões pertencentes ao domínio Bacteria (Deltaproteobacteria, Nitrospirae, Clostridia, Thermodesulfobiaceae e Thermodesulfobacteria), além de 2 subdivisões pertencentes ao domínio Archaea (Euryarchaeota e Crenarchaeota). Vale lembrar que, segundo Barton e Fauque (2009), as BRS presentes à subdivisão Clostridia

são todas pertencentes à família Firmicutes e perfazem os únicos gêneros de BRS Gram positivas formadoras de esporos.

2.4 Utilização das BRS em Biolixiviação e Biorremediação

Devido à produção do H_2S em seu metabolismo final as BRS têm a capacidade de lixiviar metais em ambientes aquáticos, já que o mesmo reage rapidamente com os íons metálicos formando sulfetos insolúveis, sendo muito utilizadas para remediar drenagens ácidas de minas em barragens de resíduos (WEEB et al., 1998). Tais características, e também a enorme capacidade metabólica destas bactérias as tornam hoje de grande importância econômica, ecológica e para a biotecnologia industrial.

Huisman et al. (2006) evidenciam muito bem a utilidade destas bactérias para as indústrias de mineração e metalurgia, pois, a produção de H_2S pelas mesmas, propicia a recuperação de metais de importância, na forma de sulfetos, liberados nas drenagens ácidas destas atividades econômicas. Prática que é mais vantajosa do que a precipitação em forma de hidróxidos. Além disso, relata que o uso destas bactérias tem maior vantagem econômica, uma vez que o uso de reagentes para esse fim, como o NaHS ou H_2S industrializados, têm custo muito elevado.

Em relação ao meio ambiente as BRS atuam não somente com o seu óbvio papel no ciclo do enxofre, mas também são reguladoras de uma variedade de processos que ocorrem em solos inundados incluindo a reciclagem de matéria orgânica, biodegradação de diversos poluentes aromáticos clorados em anaerobiose e a metilação do mercúrio (CASTRO et al., 2000). Kleikemper et al. (2004) reforçam, em seu estudo, como as BRS têm sido altamente utilizadas em áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo, sendo a degradação de sulfato considerada um importante processo nestes locais; Robertson et al. (2000), também citam esta capacidade das BRS, tendo relacionado em seu trabalho a degradação de certos hidrocarbonetos como naftaleno; 1,3,5-trimetilbenzeno (TMB), tolueno, *p*-xileno e etilbenzeno com a degradação de sulfato possivelmente por associações bacterianas, uma vez que nesta investigação culturas puras não foram capazes de degradar todos os compostos sozinhas, como foi o caso do benzeno. Em uma linha parecida, Azabou et al. (2005) em um estudo sobre a degradação por BRS do Fosfogipso ($CaSO_4$), um subproduto

potencialmente tóxico advindo da produção industrial do ácido fosfórico ou por meio da reação entre o fosfato de cálcio $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ das rochas e o ácido sulfúrico (H_2SO_4) das chuvas ácidas, identificou a possibilidade de uso das mesmas para a degradação deste composto e seu tratamento industrial antes do despejo.

Levando-se em conta a dinâmica de formação de certas rochas, as BRS foram (provavelmente) as maiores responsáveis pela formação de depósitos de sulfetos metálicos em ambientes pré-históricos anaeróbios. Tais jazidas são hoje muito explorados para fins comerciais (CARVALHO, 2004).

2.5 Estudo de BRS em Biorreatores

Visando seu uso para processos industriais muitos trabalhos têm atualmente se dedicado ao estudo da utilização de BRS em condições controladas como os biorreatores.

Xin et al. (2008), mostra em seu trabalho que para garantir um bom rendimento em relação à redução de sulfato, biorreatores que utilizam BRS podem ser enriquecidos com ferro não-valente, já que o mesmo aumenta o pH do meio além de fornecer hidrogênio ao sistema pela reação - $\text{Fe}^0 + 2\text{H}_2\text{O} = \text{Fe}^{2+} + 2\text{OH}^- + \text{H}_2$. Isso é importante porque, como dito anteriormente as BRS, não suportam valores muito baixos de pH e algumas espécies podem utilizar o hidrogênio gasoso para a redução do sulfato. Ainda sobre a questão do pH, Xin et al. (2008) também cita em seu trabalho que os baixos valores do mesmo presentes em alguns sistemas, como as drenagens ácidas de minas, pode ser o motivo pelo qual o uso de BRS para remediar estes locais não tenha tido sucesso efetivo em alguns trabalhos.

2.6 BRS Associadas às Corrosões Metálicas

O uso industrial das BRS se baseia principalmente na biolixiviação, como dito anteriormente, mas a sua capacidade de corroer tubulações metálicas subaquáticas tem levado à muitos estudos visando o seu controle. Javaherdashti et al. (2006) demonstram em

seu trabalho como as BRS participam da degradação de metais em ambientes aquáticos, relatando a grande perda de ductibilidade e quebra de amostras de aço muito mais elevadas em condições bióticas quando comparado às abióticas.

Em observação à corrosão de metais por BRS em ambientes aquáticos, Dinh et al. (2004), propõem dois mecanismos que podem vir a ocorrer em relação ao ferro (Fe), sendo um indireto pelo ataque químico do sulfeto de hidrogênio (H₂S) produzido pelas BRS e representado pela equação - $2[\text{CH}_2\text{O}] + 1\frac{1}{3}\text{Fe} + 1\frac{1}{3}\text{SO}_4^{2-} + \frac{2}{3}\text{H}^+ \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + 1\frac{1}{3}\text{FeS} + 1\frac{1}{3}\text{H}_2\text{O}$, e outro direto por meio da formação de um “filme de hidrogênio” sobre o ferro exposto à água representado pela equação - $4\text{Fe} + \text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeS} + 3\text{Fe}^{2+} + 8\text{HO}^-$, a formação deste filme despolariza o ferro e estimula a sua corrosão.

Além de mostrar dois possíveis caminhos para a corrosão de um metal de uso muito disseminado, estes mecanismos nos fornecem dados que podem ser utilizados na elucidação de certas vias bioquímicas pelas quais estes organismos utilizam seu substrato, uma vez que, como discutido anteriormente, as capacidades metabólicas destas bactérias se mostram altamente variáveis, sendo que vários estudos recentes têm proposto e relatado novas vias e possibilidades do seu metabolismo.

Tendo em vista estas possibilidades, o presente trabalho se concentrou na busca de dados e metodologias com potencial para auxiliar na elucidação de vários aspectos referentes as BRS, os quais serão muito úteis para trabalhos futuros com as mesmas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo e de Amostragem

As amostras foram coletadas no mês de Abril do ano de 2004 em trabalho associativo com pesquisadores do Departamento de Geologia/DEGEO/UFOP em pontos escolhidos aleatoriamente na extensão do Rio Conceição situado na região do RPPN Santuário do Caraça, MG (Figura 2). O rio em questão foi muito apropriado para o estudo devido á grande quantidade de resíduos nele lançados por companhias de mineração (Figura 6), tornando-o assim um local com condições de sedimento e água mais propícias para as BRS.

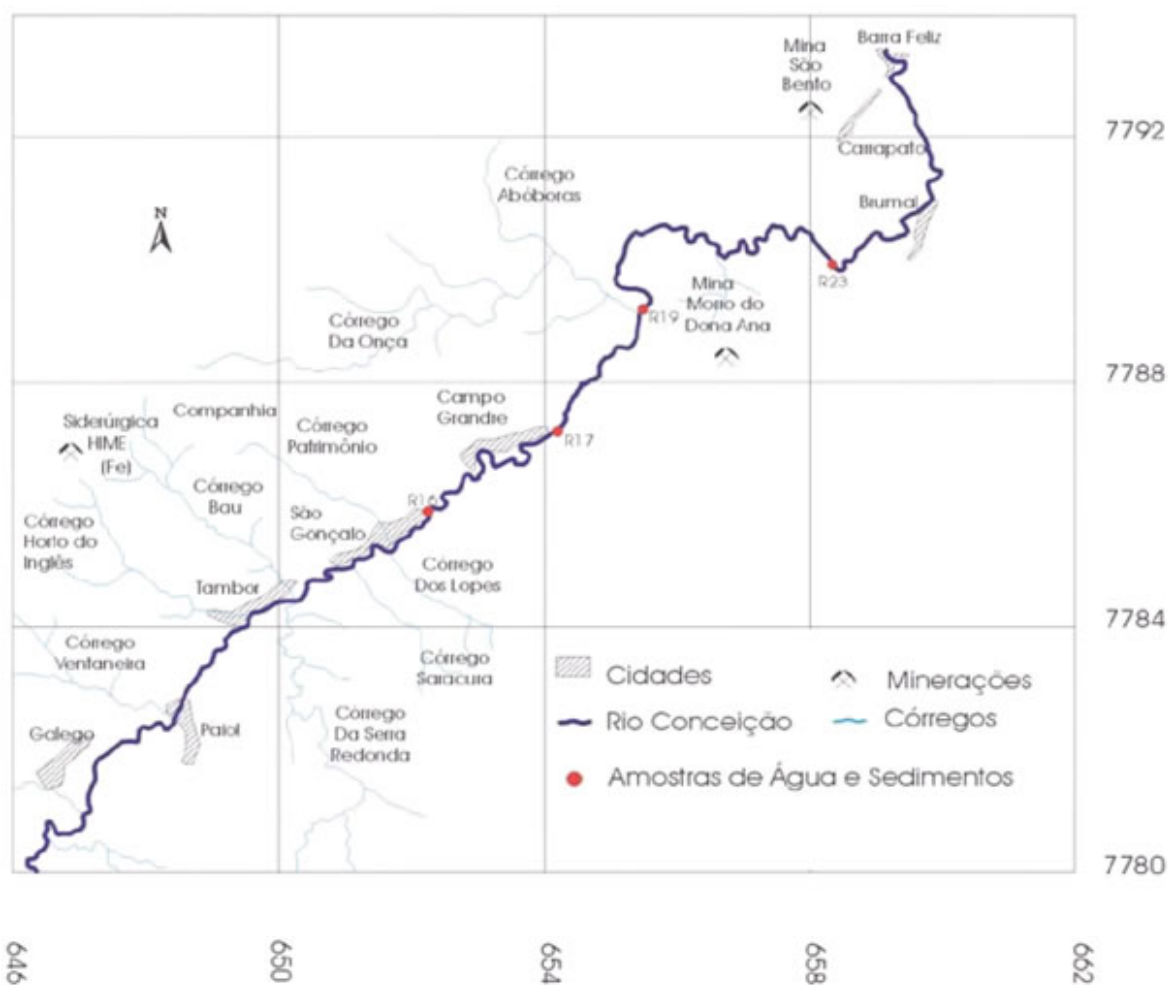


Figura 3.1: Região do Rio Conceição, MG. Locais de coleta e principais atividades humanas próximas.

A coleta foi feita por meio de metodologia tradicional (GREENBERG et al., 1992): frascos de vidro estéreis foram levados até o local onde as amostras de sedimento e água foram recolhidas. Após este procedimento o material foi trazido até o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas/ICEB/UFOP. Os pontos de coleta foram um total de quatro identificados como: R23, R19, R17 e R16 (Figura 6). De cada um deles foi retirada uma amostra de água e uma de sedimento.

3.2 Cultivo Inicial das Amostras

As amostras foram enriquecidas tendo em vista o objetivo de aumentar o número de bactérias em cada uma, além de selecionar o tipo de bactéria de interesse (BRS) tornando assim mais fáceis os passos seguintes do experimento. Para este fim foi escolhido um meio de cultura específico: Meio de cultura modificado de Postgate C segundo Cheung e Gu (2003) que se mostrou muito eficiente em trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Microbiologia do DECBI-ICEB/UFOP (RAMPINELLI, 2004).

O enriquecimento e a avaliação da precipitação do ferro, utilizando o meio de cultura citado, foram feitos da seguinte forma: uma alíquota de cada amostra de água e de sedimento foi transferida cada uma para um Erlenmeyer diferente contendo o meio de cultura citado em uma proporção de 1:20 (amostra: meio). Os frascos foram incubados a 32 °C, durante uma semana, após a qual foi verificada a redução do sulfato por meio da formação de sulfeto de ferro (FeS), resultando em um precipitado negro característico. Como estas bactérias são anaeróbias, o uso de uma cuba de anaerobiose foi necessário para seu enriquecimento.

Após o período citado, objetivando um maior enriquecimento e seleção do referido grupo, uma alíquota de cada cultura enriquecida que apresentou formação de precipitado foi transferida para um novo Erlenmeyer contendo o mesmo meio de cultura, seguido do mesmo tratamento descrito acima, resultando assim o segundo enriquecimento. Passados os dias de incubação, o terceiro enriquecimento foi realizado de maneira similar. As amostras que não apresentaram precipitação foram submetidas a novo enriquecimento com nova alíquota buscando uma melhor varredura das BRS.

3.3 Isolamento das Culturas Puras de Bactérias Redutoras de Sulfato

Após as etapas descritas de enriquecimento, realizou-se o isolamento das bactérias pelo método espalhamento em placa, que consiste na diluição seriada (10^{-1} a 10^{-5}) do material enriquecido das amostras de água e sedimento. De cada diluição foram colhidos 0,1mL e aplicados sobre placa de Petri contendo o meio sólido modificado de Postgate C (CHEUNG E GU, 2003), totalizando cinco placas por amostra (uma para cada diluição). A solução foi espalhada com o uso de uma alça de vidro estéril para contagem das colônias isoladas. As placas foram então incubadas a uma temperatura de 32 °C, durante 24 horas, em ambiente anaeróbio segundo metodologia utilizada por RAMPINELLI (2004). A metodologia de espalhamento foi aplicada visando uma maior facilidade em se coletar as colônias isoladas, visto que as mesmas crescem em sua totalidade na superfície do meio o que não ocorre no método de *pour plate* onde colônias crescem no interior do meio sólido, dificultando assim a sua obtenção.

