

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ELIS WATANABE NOGUEIRA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS ISOLADAS DO
RESÍDUO DE BAUXITA**

Poços de Caldas/MG
2015

ELIS WATANABE NOGUEIRA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS ISOLADAS DO
RESÍDUO DE BAUXITA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: tratamento de águas residuárias.

Orientador: Prof. Dr. Gunther Brucha.

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Elize Hayashi.

N778i Nogueira, Elis Watanabe.

Identificação molecular e caracterização de cepas isoladas do resíduo de bauxita / Elis Watanabe Nogueira. – Poços de Caldas, 2015.

78 f. -

Orientador: Gunther Brucha.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2015.

Bibliografia.

1. Resíduo de bauxita. 2. RNA Ribossômico 16S. 3. Bacilos Gram-Positivos. I. Brucha, Gunther. II. Título.

CDD: 628

ELIS WATANABE NOGUEIRA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS ISOLADAS DO
RESÍDUO DE BAUXITA**

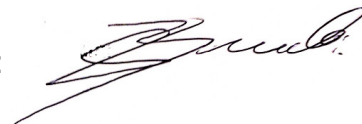
A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: tratamento de águas residuárias.

Aprovada em: 24 de Julho de 2015

Prof.^o. Dr. Gunther Brucha

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



Prof.^a Dr.^a Renata Piacentini Rodriguez

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



Prof.^a Dr.^a Cristine Chaves Barreto

Instituição: Universidade Católica de Brasília

Assinatura:



Dedico às pessoas que me apoiaram em especial aos meus pais, à Lais, à vovó Uena, Daniel e toda minha família.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas, em especial ao Campus de Poços de Caldas pela ótima oportunidade de cursar o mestrado.

Ao meu orientador Gunther Brucha, por me acolher quando estava totalmente desamparada, pelos ensinamentos, pela confiança adquirida nos últimos meses, por estar presente nos momentos de dúvida e por todo acompanhamento deste trabalho.

À co-orientadora Elize Hayashi, que contribuiu de todas as formas para que esse trabalho chegasse até aqui. Muito obrigada por todo tempo dedicado a me ensinar e me ajudar no laboratório.

Em especial aos meus pais, sem eles eu não teria chegado até aqui. Obrigada por todo investimento na vida acadêmica, tudo que faço é para tentar retribuir um dia todo esforço dedicado a mim e minha irmã.

Ao Daniel, meu noivo e amigo, por todo apoio, compreensão e incentivo nos últimos anos.

À minha irmã, que mesmo distante, sempre me incentiva e me dá confiança para continuar seguindo.

À família Nogueira e Watanabe, a melhor família que poderia ter, agradeço pelo incentivo e torcida.

À família Sarti Franco por me acolherem tão bem nesses últimos anos.

A todos os professores da Unifal, em especial à professora Luciana Bottezelli, Renata Rodriguez e Carolina Del Roveri, professoras que tenho enorme admiração e que em algum momento dessa trajetória me ajudaram muito.

Ao professor Cláudio e Renata pelas contribuições no exame de qualificação. Vocês me deram mais força para que eu chegasse à essa etapa.

À Luana que me ajudou muito, antes e depois de ingressarmos no mestrado, muito obrigada.

Aos colegas do programa PPGCEA pelo convívio durante as disciplinas.

À companheira de laboratório Karina e às vizinhas: Gabriela, Luana, Bianca, Mirabele e Marcela, pelas conversas e auxílios.

Aos técnicos do laboratório que ajudaram de alguma forma e sempre dispostos a contribuir para desenvolvimento desse trabalho, em especial ao Gustavo, Thalita, Aline e Marcos.

Às representantes do colegiado, em especial à Simone e Gabriela por todo o tempo dedicado às reuniões e por sempre manter os alunos bem informados.

À Kênia, secretária do programa PPGCEA, sempre tão educada e tão disposta a me ajudar com o sorriso no rosto, muito obrigada.

À Iraê e Thais por toda ajuda nos ensaios. Sem vocês as 28 horas de ensaio teriam sido ainda mais difíceis.

À técnica do Laboratório de Processos Biológicos- cromatografia, Maria Angela pelas análises cromatográficas e toda atenção dedicada.

Aos amigos de Capanema e Paragominas, pelas conversas e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais – FAPEMIG pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui e não foram citados. Muito obrigada.

RESUMO

O presente trabalho visou identificar e caracterizar três cepas, BRA1, BRA3 e BRA5, isoladas do resíduo de bauxita da região Sul de Minas Gerais. Foi realizado o seqüenciamento do gene 16S RNA ribossomal utilizando dois pares de *primers* em que foi possível seqüenciar 1300pb de cada cepa isolada. Testes bioquímicos e metabólicos complementares foram realizados a fim de caracterizar os isolados. Os resultados indicaram que a cepa BRA1 foi identificada com 99,7% de similaridade com *Bacillus cohnii* e caracterizada como: Gram-positiva; redutora de nitrato, catalase, oxidase e amilase positiva; faixa de crescimento entre pH 7 e 10; tolerante às concentrações de 0 a 10% de NaCl, e; faixa de temperatura de 20 a 40°C. A cepa BRA3 foi identificada com 99,7% de similaridade com *Bacillus pseudofirmus* e caracterizada como: Gram-positiva; catalase e amilase positiva; oxidase negativa e não redutora de nitrato; faixa de crescimento entre pH 7 e 10; tolerante às concentrações de 5 a 10% de NaCl, dependente do íon Na⁺ para crescimento, e; faixa de temperatura de 10 a 40°C. Com os resultados da técnica de seqüenciamento, a cepa BRA5 foi identificada com 99,7% de similaridade com *Bacillus clarkii* e *Bacillus polygoni*. Após testes bioquímicos e fisiológicos, a cepa BRA5 ficou mais próxima às características bioquímicas do *Bacillus clarkii*, caracterizada como: Gram-positiva; catalase e oxidase positiva, redutora de nitrato e amilase negativa; faixa de crescimento entre pH 8 e 10; tolerante às concentrações de 5 a 10% de NaCl, dependente do íon Na⁺ para crescimento, e; faixa de temperatura de 20 a 40°C. A utilização dos açúcares: glicose, frutose, sacarose e manitol pelas cepas foi positiva e os ácidos mais produzidos a partir das fontes de carbono foram os ácidos acético, isobutírico, isovalérico, entre outros. As cepas BRA1, BRA3 e BRA5 utilizando glicose como fonte de carbono foram capazes de diminuir o pH do meio de 10,5 para aproximadamente 9,3, 9,5 e 9, respectivamente. A identificação e caracterização dos isolados foram bem sucedidas e os resultados apresentados estão de acordo com os encontrados na literatura.