Destes procedimentos resultaram colônias isoladas em algumas diluições. As placas que apresentavam colônias mais diversas e bem definidas foram separadas para que as mesmas fossem obtidas com agulha bacteriológica e inoculadas, separadamente em frascos de 2 mL contendo o mesmo meio de cultura em sua forma líquida. Como estas bactérias são anaeróbias, o uso dos tubos foi de grande ajuda já que são herméticos e propiciam bem esta condição.

Para a confirmação de BRS, as culturas puras inoculadas foram incubadas a temperatura de 32 °C, durante uma semana. Os inóculos que apresentaram a formação de precipitado negro de sulfeto de ferro foram separados e classificados.

Nesta etapa, a classificação de cada inóculo foi feita da seguinte forma:

- Cada amostra teve sua identificação resumida para facilitar a classificação (Quadro 3.1);
- Os isolados foram identificados com números começando de 01;
- Foram determinadas letras para indicar de onde cada amostra foi isolada (Quadro 3.1).

Das amostras que apresentaram número muito grande de colônias, foram isoladas um número determinado das mesmas (40), para facilitar os trabalhos. De cada isolado foi feita uma cultura de estoque em frascos herméticos, tipo penicilina, contendo o meio sólido descrito anteriormente picado com agulha de repicagem, incubado nas condições descritas

para crescimento e, após verificação de redução de sulfato, conservado em geladeira no Laboratório de Microbiologia do DECBI-ICEB/UFOP.

Quadro 3.1: Siglas usadas para identificação dos isolados de bactérias redutoras de sulfato segundo seu local de coleta e origem.

LOCAIS DE COLETA	SIGLA
R19	R1
R17	R2
R16	R3
R23	R4
ORIGEM DA AMOSTRA	SIGLA
SEDIMENTOS	A
ÁGUA	B

3.4 Caracterização dos Isolados Obtidos

Após obtenção das culturas puras de BRS, prosseguiram-se os trabalhos com os testes para a identificação do gênero e/ou espécies das mesmas. A identificação foi realizada observando-se as características morfológicas tanto das células (forma, arranjo, entre outras) quanto das colônias (tamanho, cor, entre outras); além das fisiológicas, relacionadas com a capacidade das bactérias de sintetizar enzimas, assimilarem diferentes substratos e gerar produtos metabólicos específicos.

3.4.1 Caracterização Morfológica

As características de cada colônia foram descritas observando-se macroscopicamente as mesmas após o crescimento dos isolados em meio sólido. Em seguida utilizou-se o Método de Coloração de Gram para a identificação da forma, arranjo celular bacteriano como também sua definição de Gram positivo ou Gram negativo como parâmetros usuais para etapa inicial de classificação taxonômica (RABUS et al., 2006). As observações de morfologia foram reforçadas com a sua visualização por meio de exame á fresco utilizando microscopia de contraste de fase. Todos os testes citados foram realizados com a utilização de Microscópio ótico marca Olympus, modelo BX41.

Para melhor avaliação morfológica das referidas células dos isolados utilizou-se o Microscópio Eletrônico de Varredura, Marca Jeol, Modelo JSM-5510 (MEV), equipamento do Laboratório de Microscopia e Microanálise (Microlab) Departamento de Geologia (DEGEO)-UFOP. Para esta análise seguiu-se o protocolo padronizado do Microlab/DEGEO-UFOP (GOLDSTEIN et al., 2003).

3.4.2 Caracterização Bioquímica

Para caracterização metabólica realizou-se uma série de testes bioquímicos a fim de avaliar a fermentação de glicose e de lactose pela produção de ácido e/ou gás. Também foi utilizado citrato como única fonte de carbono e uréia como única fonte de nitrogênio além da produção de indol e ácido sulfídrico a partir de triptofano e aminoácidos sulfurados, respectivamente. A motilidade foi também avaliada pela visualização do padrão de crescimento em meio semi-sólido, sendo posteriormente confirmada por meio do método da gota pendente em lâmina escavada (MILOSTAN, 2006).

Após a incubação dos tubos a 32 °C, durante 48 horas em condições anóxicas, foi feita a leitura das reações bioquímicas dos testes supra-citados. Para certificação foram feitos controles positivos e negativos para os meios.

A verificação da capacidade das culturas puras para a utilização de diversos compostos orgânicos como fontes de carbono e energia foi também realizada utilizando o meio de cultura modificado de Postgate C. Como dito anteriormente, este parâmetro é muito importante para uma melhor identificação dos isolados, além de fornecer importantes informações sobre as capacidades metabólicas dos mesmos. Verificou-se o grau de oxidação dos seguintes compostos: acetato, lactose, glicose, lactato, etanol, acetona, benzeno, propionato e butirato, observando-se a formação de precipitado negro de FeS e produção de gás em tubo de Duhan, esta última evidencia uma oxidação completa do composto à CO₂. Para realização deste teste foram utilizados tubos de ensaio herméticos com rosca, contendo o meio dotado de apenas um dos compostos citados como fonte de carbono disponível, para cada composto testado foi feita uma bateria de tubos em duplicatas para maior certeza dos testes. Foram utilizados controles negativos, ou seja, um

tubo contendo o meio sem as bactérias e com a fonte de carbono, e outro contendo as bactérias, mas sem a fonte de carbono.

Em seguida, foram realizados outros quatro testes: a presença das enzimas catalase e desulfoviridina e a capacidade de realizar a desnitrificação e a produção de glicose (esta última por meio de fontes de carbono simples). Os testes referentes à presença de catalase e realização de desnitrificação mostram interessantes adaptações dos isolados, pois, por meio da presença de catalase, pode-se supor certo nível de metabolismo oxidativo e, portanto certa tolerância ao oxigênio, e a desnitrificação é um importante processo realizado por várias bactérias do ambiente sendo que, neste caso, indica outro possível aceptor final de elétrons além do sulfato.

Por sua vez, o teste que indica a presença da enzima desulfoviridina é muito importante para ajudar na identificação dos isolados, já que esta enzima (um tipo de sulfato redutase) está presente em apenas alguns grupos de BRS (RABUS et al., 2006).

Os testes de catalase e desnitrificação foram feitos por meio de metodologias padrão (GREENBERG et al., 1992) utilizando-se, respectivamente, a reação das células com água oxigenada 30V (trinta volumes) e reação dos isolados com soluções de naftiamina e ácido sulfanílico após o seu crescimento em meio de cultura peptonado; para ambos os testes foram utilizados controles positivo e negativo.

O teste de desulfoviridina seguiu uma metodologia citada por Silva (1999) pela qual o isolado, após sua encubação em meio de cultura apropriado, é colocado em uma lâmina e tem suas células lisadas com a utilização de algumas gotas de NaOH 2N, em seguida a lâmina é observada ao microscópio óptico em um comprimento de luz de 365nm onde se nota a formação de manchas avermelhadas caso haja a presença da enzima em questão, uma vez que, o cromóforo sirohidroclorina presente na mesma reage desta maneira a este tipo de luz (POSTGATE, 1979). Este teste teve o seu resultado confirmado posteriormente pela metodologia citada por Postgate (1979) onde os isolados tem suas células lisadas ao se adicionar o NaOH 2N em tubos de ensaios fechados hermeticamente contendo os mesmos após encubação, neste caso a formação das manchas avermelhadas é confirmada ao se observar os tubos junto a uma lâmpada teste com luz de comprimento de onda de 365nm. Para as duas metodologias utilizaram-se controles negativos.

Por fim, o teste de produção de glicose foi realizado com um kit próprio de glicose enzimática líquida pronta da marca Doles seguindo-se o procedimento padrão indicado pelo mesmo: utilização de uma curva padrão de concentração de glicose (Figura A1) feita por meio de soluções com quantidades conhecidas da mesma para determinar a sua

concentração no meio de cultivo dos isolados em crescimento. Para a leitura das amostras dos isolados e confecção da curva de produção de glicose foi utilizado um fotocolorímetro de marca Metronic (Modelo M2) fazendo-se uso do filtro de cor verde e utilizando-se o reagente de cor presente no kit como branco.

Para o teste os isolados foram incubadas por um período de quinze dias em tubos tipo Falcon de quinze mililitros. O meio utilizado foi o Postgate C modificado contendo como única fonte de carbono o lactato, que foi escolhido devido aos isolados mostrarem bom crescimento com o mesmo nos experimentos de utilização de fonte de carbono, além disso, por ser uma fonte de carbono simples e barata, a produção de glicose por meio dele pode indicar uma característica muito útil para os isolados; por fim, o lactato é uma fonte de carbono amplamente utilizada por este grupo de bactérias e utilizá-lo no meio de cultivo previne o crescimento de outros grupos de bactérias que podem agir como contaminantes, por exemplo, os fermentadores (WIDDEL e BAK, 1992). Após o período de incubação, os isolados foram centrifugados e os *pellets* foram descartados visando uma maior concentração de células para realização da leitura, sendo que, a mesma foi realizada após as células serem lisadas com uma solução de NaOH 2N para que se pudesse medir a glicose total produzida, tanto em forma intra como extracelular. Para determinar se haveria um possível erro de leitura pelo uso do NaOH, foram realizados testes controle utilizando o mesmo.

3.5 Identificação Taxonômica dos Isolados

Para proceder-se à identificação dos isolados foram utilizadas três fontes como referência: os trabalhos de Castro et al. (2000); Rabus et al. (2006), e Thauer et al. (2007). A escolha destas referências em questão se deu devido ao fato dos mesmos indicarem características diferentes como forma de identificação dos grupos de BRS, o que torna suas chaves úteis, uma vez sendo complementares. Além disso, Rabus et al. (2006) e Thauer et al. (2007) são trabalhos publicados em livros muito conhecidos e conceituados em relação à descrição de características tanto morfológicas quanto bioquímicas dos grupos descritos de bactérias, incluindo as redutoras de sulfato, além disso, se tratam de edições muito recentes e de ampla revisão bibliográfica.

3.6 Métodos para Escolha de Cepas para Testes Fisiológicos

Após a realização de todos os testes citados, já se possuía uma boa idéia das características dos isolados o que foi muito útil para a sua identificação. Contudo, o número de cepas isoladas se mostrou muito grande e percebeu-se que a utilização de todas para os testes de cinética de crescimento tornaria o experimento altamente dispendioso com muita dificuldade em se organizar e comparar os dados. Assim, decidiu-se pela eliminação de algumas culturas por meio de testes que permitiriam observar quais são as que apresentam características mais interessantes para o trabalho: crescimento em condições variáveis de pH e produção de H_2S em curtos períodos de tempo.

3.6.1 Determinação do Tempo de Redução de Sulfato em Relação ao pH

Neste experimento foi determinado o tempo em que cada isolado apresentava um resultado visível de redução de sulfato, levando-se em conta diferentes valores de pH. Segundo WILLOW e COHEN (2003), as BRS mostram um crescimento mais acentuado no meio ambiente na faixa de pH entre 5 e 9, assim a escolha deste intervalo de pH se mostrou muito apropriada para o teste. Logo, 5 alíquotas de 0,1 mL de cada isolado foram inoculadas cada uma em um frasco de 2ml contendo meio modificado de Postgate C. Cada frasco possuía o meio com um valor diferente de pH, á saber: pH's 5, 6, 7, 8 e 9; e foram incubados em estufa de cultura regulada á 32°C. Após este procedimento, a cada 12 horas era feita uma leitura dos isolados para observação da formação de precipitado negro de sulfeto de ferro, que caracteriza a redução do sulfato no meio. Ao se observar a primeira formação de precipitado no tubo o tempo era anotado e o isolado era mantido em incubação até a precipitação total do ferro na forma de sulfeto ferroso. Após esta etapa, este tempo também era anotado e os isolados eram mantidos em geladeira para experimento posterior.

3.6.2 Determinação do Número de Células dos Isolados após Redução de Sulfato em Diferentes Valores de pH

Para a realização deste experimento foi utilizada uma metodologia padrão muito divulgada: contagem por meio da câmara de Neubauer (CARVALHO, 2008). Por meio desta metodologia, uma amostra de 0,1ml de uma diluição de 1:10 de cada tubo utilizado no experimento anterior, foi inoculada na câmara; visualizada em microscópio óptico, e teve o seu número de células determinado por contagem direta. Depois de realizada a contagem foi feita a determinação do número total de células por mililitro de amostra utilizando-se os fatores de conversão próprios da câmara. Os resultados puderam ser utilizados como uma forma de comparar o número de células presente em cada isolado segundo o pH do mesmo. Além disso, foi possível fazer um paralelo entre o número de células de cada amostra e o tempo em que a redução do sulfato pelas cepas se tornou visível no meio de cultivo.

Com a comparação entre os testes de cada isolado, nos dois experimentos citados, foi então possível a escolha dos que apresentavam características que poderiam ser de melhor valia para o trabalho, como dito anteriormente, com os quais se prosseguiu os testes.

3.7 Determinação das Curvas de Crescimento e Tempo de Geração dos Isolados

Por meio deste experimento buscou-se identificar quais isolados, dentre os escolhidos pelas metodologias citadas no item 3.6, efetivamente crescem com maior rapidez indicando assim os que melhor podem ser utilizados para experimentos em grande escala ou atividades industriais onde é importante que o tempo de tratamento seja o mais rápido possível.

Os isolados foram inoculados em frascos testes de vidro herméticos de 1L vedados com septos de silicone e tampas vazadas, garantindo assim um meio anaeróbico próprio para os mesmos, e incubados á uma temperatura de 32°C.

A retirada de alíquotas para realização do teste foi feita a cada dois dias durante um período de dez dias totalizando um total de seis leituras por amostra (incluindo medição do tempo 0), para retirada das alíquotas foi utilizada uma seringa estéril para perfurar os septos evitando assim possíveis problemas com contaminações externas. O crescimento das amostras ao passar do tempo foi determinado segundo a medida da absorbância do meio em fotocolorímetro utilizando-se o meio de cultivo estéril como branco e filtro na cor laranja.

Buscando os melhores resultados possíveis para o crescimento dos isolados também se procurou diminuir a fase de adaptação dos mesmos, isso foi feito por meio da inoculação dos isolados nos frascos de teste após os mesmos serem incubados por uma semana em tubos Falcon com volume de quinze mililitros. Depois do período de incubação o meio foi centrifugado e o *pellet* rejeitado, assim, após ressuspender a massa de células resultante com salina estéril, a mesma foi adicionada aos frascos testes respeitando uma inoculação de 5% do volume total.

Quanto ao meio utilizado, foi observado que o Postgate C modificado não seria de valia para o teste por dois motivos:

- A precipitação do ferro contido no meio na forma de sulfetos não permitiria uma leitura correta da absorbância das células, e;
- Os sulfetos metálicos podem agir como inibidores para as BRS, pois a sua precipitação nas paredes das células bloqueia o acesso das mesmas aos substratos e a outros nutrientes presentes no meio (UTGIKAR et al. *apud* TANG et al., 2009).

Tendo em vista estas questões, foi inicialmente proposta a retirada dos compostos de ferro do meio de cultivo visando impedir a sua precipitação e assim poder realizar o experimento, porém também foi observado que muitas BRS dependem de ferro no meio para o seu crescimento, já que o mesmo é requerido como micronutriente por muitas delas (POSTGATE, 1965), tornando inviável que o mesmo seja totalmente eliminado do experimento.

Para solucionar este problema escolheu-se utilizar outro meio de cultivo para este experimento: o meio Postgate C original, que possui uma quantidade bem inferior de ferro em sua composição além de uma quantidade maior de citrato de sódio que impede que ocorra a precipitação do mesmo na forma de sulfetos (POSTGATE, 1979); porém, como este meio possui em sua composição o extrato de levedura, optou-se por modificar a sua fórmula retirando-o visando assim, como dito anteriormente, impedir que se proliferem

bactérias indesejadas; para compensar esta fonte de carbono utilizou-se uma maior concentração de lactato.

Como última observação em relação ao meio, sabe-se que a presença de sulfeto em excesso no meio pode inibir o crescimento das BRS (ZAGURI et al., 2007) o que poderia acontecer ao meio utilizado já que o sulfeto não estaria reagindo com o ferro formando o sal insolúvel; optou-se por sanar este problema com a utilização de um maior espaço vazio nos frascos onde o crescimento das bactérias ocorria, permitindo assim que o sulfeto migrasse do meio para a atmosfera do frasco onde não afetaria os isolados.

Com a determinação das curvas de crescimento os resultados foram interpretados graficamente e os tempos de geração de cada um dos isolado foram determinados segundo metodologia padrão (VARESCHE *apud* SILVA, 1999), segundo a qual o tempo de geração (Tg) de uma cultura bacteriana pode ser calculado segundo a seguinte equação:

Equação 3.1
$$Tg = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}}$$

Sendo $\mu_{\max}$ determinado pelo valor do coeficiente angular da equação da reta que representa a fase exponencial de crescimento da cultura bacteriana (GOMES, 1995).

Com estes dados em mãos pode-se determinar com grande precisão quais dos isolados possuíam crescimento mais rápido e seriam de maior valia para projetos de remediação.

3.8 Quantificação do Consumo de Sulfato pelos Isolados

A quantificação do sulfato foi realizada segundo metodologia padrão (GREENBERG et al., 1992), pela qual a concentração de sulfato no meio é determinada pela formação de cristais insolúveis de sulfato de bário medidos por método turbidimétrico. Para a realização deste método em particular, foi inicialmente feita uma curva padrão utilizando-se soluções com concentrações conhecidas de sulfato (Figura A2) medidas, segundo o método citado, em um turbidímetro da marca DEL LAB (Modelo DLM-2000B). A curva não apenas foi importante para a determinação do sulfato no meio de cultivo, como também serviu para demonstrar o grau de confiabilidade do aparelho utilizado, ou seja, a maior concentração de sulfato que o meio poderia conter para que

houvesse uma medida confiável. Assim, neste experimento, o meio Postgate C modificado teve uma redução na sua concentração de sulfato para se adequar ao nível necessário para uma leitura confiável.

O procedimento de incubação e coleta de alíquotas dos isolados para o teste foi o mesmo utilizado para o experimento de determinação da curva de crescimento e tempo de geração dos isolados, diferenciando-se pela utilização do meio de Postgate C modificado e pelo número de alíquotas colidas para análise que, neste caso, foram um total de 5. Assim, para cada isolado foi determinada uma curva de consumo de sulfato.

3.9 Quantificação da Produção de Sulfeto pelos Isolados

A quantificação da produção de sulfeto foi feita também segundo metodologia padrão (GREENBERG et al., 1992) onde a concentração foi obtida através da reação do meio com soluções de acetato de zinco, dimetil-p-fenilenodiamina e sulfato férrico amoniacal. Novamente foi feita uma curva de calibração (Figura A3) visando os mesmos objetivos da realizada no experimento de quantificação de consumo de sulfato. As leituras foram feitas por meio de fotolorímetro (Metronic, Modelo M2) utilizando-se de filtro de cor laranja e água mili-Q desoxigenada como branco.

O procedimento para incubação dos isolados foi o mesmo utilizado no experimento anterior e se mostrou muito vantajoso, uma vez que os frascos herméticos impediam que o sulfeto se difundisse para o ambiente, sendo que a coleta realizada com as seringas descartáveis também contribuiu para este fim.

Ao final das leituras as curvas de produção de sulfeto de cada isolado foram comparadas com as suas respectivas curvas consumo do sulfato determinadas anteriormente, o que permitiu que se inferissem importantes conclusões sobre a fisiologia dos mesmos.

4 RESULTADOS

4.1 Amostras Positivas para Redução de Sulfato

No experimento de enriquecimento as amostras de sedimento foram as únicas que apresentaram linhagens positivas para a redução do sulfato, sendo que as amostras de água não tiveram o mesmo resultado, mesmo depois de novas tentativas de enriquecimento segundo a metodologia descrita.

Primeiramente, para cada amostra positiva foi feito o espalhamento em placa (Figura 4.1) e das melhores placas realizou-se a contagem do número de colônias para quantificar as bactérias presentes após enriquecimento, determinando assim o número de UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias) como apresentado na Tabela 4.1.



Figura 4.1: Crescimento dos indivíduos em meio sólido de Postgate C após enriquecimento e espalhamento das amostras. Incubação em anaerobiose por 24 horas. **A:** Amostra R1A e **B:** Amostra R3A.

Tabela 4.1: Número médio de UFC's entre as amostras positivas para redução de sulfato.

Amostra	Nº de Colônias / Diluição	UFC/mL (média)	Colônias Positivas
R1A	100/10 ⁻¹ e 85/10 ⁻²	4,75.10 ⁴	12
R2A*	712/10 ⁻⁴ e 15/10 ⁻⁵	4,31.10 ⁷	37
R3A	292/10 ⁻³ e 29/10 ⁻⁴	2,91.10 ⁶	14
R4A*	296/10 ⁻⁴ e 28/10 ⁻⁵	2,88.10 ⁷	N/D#

*: Amostras que passaram por nova metodologia.

#: Resultados não-conclusivos.

4.2 Linhagens de BRS Isoladas

Depois da contagem de colônias procedeu-se à obtenção de culturas puras das amostras positivas para redução de sulfato. Neste estágio as amostras R1A e R3A (Figura 3) apresentaram um número satisfatório de isolados positivos após incubação (Tabela 1). Já as amostras R2A e R4A, apesar de crescerem no meio sólido após 24 horas, não produziram colônias que apresentassem redução de sulfato após uma semana em incubação. Para resolver esta questão estendeu-se o tempo de incubação das amostras após o espalhamento em placa, conforme proposto por Cheung e Gu (2003). Com este tempo maior conseguiu-se isolados com capacidade de redução de sulfato destas amostras (Tabela 4.1), mas como os isolados obtidos nas amostras R1A e R3A apresentaram características interessantes quanto ao rendimento da redução de sulfato (Figura 4.2) escolheu-se continuar os experimentos com os mesmos e estocar os isolados das amostras R2A e R4A para trabalhos laboratoriais futuros.



Figura 4.2: Isolados de BRS das amostras R1A e R3A apresentando rendimento diferenciado na redução de sulfato em meio Postgate C após uma semana de incubação à 32 °C em anaerobiose, o primeiro tubo (da esquerda para a direita) demonstra um controle negativo.

4.3 Caracterização Morfológica dos Isolados de BRS

Foi executada a caracterização morfológica dos isolados das amostras R1A e R3A, segundo a metodologia citada. Os resultados obtidos em relação a observação macroscópica das colônias podem ser observados no quadro 4.1 que demonstra pouca variabilidade entre os mesmos.

Quadro 4.1: Características das colônias das linhagens isoladas observadas em meio Postgate C sólido.

AMOSTRA - R1A			
Isolado	Características	Isolado	Características
01	Pequenas e esbranquiçadas	07	Pequenas e esbranquiçadas
02	Pequenas, esbranquiçadas e levemente transparentes	08	Pequenas e esbranquiçadas
03	Pequenas e esbranquiçadas	09	Pequenas e esbranquiçadas
04	Médias e esbranquiçadas	10	Pequenas e esbranquiçadas
05	Pequenas e esbranquiçadas	11	Pequenas e esbranquiçadas
06	Médias e esbranquiçadas	12	Médias e esbranquiçadas
AMOSTRA - R3A			
Isolado	Características	Isolado	Características
01	Pequenas e esbranquiçadas	08	Pequenas e esbranquiçadas
02	Pequenas e esbranquiçadas	09	Pequenas e esbranquiçadas
03	Pequenas e esbranquiçadas	10	Pequenas e esbranquiçadas
04	Pequenas e esbranquiçadas	11	Pequenas e esbranquiçadas
05	Pequenas e esbranquiçadas	12	Pequenas e esbranquiçadas
06	Pequenas e esbranquiçadas	13	Pequenas e esbranquiçadas
07	Pequenas e esbranquiçadas	14	Pequenas e esbranquiçadas

4.3.1 Morfologia ao Microscópio Ótico (M.O.)

Após a observação macroscópica foi executada a observação ao M.O. dos isolados. Como pode ser visto no quadro 4.2, esta análise apresentou pouca variação entre os isolados da amostra R1A, sendo que os isolados da amostra R3A foram mais diversos morfolologicamente. De qualquer forma os resultados quanto à coloração de Gram e forma das células são dados muito importantes para a taxonomia dos isolados (RABUS et al., 2006).

Quadro 4.2: Características morfológicas ao M.O. das linhagens isoladas após técnica de coloração de Gram.

AMOSTRA - R1A				
Isolado	Forma	Arranjo	GRAM	Esporos
01	Bastonetes	Estreptobacilos	Positivo	Positivo
02	Bastonetes	Estreptobacilos	Positivo	Positivo
03	Bastonetes	Estreptobacilos	Positivo	Positivo
04	Bastonetes	Estreptobacilos	Positivo	Positivo
05	Bastonetes	Estreptobacilos	Positivo	Positivo
06	Bastonetes	Estreptobacilos	Positivo	Positivo
07	Bastonetes	Estreptobacilos	Positivo	Positivo
08	Bastonetes	Estreptobacilos	Positivo	Positivo
09	Bastonetes	Estreptobacilos	Positivo	Positivo
10	Bastonetes	Estreptobacilos	Positivo	Positivo
11	Bastonetes	Estreptobacilos	Positivo	Positivo
12	Bastonetes	Estreptobacilos	Positivo	Positivo
AMOSTRA - R3A				
Isolado	Forma	Arranjo	GRAM	Esporos
01	Bastonete limão	Não possui	Negativo	Negativo
02	Bastonete oval	Não possui	Negativo	Negativo
03	Bastonete limão	Não possui	Negativo	Negativo
04	Bastonete limão	Não possui	Negativo	Negativo
05	Bastonete oval	Não possui	Negativo	Negativo
06	Bastonete oval	Não possui	Negativo	Negativo
07	Bastonete oval	Não possui	Negativo	Negativo
08	Bastonete limão	Não possui	Negativo	Negativo
09	Bastonete oval	Não possui	Negativo	Negativo
10	Bastonete limão	Não possui	Negativo	Negativo
11	Bastonete oval	Não possui	Negativo	Negativo
12	Bastonete limão	Não possui	Negativo	Negativo
13	Bastonete oval	Não possui	Negativo	Negativo
14	Bastonete oval	Não possui	Negativo	Negativo

4.3.2 Morfologia ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Após estes testes, alguns isolados selecionados foram conduzidos para análise em MEV no Microlab (DEGEO-UFOP). O critério de escolha destes isolados considerou suas características observadas ao microscópio óptico, as características coloniais, bem como os resultados de cada uma em testes bioquímicos preliminares. Com essa técnica, por oferecer maior poder de resolução, confirmou-se às formas celulares já observadas em microscopia ótica, bem como a aproximação de suas dimensões celulares.

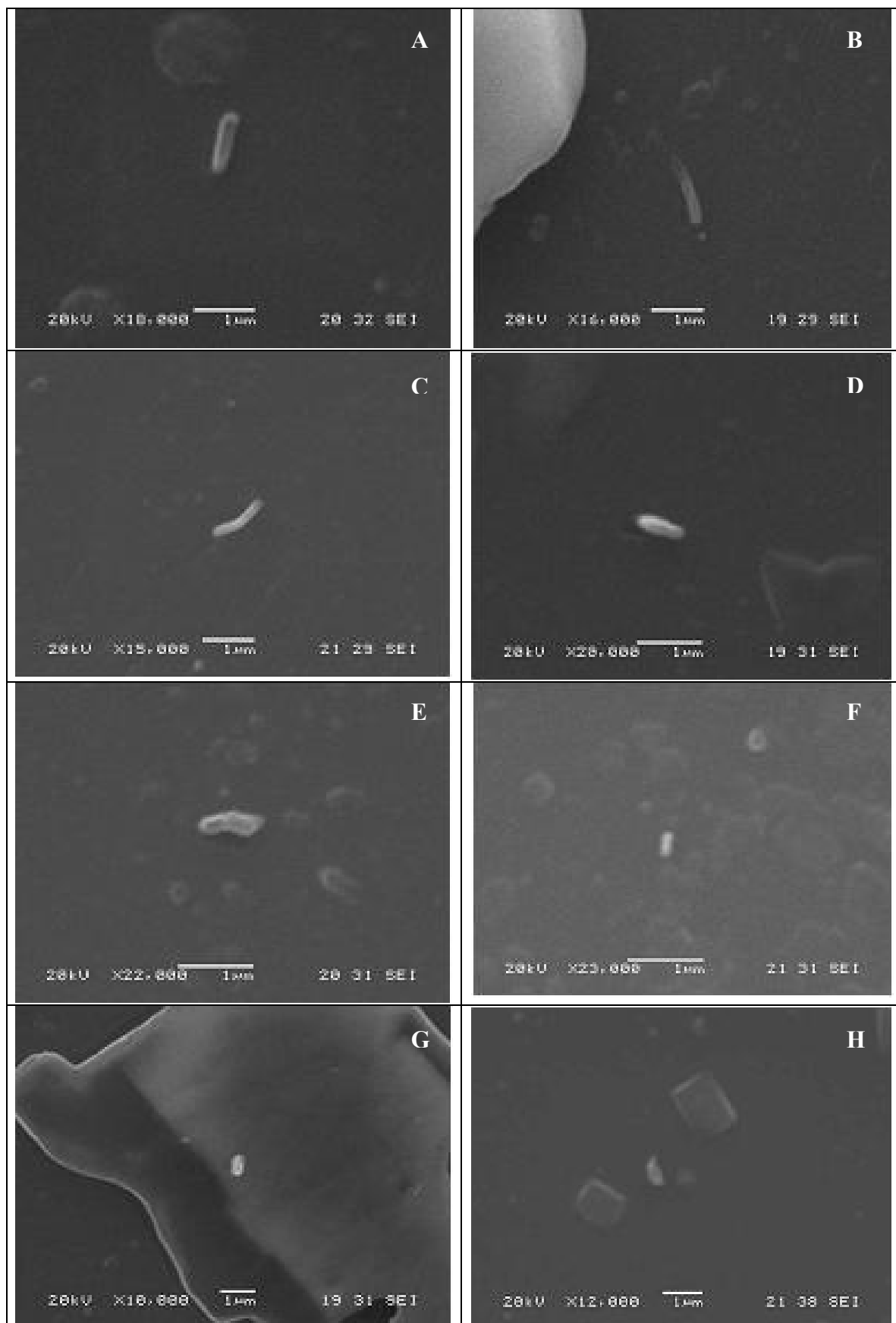


Figura 4.3: Isolados bacterianos ao microscópio eletrônico. **A:** R104A, **B:** R105A, **C:** R107A, **D:** R111A, **E:** R301A, **F:** R305A, **G:** R307A e **H:** R310A.

A visualização em MEV confirmou a morfologia ovóide do isolado R307A (Figura 4.3 - G), a morfologia semelhante a limão do isolado R310A (Figura 4.3 - E) além da morfologia bacilar dos isolados R104A, R105A, R107A e R111A (Figuras 4.3 - A à D). Por meio das observações em MEV, pode-se também comparar as dimensões celulares dos isolados com maior precisão do que o previamente observado em microscopia ótica conforme pode-se observar na figura 4.3, apresentada acima, os isolados R104A, R105A, R107A e R301A, respectivamente nas fotos A, B, C e E, têm dimensões aproximadamente de 1 µm enquanto os isolados R111A, R305A, R307A e R310A, têm dimensões menores do que 1 µm.

4.4 Caracterização Bioquímica dos Isolados de BRS

Os resultados dos testes metabólicos dos isolados de BRS estão apresentados nos quadros 4.3 e 4.4. Uma amostragem de um dos testes apresentados no quadro 4.4 pode ser observada na figura 4.4.

Quadro 4.3: Características metabólicas gerais dos isolados incubados em anaerobiose à 32 °C por 48 horas.

AMOSTRA - R1A									
Isolado	Glicose		Lact.	Citrato	Uréia	SIM			Motil.*
	Ácido	Gás				Indol	H ₂ S	Motil.#	
01	+	+	+	+	+	-	+	-	+
02	+	+	+	-	-	-	-	-	+
03	+	+	+	-	-	-	-	-	+
04	+	+	+	+	+	+	-	-	-
05	+	+	+	+	+	-	+	+	+
06	+	+	+	+	+	-	-	-	-
07	+	+	+	+	+	-	+	+	-
08	+	+	+	+	+	-	-	-	+
09	+	+	+	+	+	-	+	-	-
10	+	+	+	+	+	-	-	-	+
11	+	+	+	+	+	-	+	-	-
12	+	+	+	+	+	-	+	-	+

#: Meio semi-sólido escavada.

Lact.: Lactose.

H₂S: Ácido sulfídrico.

Motil.: Motilidade.

*: Confirmação pela técnica da gota pendente em lâmina

Quadro 4.3: Continuação.

AMOSTRA - R3A									
Isolado	Glicose		Lact.	Citrato	Uréia	SIM			Motil.*
	Ácido	Gás				Indol	H₂S	Motil.#	
01	+	+	+	+	+	-	-	-	-
02	+	+	+	+	+	-	+	+	-
03	+	+	+	+	+	-	+	+	-
04	+	+	+	+	+	-	+	-	-
05	+	+	+	+	+	-	+	+	-
06	+	+	+	+	+	-	+	+	-
07	+	+	+	+	+	-	+	-	-
08	+	+	+	+	+	-	+	-	-
09	+	+	+	+	+	-	+	+	-
10	+	+	+	+	+	-	+	+	-
11	+	+	+	+	+	-	+	-	-
12	+	+	+	+	+	-	+	+	-
13	+	+	+	+	+	-	-	-	-
14	+	+	+	+	+	-	+	-	-

#: Meio semi-sólido escavada.

*: Confirmação pela técnica da gota pendente em lâmina

Lact.: Lactose.

H₂S: Ácido sulfídrico.

Motil.: Motilidade.

Quadro 4.4: Diferenciação dos isolados quanto à atividade de catalase e desnitrificação. Teste de desnitrificação realizado após incubação á 32 °C em anaerobiose por uma semana em meio de cultura peptonado (GREENBERG; CLESCERI; EATON, 1992).

AMOSTRA R1A					
Isolado	Catalase	Desnitrificação	Isolado	Catalase	Desnitrificação
01	+	+	07	+	+
02	+	+	08	+	+
03	+	+	09	+	+
04	+	+	10	+	+
05	+	+	11	-	+
06	-	+	12	+	+
AMOSTRA R3A					
Isolado	Catalase	Desnitrificação	Isolado	Catalase	Desnitrificação
01	-	+	08	-	+
02	-	+	09	-	+
03	-	+	10	-	+
04	-	+	11	-	+
05	-	+	12	-	+
06	-	+	13	-	+
07	-	-	14	-	+



Figura 4.4: Teste de desnitrificação de dois dos isolados. O primeiro e o segundo tubos (da esquerda para a direita) representam, respectivamente, um controle negativo e um positivo utilizando *E. coli*.

Os testes metabólicos referentes à utilização de diferentes fontes de carbono pelos isolados apresentaram uma quantidade muito extensa de dados brutos, assim optou-se por apresentá-los por meio dos quadros A1 e A2 presentes na seção de anexos.

Os últimos dois testes bioquímicos realizados foram o de produção de glicose pelos isolados e o teste que indicaria a presença da enzima desulfovirdina. Ambos apresentaram resultados negativos para todos os isolados presentes no trabalho, mesmo ao se realizarem novas análises, sendo que, no caso do teste da presença de desulfovirdina, a nova análise foi feita com uma segunda metodologia mais tradicional proposta por POSTGATE (1979) que foi utilizada também como uma forma de confirmação dos resultados da primeira análise.

Como dito anteriormente, a leitura da glicose produzida pelos isolados seria feita por meio de uma curva de calibração confeccionada com soluções de concentração conhecida da mesma que foram submetidas ao método de glicose enzimática líquida. Embora os isolados não tenham apresentado nenhuma reação ao serem submetidos ao método, a curva de calibração apresentou bons resultados, o que comprovou a eficácia do método escolhido para esse fim, como pode ser observado na figura A4.

4.5 Identificação Taxonômica Presuntiva dos Isolados de BRS

Segundo indicado por Castro et al. (2000); Rabus et al. (2006), e Thauer et al. (2007) os resultados dos testes bioquímicos e morfológicos dos isolados permitiram a identificação de vários deles.

Os isolados referentes à amostra R1A: 01, 03, 05, 08, 10 e 12 mostraram grande probabilidade de pertencerem a dois dos três possíveis gêneros presentes na família Firmicutes: *Desulfotomaculum* e *Desulfosporosinus* já que apresentaram características comuns a este, tais como células Gram positivas formadoras de esporos com ou sem a capacidade de oxidar completamente o seu substrato orgânico, além de possuírem motilidade positiva. No entanto, os demais isolados apresentaram algumas características que destoam das descritas para os gêneros desta família: o isolado 02 apresentou teste negativo para a capacidade de utilizar etanol como fonte de carbono; os isolados 04 e 06 apresentaram teste negativo para a motilidade e os isolados 07, 09 e 11 apresentaram resultados negativos para ambos os testes citados. Assim não foi possível a sua classificação precisa em nenhum gênero, embora suas características morfológicas indiquem uma possível proximidade aos gêneros descritos na família Firmicutes.

Já os isolados referentes à amostra R3A não puderam, em sua maioria, ter um possível gênero determinado segundo os testes realizados. Assim, os isolados 01, 03, 04, 08, 10 e 12, demonstraram uma possível ligação ao gênero *Desulfobulbus*, uma vez que apresentavam uma morfologia de bastonetes curtos em forma de limão que é muito característica a este gênero, no entanto, algumas de suas características bioquímicas como a capacidade de utilizar acetato como fonte de carbono destoam deste grupo, o que não permitiu a sua classificação precisa. Da mesma forma os isolados 02, 06 e 07 demonstraram muitas características em comum ao gênero *Desulfacinum*, como a sua forma oval e a capacidade de utilizar compostos como o acetato e o lactato como fontes de carbono para biossínteses, porém, como não podem utilizar o etanol em seu metabolismo não podem ser encaixadas perfeitamente neste grupo. Por fim, os isolados 05, 09, 11, 13 e 14 foram os únicos que demonstraram características que corresponderam a um gênero em particular: o *Desulfacinum*. Embora nenhum dos outros isolados tenham tido um possível gênero identificado, é muito possível que eles tenham uma proximidade maior a algum

gênero da família Desulfobulbaceae, uma vez que demonstraram características muito semelhantes aos dois gêneros citados que são descritos nesta família.

4.6 Escolha de Cepas para Testes Fisiológicos

Os testes realizados para escolha das cepas a serem utilizadas nos experimentos de cinética estão listados nas Tabelas A1, A2 e A3.

Após a observação dos resultados destes testes optou-se por selecionar os isolados levando-se em conta as seguintes características: os que apresentaram menor número de células quando foi verificada a redução total do sulfato, indicando um maior rendimento por célula; aqueles que reduziram completamente o sulfato em um espaço de tempo mais curto, também buscando melhor rendimento, e, por fim, os isolados que reuniram estas duas características no maior número de diferentes valores de pH, demonstrando melhor maleabilidade a esta mudança de ambiente.

Com estes parâmetros em mente os isolados R102A, R106A, R112A, R304A, R307A e R313A foram definidas como as que seriam utilizadas nos experimentos seguintes.

4.7 Curva de Crescimento e Tempo de Geração dos Isolados

A tabela 4.2 apresenta os resultados obtidos no experimento de determinação da curva de crescimento dos isolados, sendo as mesmas representadas na figura 4.5

Tabela 4.2: Valores da absorbância dos isolados de BRS ao longo do tempo em cultivo controlado.

Tempo (Dias)	Isolados					
	R102A	R106A	R112A	R304A	R307A	R313A
0	0,005	0,0025	0,005	0,0025	0,0075	0,0025
2	0,455	0,285	0,245	0,25	0,245	0,2125
4	0,3475	0,3175	0,37	0,35	0,35	0,365
6	0,305	0,175	0,24	0,2325	0,23	0,215
8	0,2625	0,12	0,125	0,1125	0,145	0,14
10	0,245	0,11	0,095	0,1	0,11	0,105

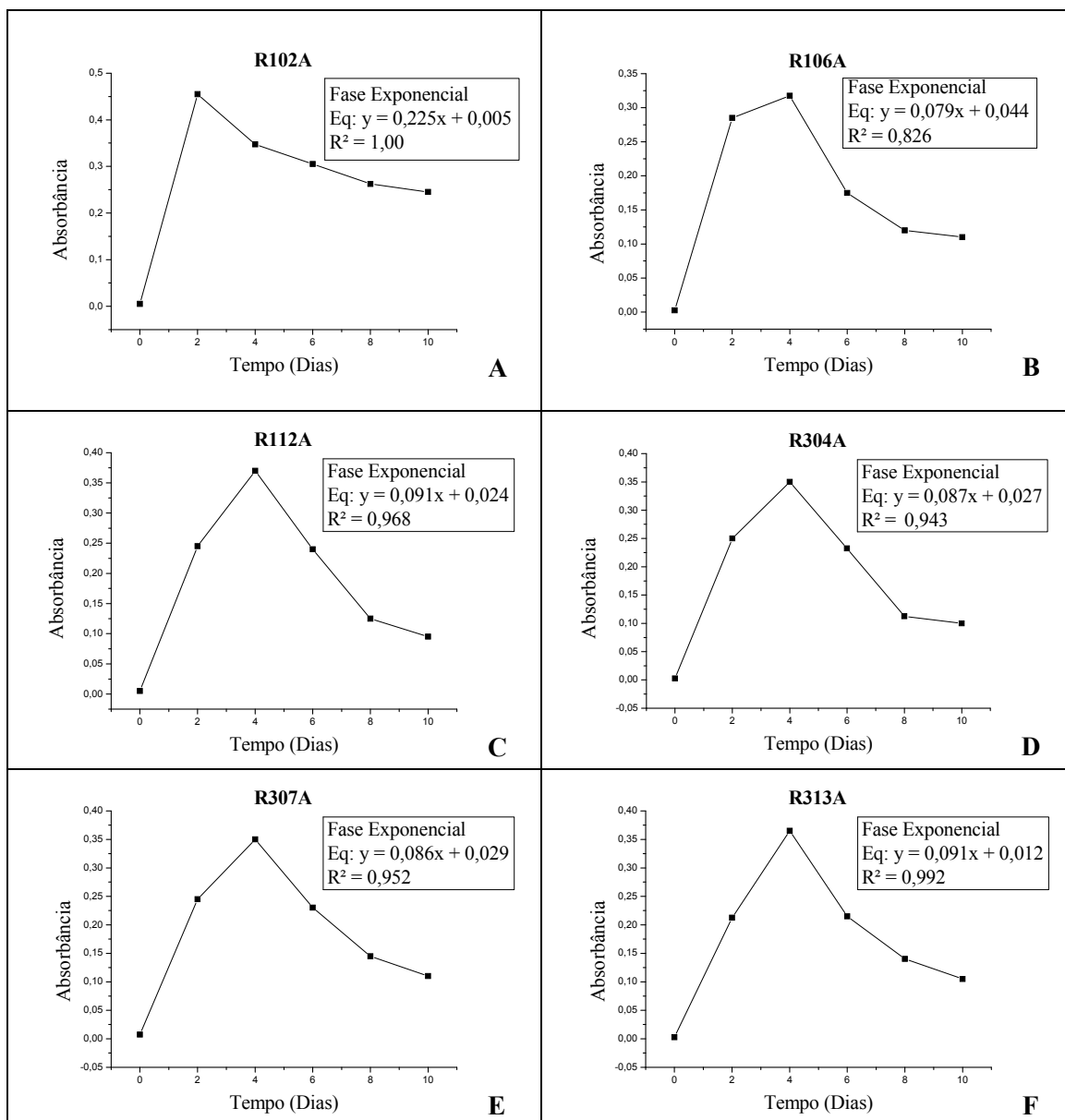


Figura 4.5: Curvas de crescimento dos isolados e equação de sua fase exponencial.

Como pode ser observado na figura 4.5, os isolados apresentaram algumas similaridades em suas curvas de crescimento, pode ser observado que, por exemplo, com exceção do isolado R102A (Fig. 4.5 – A), cujo período de crescimento exponencial se situou entre os dias 0 e 2; todos os isolados apresentaram seu crescimento exponencial situado entre os dias 0 e 4. Além disso, os isolados não apresentaram uma fase estacionária em seu crescimento, tendo entrado em uma fase de decaimento quase que automaticamente após o seu rápido crescimento exponencial.

Mesmo com estas similaridades observam-se valores distintos no coeficiente angular das retas geradas e, mesmo que alguns valores de R^2 não tenham sido tão altos como seria ideal, pode-se ter uma boa idéia do tempo de geração dos isolados por meio

deles. Assim, o isolado com o crescimento mais rápido é o R102A cujo Tg é 3,08 dias, sendo que o isolado de crescimento mais lento é o R106A com o Tg de 8,77 dias. Os outros isolados apresentaram tempo de geração variáveis: 7,61 dias para os isolados R112A e R313A; 7,96 dias para o isolado R304A, e 8,06 dias para o isolado R307A.

4.8 Quantificação do Consumo de Sulfato e Produção de Sulfeto pelos Isolados

Como dito anteriormente, para a determinação destes dados foram utilizadas curvas padrões como as confeccionadas para o experimento da quantificação de glicose. As curvas padrão de sulfato e sulfeto podem ser observadas nas figuras A2 e A3, respectivamente.

Assim, a tabela 4.3 mostra os resultados referentes às leituras de sulfato e sulfeto de cada um dos isolados que em seguida são comparadas por meio das figuras 4.6 à 4.11.

Tabela 4.3: Valores calculados para a o consumo de sulfato e produção de sulfeto para os isolados de BRS.

Tempo (Dias)	Isolados R1A					
	R102A		R106A		R112A	
	Sulfato (g/L)	Sulfeto (mg/L)	Sulfato (g/L)	Sulfeto (mg/L)	Sulfato (g/L)	Sulfeto (mg/L)
0	3,6	0,14	3,09	2,23	3,09	1,18
2	3,33	182,69	3,06	5,47	3,09	2,23
4	2,59	185,83	2,08	154,45	3,11	16,35
6	2,59	150,26	1,82	127,25	2,82	72,84
8	2,58	118,88	1,87	112,60	2,60	135,62
10	2,61	100,05	1,82	179,56	2,62	154,45
12	2,57	91,68	1,84	158,63	2,57	196,29
14	2,59	146,08	1,91	133,52	2,62	137,71
16	2,60	167,00	1,79	183,74	2,57	158,63
18	1,69	397,16	1,35	535,26	1,61	459,93

Tabela 4.3: Continuação.

Tempo (Dias)	Isolados R3A					
	R304A		R307A		R313A	
	Sulfato (g/L)	Sulfeto (mg/L)	Sulfato (g/L)	Sulfeto (mg/L)	Sulfato (g/L)	Sulfeto (mg/L)
0	3,23	1,70	3,23	2,23	3,37	2,75
2	3,18	1,70	3,17	2,23	3,09	18,44
4	3,09	3,80	2,94	36,75	2,94	125,15
6	2,79	39,37	2,85	48,26	2,62	146,08
8	2,66	111,55	2,60	110,51	2,60	171,19
10	2,58	137,71	2,56	125,15	2,58	154,45
12	2,60	198,39	2,58	146,08	2,55	156,54
14	2,62	187,93	2,68	150,26	2,60	162,82
16	2,55	208,85	2,54	129,34	2,57	213,03
18	1,35	476,67	1,82	259,07	1,67	334,39

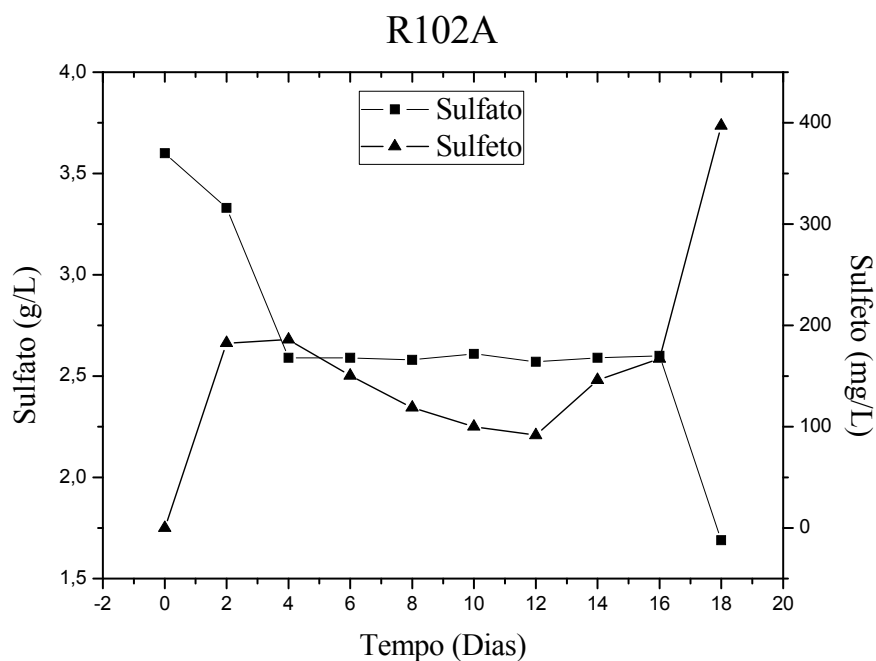


Figura 4.6: Valores das concentrações de sulfato e sulfeto do isolado R102A em crescimento controlado.

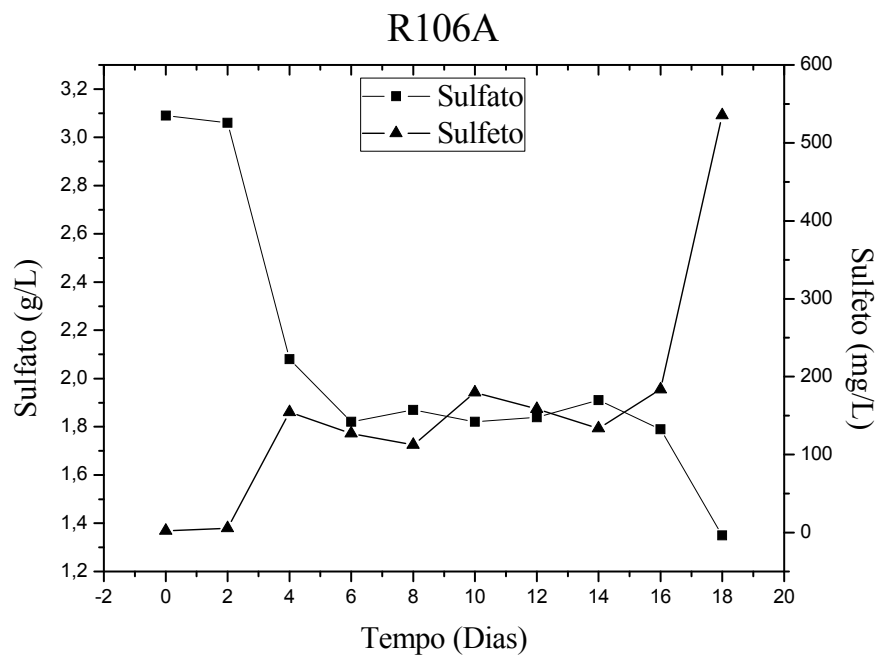


Figura 4.7: Valores das concentrações de sulfato e sulfeto do isolado R106A em crescimento controlado.

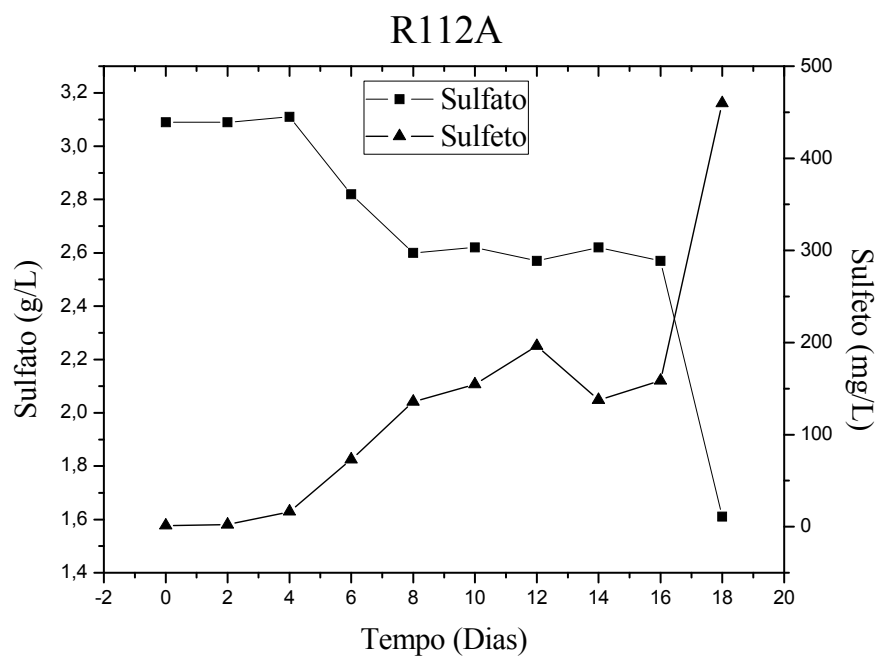


Figura 4.8: Valores das concentrações de sulfato e sulfeto do isolado R112A em crescimento controlado.

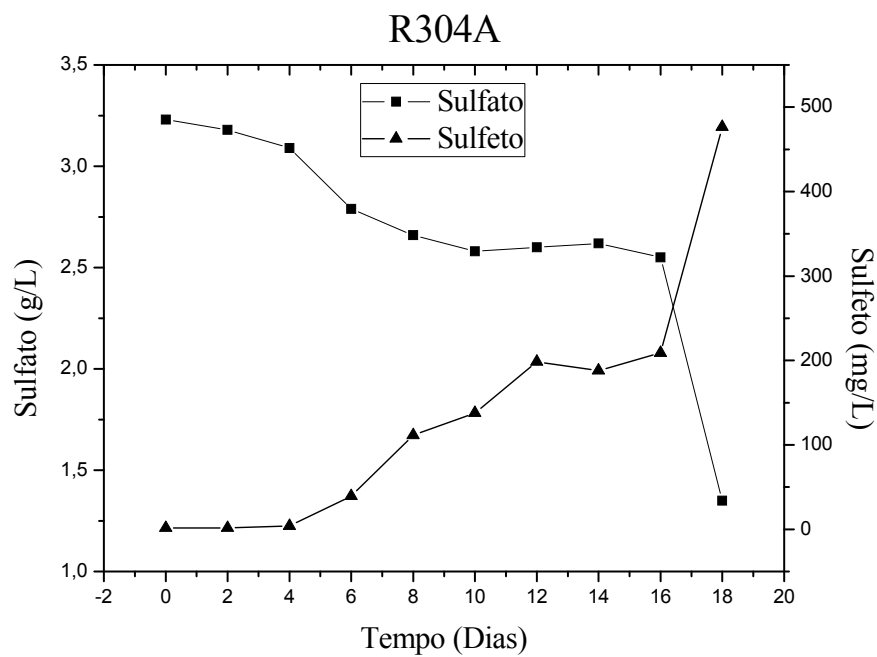


Figura 4.9: Valores das concentrações de sulfato e sulfeto do isolado R304A em crescimento controlado.

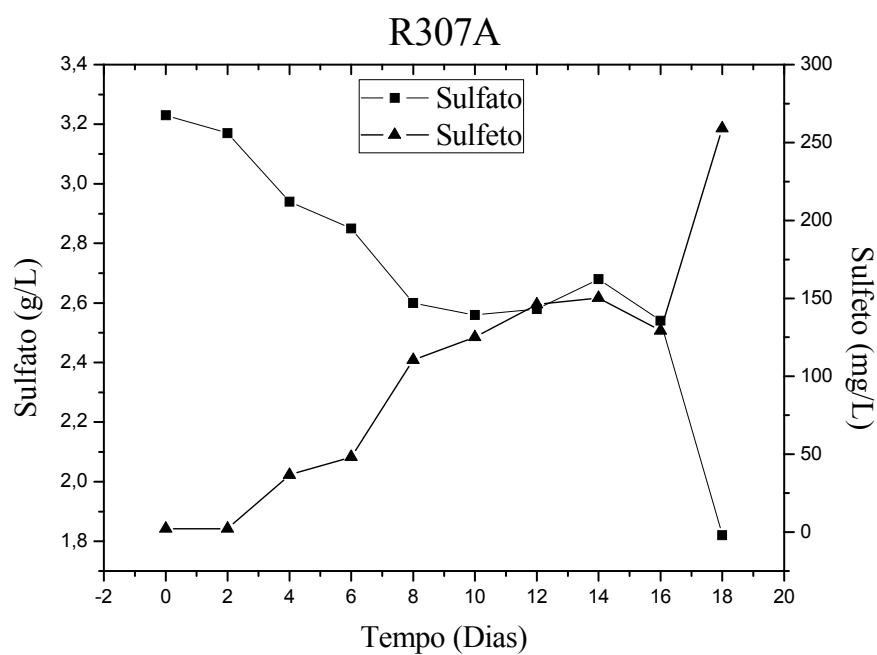


Figura 4.10: Valores das concentrações de sulfato e sulfeto do isolado R307A em crescimento controlado.

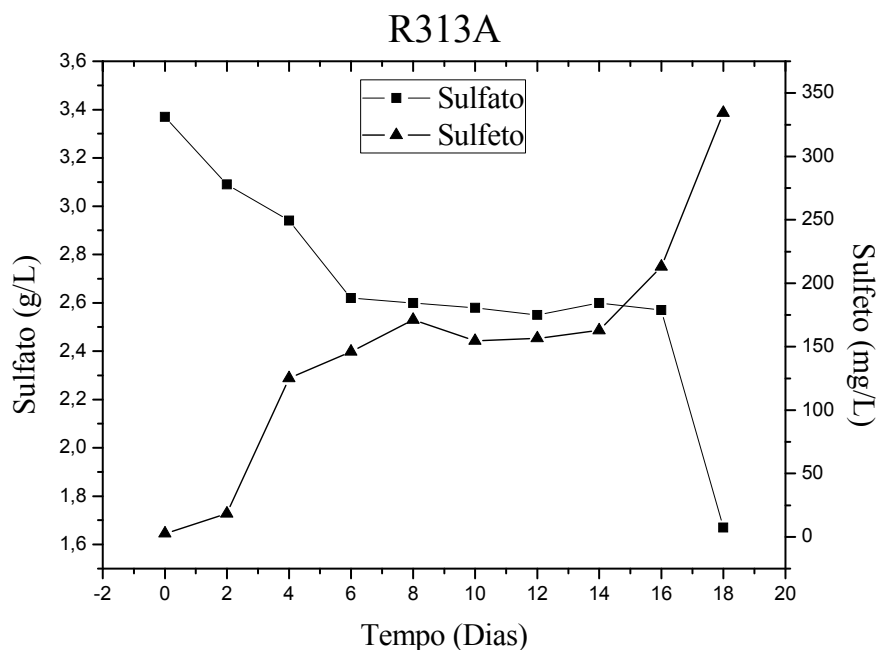


Figura 4.11: Valores das concentrações de sulfato e sulfeto do isolado R313A em crescimento controlado.

Pela visualização das figuras observa-se que o maior consumo de sulfato foi determinado no isolado R304A, onde nota-se uma diminuição de 58,2% em relação às leituras inicial e final do mesmo; sendo que o isolado R106A também conseguiu um alto consumo de sulfato de 56,31% seguido pelos isolados R102A (53,05%), R313A (50,45%), R112A (47,9%) e, por fim, pelo isolado R307A com a menor taxa de consumo (43,65%).

Observa-se assim que os isolados R106A e R304A também foram os que mais produziram sulfeto, tendo sido registradas concentrações de sulfeto finais de 535,26 mg/L e 476,67 mg/L para os dois respectivamente. Como esperado o isolado R307A apresentou a menor concentração final de sulfeto (259,07 mg/L) concomitante ao seu baixo consumo total de sulfato em relação às de maior consumo.

Uma última observação à salientar é o fato de em todos os isolados incubados a última leitura apresentar um pico tanto de consumo de sulfato quanto de produção de sulfeto, isso ocorreu porque como as leituras das amostras se apresentaram sem grandes modificações após um curto espaço de tempo, ou seja, tanto o consumo de sulfato quanto a produção de sulfeto não apresentavam modificações, tendendo assim a uma estabilidade, optou-se por adicionar mais lactato ao meio para determinar se a fonte de energia das bactérias havia se esgotado. Isto foi feito após a oitava leitura em todos os enriquecimentos e, como após este procedimento as leituras voltaram a apresentar resultados positivos para

o consumo de sulfato e produção de sulfeto, se pode afirmar que as bactérias estavam com o metabolismo em pausa devido à falta de uma fonte de carbono para suas biossínteses.

Assim, levando-se em consideração que a quantidade de lactato de sódio presente no meio no início do experimento era de 8 g/L e que a de sulfato era em média de 3,27 g/L, a média da concentração de sulfato presente no meio quando as bactérias pararam a sua biossíntese indica quanto do mesmo foi utilizado em função do lactato de sódio disponível. Como a concentração de sulfato média dos meios neste período estacionário foi de 2,60 g/L, pode-se inferir que em cada litro de meio de cultivo as bactérias utilizaram 8 g de lactato de sódio para consumir 0,67 g de sulfeto, ou seja, 0,1 mols de lactato foi utilizado no consumo de 0,007 mols de sulfato. O único resultado que foi discrepante ocorreu no isolado R106A onde a cultura atingiu estabilidade quando a concentração de sulfato no meio chegou em média à 1,86 g/L, mas como a concentração de lactato de sódio no meio era a mesma, pode-se inferir que este isolado utiliza, para cada litro de meio, a mesma quantidade de lactato que os outros para consumir uma maior quantia de sulfato, ou seja, para cada 8 g de lactato de sódio utilizados há um consumo de 1,41 g de sulfato, o que em mols seria 0,1 mols de lactato utilizado para cada 0,015 mols de sulfato consumido.

Assim, este resultado indica que o isolado R106A provavelmente possui um melhor rendimento de consumo de lactato em função do consumo de sulfato, embora testes de concentração de lactato no meio não puderam ser realizados para confirmar tal afirmação.

5 DISCUSSÃO

Á semelhança do que já foi relatado por outros pesquisadores (CHEUNG e GU, 2005 e WIERINGA et al., 2000), na presente investigação detectou-se linhagens de BRS com diferentes perfis metabólicos indicando, possivelmente, diferentes espécies. Esta riqueza de grupos taxonômicos em um mesmo nicho indica a provável interação metabólica destas espécies em sistemas de consórcios como já detectado por Robertson et al. (2000). A obtenção de isolados apenas nas amostras de solo, provavelmente, ocorreu porque na água as células bacterianas encontram-se muito diluídas e, além disso, nesses locais os nutrientes são mais escassos. Bem diferente do sedimento onde há maior abundância de nutrientes.

A capacidade de reduzir o sulfato revelada pelas linhagens isoladas indica que as mesmas possuem potencial de uso na lixiviação de metais e remediação de locais contaminados o que justifica a continuação do seu estudo que é de grande valia pela abrangência em questões ambientais tal como indicado por Huisman et al. (2006); Azabou et al. (2005); Cheung e Gu (2005); Tebo e Obratsova (1998), e Webb et al. (1998). Ainda sobre esta questão, os resultados, obtidos no presente trabalho referentes à utilização de diversos compostos como fontes de carbono e a redução de sulfato na presença dos mesmos, assim como a capacidade de crescimento em diferentes pH's e possibilidade de realizar metabolismos variáveis (desnitrificação), indica que os isolados podem ser usados nos mais diferentes tipos de despejos, visando a sua inativação e recuperação; pois, as suas exigências nutricionais e ambientais são muito variáveis podendo assim eliminar os mais diversos contaminantes conforme evidenciado por Robertson et al. (2000).

Dentre os resultados dos testes realizados, no presente trabalho, destaca-se que a maioria dos isolados produziu gás apenas a partir de glicose ou lactose como única fonte de carbono e nessa condição nenhum reduziu sulfato. Isso se deve, provavelmente, a maior complexidade molecular da glicose e lactose em relação aos demais substratos utilizados como fontes de carbono que foram acetato, lactato, etanol, acetona, butirato e propionato facilitando, assim, preferencialmente a via fermentativa em relação às vias usuais para a redução de sulfato. Entretanto, alguns isolados da amostra R1A utilizaram lactose concomitantemente à redução de sulfato significando, assim, a possível utilização de outras vias. Os isolados que apresentaram testes negativos tanto na redução de sulfato quanto na produção de gás para as diferentes fontes de carbono são, provavelmente incapazes de usá-

las para biossínteses. O fato de nenhum teste ter apresentado a redução de sulfato ligada à produção de gás demonstra que nenhum dos isolados é capaz de oxidar completamente o seu substrato à CO₂ por meio desta via. Além dos substratos supracitados, o benzeno também foi testado como única fonte de carbono, porém, nenhum isolado foi capaz de degradá-lo, mas isso já poderia ser esperado, considerando que alguns autores demonstraram que a degradação bacteriana do benzeno por uma única espécie é rara, sendo observada apenas pela interação de mais de uma espécie em consórcio conforme mostrado por Robertson et al. (2000).

No presente trabalho, algumas linhagens de BRS, a semelhança de outras investigações (WIERINGA et al., 2000), apresentaram atividade de catalase positiva indicando aerotolerância, bem como, também, a exemplo de outros trabalhos, foram capazes de realizar desnitrificação, mostrando assim a possibilidade de utilizar o nitrato, além do sulfato como aceptor final de elétrons, na respiração anaeróbia. Dessa forma os referidos grupos taxonômicos mostram maior poder de adaptação em diferentes nichos ecológicos e chance de participação em muitos ciclos naturais além do ciclo do enxofre (CHEUNG E GU, 2003; LLOYD et al., 2000 e TEBO E OBRAZTSOVA, 1998). A presença da enzima catalase apenas nos isolados da amostra R1A mostra que, assim como a capacidade de esporulação comum das bactérias Gram positivas, este grupo possui outras adaptações ambientais interessantes.

Para confirmação da morfologia e tamanho celular das linhagens isoladas a fim de sua classificação taxonômica estas características foram observadas em Microscopia Eletrônica de Varredura que oferecem maior poder de resolução e, portanto maior detalhamento de estruturas. A referida técnica serviu também para comparar as dimensões celulares dos isolados com maior precisão do que o previamente observado em microscopia ótica, informação esta importante na confirmação da diversidade taxonômica dos isolados (GOLDSTEIN et al., 2003).

Embora a identificação de alguns gêneros e espécies em particular não tenha sido totalmente elucidada as diversidades metabólicas e morfológicas identificadas nos testes realizados indicaram que os isolados podem pertencer a diferentes linhagens de BRS.

Pertencendo aos grupos taxonômicos identificados foram presumidos quatro gêneros, a saber, *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus*, *Desulfobulbus* e *Desulfacinum*. Dentre estes, *Desulfotomaculum* e *Desulfosporosinus* são alguns dos gêneros mais citados na literatura, o que ocorre possivelmente pela sua ampla distribuição explicada por maior estabilidade no ambiente devido a sua capacidade de esporulação (STACKEBRANDT et

al., 1997), além disso, é proposto para estes gêneros uma nova divisão segundo técnicas moleculares (ROBERTSON et al., 2000 e STACKEBRANDT et al., 1997). A elucidação da taxonomia desses grupos, bem como maior conhecimento de seus processos metabólicos são fundamentais para o seu adequado manejo e aplicações futuras, conforme preconizado por Cheung e Gu (2005), entre outros.

Em relação á cinética dos isolados, pode-se inferir o tempo de geração, consumo de sulfato e produção de sulfeto para todos os isolados segundo os testes turbidimétricos e colorimétricos o que levou a definir quais possuem características interessantes para processos industriais.

Assim, embora o isolado R102A tenha apresentado um tempo de geração menor, levando assim á um crescimento mais rápido o mesmo não consumiu uma quantidade de sulfato tão grande quanto à consumida pelos isolados R106A e R304A os quais apresentaram também uma maior produção de sulfeto. Assim pode-se inferir que possivelmente o rendimento destes isolados seja maior ao se considerar a capacidade de suas células em realizar biossínteses. Além disso, o isolado R106A apresentou um provável melhor rendimento de consumo de lactato em função do consumo de sulfeto, o que pode torná-lo muito interessante para processos industriais, já que pode produzir mais sulfeto com menor quantidade de fonte energética.

6 CONCLUSÕES

O trabalho executado conduziu às seguintes conclusões:

1. O local investigado parece ser uma área de considerável riqueza microbiana visto o número de isolamentos bacterianos por volume de amostras de sedimento analisadas;
2. A metodologia utilizada para isolamento de culturas puras de BRS mostrou-se apropriada considerando-se os resultados satisfatórios;
3. Os isolados de BRS evidenciaram grande capacidade de redução de sulfato e conseqüente precipitação de metais, no caso o ferro, isto demonstra possível utilização em processos de biolixiviação;
4. Os testes metabólicos e morfológicos realizados mostraram considerável diversidade de BRS nas duas amostras analisadas;
5. A variedade de substratos utilizáveis como também de vias metabólicas possíveis pelas linhagens isoladas demonstram uma grande gama de possíveis ambientes onde estas bactérias podem viver e os tipos de compostos que podem utilizar, podendo ser úteis em processos de biorremediação;
6. O presente trabalho possibilitou a identificação presuntiva de alguns grupos isolados tais como *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus*, *Desulfobulbus* e *Desulfacinum*;
7. O procedimento para escolha dos isolados de BRS que seriam utilizados nos testes cinéticos não só atingiu seu objetivo, como também proporcionou uma visão das capacidades de redução de sulfato e crescimento dos mesmos em diferentes condições de pH do ambiente;
8. O experimento visando determinar o tempo de geração dos isolados, possibilitou inferir a velocidade de crescimento dos mesmos, embora nem todos os dados obtidos tenham tido resultados satisfatórios.

9. Os experimentos para determinação da produção de sulfeto e concomitante consumo de sulfato se mostraram eficientes para os isolados pesquisados, já que se pode acompanhar as variações de concentração destes dois compostos durante todo o tempo de incubação, embora para obtenção de dados mais satisfatórios deva-se dar atenção á quantidade de fonte de energia disponível para os isolados;

10. Os isolados R106A e R103A apresentaram maiores taxas de consumo de sulfato e produção de sulfeto o que pode tornálos de grande valia para processos de biorremediação e biolixiviação.

7 PERSPECTIVAS

Considerando a potencial aplicabilidade dos grupos isolados no presente trabalho considera-se relevante o seu prosseguimento quanto à melhor elucidação da sua taxonomia pela utilização das técnicas de biologia molecular para futura criação de uma biblioteca gênica para melhor estudar os processos envolvidos no metabolismo da redução do sulfato. Além disso, tendo sido elucidados alguns aspectos de sua fisiologia, utilizá-los em testes de biorremediação e biolixiviação em condições práticas pode ser de grande valia.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZABOU, Samia; MECHICHI, Tahar; SAYADI, Sami. Sulfate reduction from phosphogypsum using a mixed culture of sulfate-reducing bacteria. *International Biodeterioration e Biodegradation*, Tunisia, v. 56, p. 236-242. 22 set. 2005.
- BADE, Karen; MANZ, Werner; SZEWZYK, Ulrich. Behavior of sulfate reducing bacteria under oligotrophic conditions and oxygen stress in particle-free systems related to drinking water. *Fems Microbiology Ecology*, n. 32, p.215-223, 28 mar. 2000.
- BAKER, Brett J. et al. Related assemblages of sulphate-reducing bacteria associated with ultradeep gold mines of South Africa and deep basalt aquifers of Washington State. *Environmental Microbiology*, Washington, v. 4, n. 5, p.267-277, [2003].
- BARTON, Larry L.; FAUQUE, Guy D.. Biochemistry, Physiology and Biotechnology of Sulfate-Reducing Bacteria. In: ALLAN, E. J. et al. *Advances in Applied Microbiology*. San Diego: Academic Press, 2009. Vol. 68, Cap. 2, p. 41-98.
- BRUNNER, Benjamin; BERNASCONI, Stefano M.. A revised isotope fractionation model for dissimilatory sulfate reduction in sulfate reducing bacteria. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, EUA, v. 69, n. 20, p.4759-4771, 08 abr. 2005.
- CARVALHO, I. S. (Ed.). *Paleontologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2004. 1 v., p. 861.
- CASTRO, Hector F.; WILLIAMS, Norris H.; OGRAM, Andrew. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *Fems Microbiology Ecology*, Gainesville, v. 31, p. 1-9. [2000].
- CHEUNG, K.H.; GU, Ji-Dong. Reduction of chromate (CrO₄²⁻) by an enrichment consortium and an isolate of marine sulfate-reducing bacteria. *Chemosphere*, Hong Kong, v. 52, p. 1523-1529. [2005].
- CIFUENTES, Ana et al. Diversity of *Bacteria* and *Archaea* in sulphate-reducing enrichment cultures inoculated from serial dilution of *Zostera noltii* rhizosphere samples. *Environmental Microbiology*, San Juan de Alicante, v. 9, n. 5, p.754-764, 19 mar. 2003.
- DETHLEFSEN, Les et al. Microbial ecology: Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends In Ecology And Evolution*, p. 517-523. 03 jul. 2006.
- DEVEREUX, Richard et al. Depth profile of sulfate-reducing bacterial ribosomal RNA and mercury methylation in an estuarine sediment. *Fems Microbiology Ecology*, p. 23-31. 19 jan. 1996.
- DINH, Hang T. et al. Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms. *Nature*, Bremen, v. 427, p. 829-832. 26 fev. 2004.

- GOLDSTEIN, J. et al. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. 3. ed. Boston: Kluwer Academic Plenum Publishers, 2003, p. 689.
- GREENBERG, Arnold E.; CLESCERI, Leonore S.; EATON, Andrew D.. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18. ed. Washington, D.c: Apha, 1992. 1 v, (paginação irregular).
- HOLT, J. G. et al. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994. 789 p.
- HUISMAN, Jacco L.; SCHOUTEN, Gerard; SCHULTZ, Carl. Biologically produced sulphide for purification of process streams, effluent treatment and recovery of metals in the metal and mining industry. Hydrometallurgy, Balk, v. 83, p. 106-113. 15 maio 2006.
- ISHII, Kousuke et al. An improved fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. Fems Microbiology Ecology, p. 203-212. 08 mar. 2004.
- JAVAHERDASHTI, R. et al. Microbiologically assisted stress corrosion cracking of carbon steel in mixed and pure cultures of sulfate reducing bacteria. International Biodeterioration e Biodegradation, Melbourne, pp. 9. [2006] (Article in press).
- KLEIKEMPER, Jutta et al. Sulfur isotope fractionation during growth of sulfate-reducing bacteria on various carbon sources. Geochimica Et Cosmochimica Acta, Schlieren, v. 68, n. 23, p.4891-4904, maio 2004.
- LANGENDIJK, P. S.; HANSEN, J. T. J.; HOEVEN, J. S. Van Der. Sulfate-reducing bacteria in association with human periodontitis. Journal Of Clinical Periodontology, Munksgaard, v. 27, p.943-950, 24 jan. 2000.
- LEMOS, Rita S. et al. The 'strict' anaerobe Desulfovibrio gigas contains a membrane-bound oxygen-reducing respiratory chain. Febs Letters, n. 496, p.40-43, 18 maio 2001.
- LI, Jian-hua et al. Seasonal changes in ribosomal RNA of sulfate-reducing bacteria and sulfate reducing activity in a freshwater lake sediment. Fems Microbiology Ecology, p. 31-39. 01 set. 1999.
- LIN, Chuzhao; RASKIN, Lutgarde; STAHL, David A.. Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. Fems Microbiology Ecology, p. 281-294. 14 dez. 1997.
- LIU, Xin-zhan et al. Abundance and community structure of sulfate reducing prokaryotes in a paddy soil of southern China under different fertilization regimes. Soil Biology & Biochemistry, p. 1-8. 2009.
- LLOYD, J. R. et al. Metal reduction by sulphate-reducing bacteria: physiological diversity and metal specificity. Hidrometallurgy, Edgbaston, v. 59, p.327-337, [2001].

- MADIGAN, M. T. et al. Brock – Biology of Microorganisms. 12. ed. San Francisco: Pearson Education, Inc. 2009. 1061 p.
- MILETTO, Marzia; BODELIER, Paul L.e.; LAANBROEK, Hendrikus J.. Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments. Journal Of Microbiological Methods, p. 103-111. 28 mar. 2007.
- MILOSTAN, Mark. Lab 6. Disponível em: <<http://www.alpenacc.edu/faculty/milostanm/lab6.htm>>. Acesso em: 11 out. 2006.
- MIRANDA-TELLO, Elizabeth et al. Petrotoga mexicana sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico. International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology, Great Britain, p. 169-174. 2004.
- MUYZER, Gerard; STAMS, Alfons J. M.. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. Nature Reviews: Microbiology, p.441-454, 01 jun. 2008.
- PEDUZZI, Sandro; TONOLLA, Mauro; HAHN, Dittmar. Isolation and characterization of aggregate-forming sulfate-reducing and purple sulfur bacteria from the chemocline of meromictic Lake Cadagno, Switzerland. Fems Microbiology Ecology, p. 29-37. 31 mar. 2003.
- POSTGATE, John R.. Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria. Bacteriological Reviews, Eua, p. 425-441. 01 dez. 1965.
- POSTGATE, John Raymond. The Sulphate-Reducing Bacteria. Great Britain: Cambridge University Press, 1979. 133 p.
- RABUS, Ralf; HANSEN, Theo A.; WIDDEL, Friedrich. Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. In: DWORKIN, Martin et al. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. 3. ed. New York: Springer Science+business Media, Llc, 2006. Vol. 2, Cap. 1.22, p. 659-768.
- RAMPINELLI, Letícia Roni. Isolamento de Bactérias Redutoras de Sulfato de Corpos d'Águas, Sedimentos e Precipitação de Ferro em Condição Anóxica. 2004. 21 f. Monografia (Bacharelado) - Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2004.
- ROBERTSON, W. J.; FRANZMANN, P. D.; MEE, B. J.. Spore-forming, *Desulfosporosinus*-like sulphate-reducing bacteria from a shallow aquifer contaminated with gasoline. Journal of Applied Microbiology, Western Australia, v. 88, p.248-259, [2000].
- SASS, Henrik; CYPIONKA, Heribert; BABENZIEN, Hans-dietrich. Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. Fems Microbiology Ecology, n. 22, p.245-255, 1997.

- SILVA, Silvana de Queiroz. Isolamento e Identificação de Bactérias Redutoras do Íon Sulfato (BRS) Oriundas de Campos de Exploração e Condução de Petróleo. 1999. 200 f. Dissertação (Mestre) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.
- STACKEBRANDT, Erko et al. Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: Evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. International Journal Of Systematic Bacteriology, Braunschweig, v. 47, n. 4, p.1134-1139, out. 1997.
- STUBNER, Stephan; MEUSER, Katja. Detection of Desulfotomaculum in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analyses. Fems Microbiology Ecology, p. 73-80. 21 set. 2000.
- TANG, Kimberley; BASKARAN, Vikrama; NEMATİ, Mehdi. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. Biochemical Engineering Journal, p. 73-94. 2009.
- TEBO, Bradley M.; OBRAZTSOVA, Anna Ya.. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. Fems Microbiology Letters, San Diego, v. 162, p.193-198, 13 mar. 1998.
- THAUER, Rudolf K.; STACKEBRANDT, Erko; HAMILTON, W. Allan. Energy metabolism and phylogenetic diversity of sulphate-reducing bacteria. In: BARTON, Larry L.; HAMILTON, W. Allan (Comp.). Sulphate-reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems. Eua: Cambridge University Press, 2007. Cap. 1, p. 1-38.
- WEBB, J. S.; MACGINNESS, S.; LAPPIN-SCOTT, H. M.. Metal removal by sulphate-reducing bacteria from natural and constructed wetlands. Journal Of Applied Microbiology, Manchester, v. 84, p.240-248, [1998].
- WIDDEL, Friedrich; BAK, Friedhelm. Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria. In: BALOWS, H. G. et al. (Comp.). The Prokaryotes. 2. ed. New York: Springer, 1992. Cap. 183, p. 3352-3378.
- WIERINGA, Elze B. A.; OVERMANN, Jörg; CYPIONKA, Heribert. Detection of abundant sulphate-reducing bacteria in marine oxic sediment layers by a combined cultivation and molecular approach. Environmental Microbiology, Bremen, v. 4, n. 2, p.417-427, 08 maio 2000.
- WILLOW, Mark A.; COHEN, Ronald R. H.. Bioremediation and Biodegradation: pH, Dissolved Oxygen, and Adsorption Effects on Metal Removal in Anaerobic Bioreactors. J. Environ. Qual., p. 1212-1221. 2003.
- XIN, Yao et al. Bioaugmented sulfate reduction using enriched anaerobic microflora in the presence of zero valent iron. Chemosphere, n. 73, p.1436-1441, 05 out. 2008.

- ZAGURY, G.j.; NECULITA, C.. PASSIVE TREATMENT OF ACID MINE DRAINAGE IN BIOREACTORS: SHORT REVIEW, APPLICATIONS, AND RESEARCH NEEDS. Ottawageo2007, Ottawa, p. 1439-1446. 2007.

9 ANEXOS

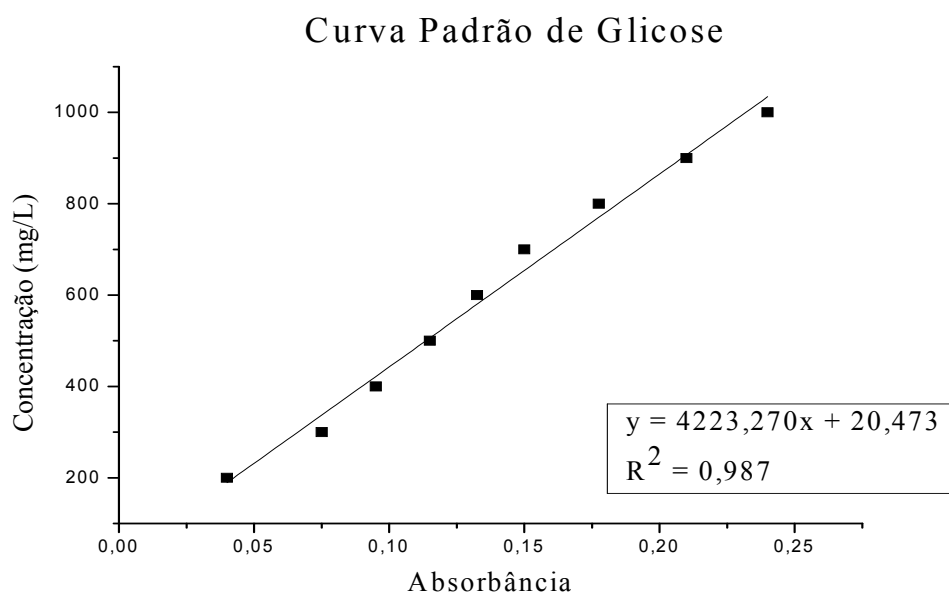


Figura A1: Curva padrão de glicose.

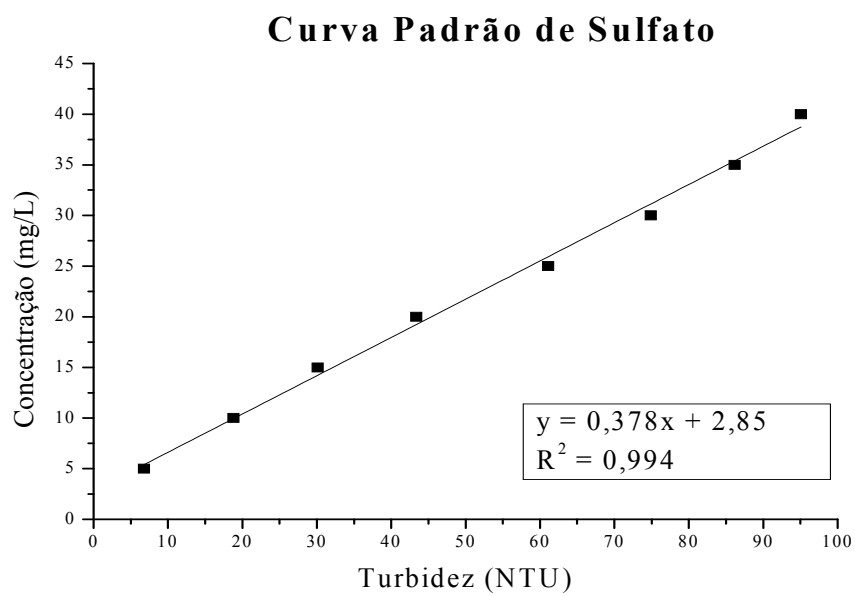


Figura A2: Curva padrão de sulfato.

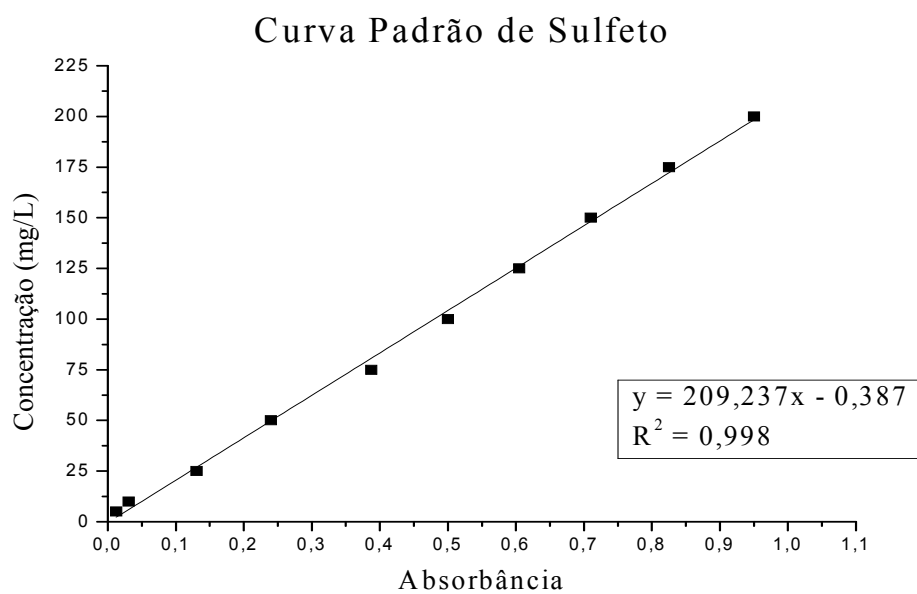


Figura A3: Curva padrão de sulfeto.

Quadro A1: Características dos isolados quanto à utilização de diferentes substratos como fonte de carbono. Incubação à 32 °C em anaerobiose por uma semana. Amostras R1A.

AMOSTRA R1A						
Isolado	Acetato		Lactato		Glicose	
	Gás	R. Sulf.	Gás	R. Sulf.	Gás	R. Sulf.
01	-	+	-	+	+	-
02	-	-	-	+	-	-
03	-	+	-	+	-	-
04	-	+	-	+	+	-
05	-	+	-	+	+	-
06	-	+	-	+	+	-
07	-	+	-	+	-	-
08	-	+	-	+	+	-
09	-	+	-	+	+	-
10	-	+	-	+	+	-
11	-	+	-	+	+	-
12	-	+	-	+	+	-
Isolado	Etanol		Acetona		Benzeno	
	Gás	R. Sulf.	Gás	R. Sulf.	Gás	R. Sulf.
01	-	+	-	+	-	-
02	-	-	-	+	-	-
03	-	+	-	+	-	-
04	-	+	-	+	-	-
05	-	+	-	+	-	-
06	-	+	-	+	-	-
07	-	-	-	+	-	-
08	-	+	-	+	-	-
09	-	-	-	+	-	-
10	-	+	-	-	-	-
11	-	-	-	+	-	-
12	-	+	-	+	-	-
Isolado	Lactose		Butirato		Propionato	
	Gás	R. Sulf.	Gás	R. Sulf.	Gás	R. Sulf.
01	-	+	-	+	-	+
02	-	-	-	+	-	+
03	-	+	-	+	-	+
04	+	-	-	+	-	+
05	-	+	-	+	-	+
06	-	+	-	+	-	+
07	-	-	-	+	-	-
08	-	-	-	+	-	+
09	+	-	-	+	-	+
10	-	+	-	+	-	+
11	-	-	-	+	-	+
12	-	+	-	+	-	+

R. Sulf.: Redução de Sulfato.

Quadro A2: Características dos isolados quanto à utilização de diferentes substratos como fonte de carbono. Incubação à 32 °C em anaerobiose por uma semana. Amostras R3A.

AMOSTRA R3A						
Isolado	Acetato		Lactato		Glicose	
	Gás	R. Sulf.	Gás	R. Sulf.	Gás	R. Sulf.
01	-	+	-	+	+	-
02	-	+	-	+	+	-
03	-	+	-	+	+	-
04	-	+	-	+	+	-
05	-	+	-	+	+	-
06	-	+	-	+	+	-
07	-	+	-	+	+	-
08	-	+	-	+	+	-
09	-	+	-	+	+	-
10	-	+	-	+	+	-
11	-	+	-	+	+	-
12	-	+	-	+	+	-
13	-	+	-	+	+	-
14	-	+	-	+	+	-
Isolado	Etanol		Acetona		Benzeno	
	Gás	R. Sulf.	Gás	R. Sulf.	Gás	R. Sulf.
01	-	-	-	-	-	-
02	-	-	-	-	-	-
03	-	+	-	-	-	-
04	-	+	-	-	-	-
05	-	+	-	+	-	-
06	-	-	-	+	-	-
07	-	-	-	+	-	-
08	-	+	-	-	-	-
09	-	+	-	+	-	-
10	-	+	-	-	-	-
11	-	+	-	+	-	-
12	-	-	-	+	-	-
13	-	+	-	+	-	-
14	-	+	-	+	-	-
Isolado	Lactose		Butirato		Propionato	
	Gás	R. Sulf.	Gás	R. Sulf.	Gás	R. Sulf.
01	+	-	-	+	-	+
02	+	-	-	+	-	+
03	+	-	-	+	-	-
04	+	-	-	+	-	+
05	+	-	-	+	-	+
06	+	-	-	+	-	+
07	+	-	-	+	-	-
08	+	-	-	+	-	+
09	+	-	-	+	-	+
10	+	-	-	+	-	+
11	+	-	-	+	-	+
12	+	-	-	+	-	+
13	+	-	-	+	-	+
14	+	-	-	+	-	+

R. Sulf.: Redução de Sulfato.

Tabela A1: Determinação do tempo de início de redução do sulfato pelos isolados em diferentes valores de pH.

Isolado	Tempo de Início de Redução (Horas)				
	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
R101A	96	36	240	36	36
R102A	48	36	36	24	36
R103A	48	36	36	84	36
R104A	36	36	24	24	36
R105A	36	36	24	36	36
R106A	84	60	36	48	84
R107A	84	60	48	60	60
R108A	60	36	24	24	36
R109A	156	36	156	36	24
R110A	60	60	156	36	24
R111A	60	36	24	36	24
R112A	60	36	36	36	36
R301A	84	120	24	12	24
R302A	36	36	24	12	36
R303A	36	156	36	36	84
R304A	60	36	24	12	36
R305A	48	36	24	72	36
R306A	96	72	24	24	36
R307A	36	156	24	60	36
R308A	84	120	24	12	36
R309A	156	48	36	24	84
R310A	72	36	24	12	36
R311A	96	48	24	36	36
R312A	84	36	36	12	48
R313A	156	36	240	24	36
R314A	60	48	36	12	36

Tabela A2: Determinação do tempo de redução completa de sulfato pelos isolados em diferentes valores de pH.

Amostra	Tempo de Redução Completa (Horas)				
	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
R101A	108	-	-	-	-
R102A	-	-	-	36	-
R103A	-	60	-	108	-
R104A	-	-	36	36	-
R105A	-	-	36	-	-
R106A	96	-	-	60	120
R107A	108	72	84	-	84
R108A	72	-	48	36	-
R109A	192	-	192	-	36
R110A	84	84	192	-	36
R111A	-	-	36	-	36
R112A	72	-	-	-	-
R301A	96	144	36	24	36
R302A	-	240	36	24	-
R303A	60	192	-	-	108
R304A	84	-	36	24	-
R305A	108	-	36	96	-
R306A	192	84	36	36	-
R307A	-	192	36	108	-
R308A	144	144	36	36	-
R309A	192	60	-	36	132
R310A	84	-	36	24	-
R311A	108	60	36	-	-
R312A	132	-	-	24	60
R313A	192	-	-	36	-
R314A	-	-	-	24	-

- : Indica um valor igual ao da tabela anterior, no caso destes isolados as leituras de início de redução já apresentaram uma redução completa do sulfato.

Tabela A3: Determinação do número de células em cada isolado após redução total do sulfato nos diferentes valores de pH testados.

Isolado	Número de Células por Mililitro de Amostra				
	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
R101A	4500	3000	2000	5500	19500
R102A	1500	8500	6000	1500	5500
R103A	3000	2000	3500	2000	7500
R104A	2000	7000	4500	13000	4000
R105A	4000	3500	7500	2500	3500
R106A	5500	1000	1500	1500	2000
R107A	11500	500	1500	1500	3500
R108A	3000	4000	5500	13500	9000
R109A	3000	7500	3000	4000	9500
R110A	500	12000	6500	3000	11500
R111A	4500	5500	1500	1500	4000
R112A	6000	2500	500	6000	2500
R301A	2500	4000	6500	6500	2000
R302A	6500	6000	2000	11000	3500
R303A	2500	2000	1000	6500	500
R304A	1500	2500	2500	9000	1000
R305A	3000	3500	5000	3000	2000
R306A	5000	5000	6000	1000	3500
R307A	5500	5000	3500	1500	2500
R308A	8000	6500	3500	10500	9000
R309A	1500	1500	1500	2000	2500
R310A	3500	7500	4500	13500	4000
R311A	3500	1000	3000	18000	3500
R312A	2500	17500	2000	5500	2500
R313A	2500	4000	2500	1000	6500
R314A	4000	1500	2000	6000	4000

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)