Palavras-chave: Resíduo de bauxita. Gene RNA ribossomal 16S. Bacilos alcalifílicos.

ABSTRACT

This study aimed to identify and characterize three strains BRA1, BRA3 and BRA5 isolated from bauxite residue in the Southern region of Minas Gerais. Sequencing of 16S ribosomal RNA gene was carried out using two pairs of primers, which allowed high quality sequencing of 1300pb from each isolated strain. Additional biochemical tests were conducted to characterize the strains. The results indicated that strain BRA1 was identified with 99.7% similarity with *B. cohnii* and characterized as: Gram-positive; positive for nitrate reduction, catalase, oxidase and amylase; growth range between pH 7 and 10; tolerant to concentrations of 0 to 10% NaCl, and; growth is observed between 20 and 40 °C. The strain BRA3 was identified with 99.7% similarity with *Bacillus pseudofirmus* and characterized as: Gram-positive; positive for catalase and amylase; negative for oxidase and nitrate reduction; growth range between pH 7 and 10; tolerant to concentrations of 5 to 10% NaCl, Na⁺ ion dependent for growth, and; growth is observed between 10 and 40 °C. In the results of the sequencing analysis, strain BRA5 was identified with 99.7% similarity with *Bacillus clarkii* and *Bacillus polygoni*. After biochemical and physiological tests, the strain BRA5 was closest to the biochemical characteristics of *Bacillus clarkii*, characterized as Gram-positive; positive for catalase and oxidase, non-nitrate reduction, and amylase; growth range between pH 8 and 10; tolerant to concentrations of 5 to 10% NaCl, Na⁺ ion dependent for growth, and; growth is observed between 20 and 40 °C. The use of sugars: glucose, fructose, sucrose and mannitol was positive and the higher amount of acids produced from the carbon sources were acetic, isobutyric, isovaleric, among others. Strains BRA1, BRA3 and BRA5 using glucose as a carbon source were able to decrease the medium pH 10.5 to approximately 9.3, 9.5 and 9, respectively. The identification and characterization of isolates were successful and the results presented are consistent with those found in the literature.

Keywords: Bauxite residue. 16S ribosomal RNA gene. Alkali bacilli.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Fluxograma experimental representativo das etapas do trabalho ..	29
Figura 2-	Fluxograma representativo das etapas da identificação molecular dos isolados	31
Figura 3-	Descrição dos pares de primers utilizados nas reações de PCR ..	32
Figura 4-	Crescimento das culturas inoculadas em meio de enriquecimento	38
Figura 5-	Culturas de isolamento em placas de Agar das colônias isoladas referentes às cepas BRA1, BRA2, BRA3, BRA4 e BRA5	40
Figura 6-	Imagem negativa do gel de agarose com produtos de PCR utilizando <i>primers</i> 27f/1401r	41
Figura 7-	Imagem negativa do gel de agarose com produtos de PCR utilizando <i>primers</i> 338f/1401r	42
Figura 8-	Árvore filogenética obtida com base na sequência do gene RNAr 16S	43
Figura 9-	Curva de crescimento das cepas isoladas	45
Figura 10-	Microscopia das colônias isoladas sob aerobiose, em lâminas de coloração Gram	47
Figura 11-	Curva de crescimento da cepa BRA1 nos diferentes pH's	49
Figura 12-	Curva de crescimento da cepa BRA3 nos diferentes pH's	51
Figura 13-	Curva de crescimento da cepa BRA5 nos diferentes pH's	53
Figura 14-	Curva de crescimento da cepa BRA1 nas diferentes fontes de carbono	56
Figura 15-	Curva de crescimento da cepa BRA3 nas diferentes fontes de carbono	57
Figura 16-	Curva de crescimento da cepa BRA5 nas diferentes fontes de carbono	58
Figura 17-	Esquema do processo de respiração e fermentação em vários microrganismos	62
Figura 18-	Crescimento populacional e alteração do pH do meio na presença de diferentes fontes de carbono em cultura da cepa BRA1	66
Figura 19-	Crescimento populacional e alteração do pH do meio na presença de diferentes fontes de carbono em cultura da cepa	

	BRA3.....	67
Figura 20-	Crescimento populacional e alteração do pH do meio na presença de diferentes fontes de carbono em cultura da cepa	
	BRA5.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Efeito do consórcio bacteriano após seis meses de inoculação nas propriedades físico-químicas do RB	22
Tabela 2-	pH intracelular de espécies de bacilos alcalifílicos em diferentes valores de pH externo.....	25
Tabela 3-	Regiões hipervariáveis do gene do RNA ribossomal 16S.....	27
Tabela 4-	Característica das colônias isoladas.....	39
Tabela 5-	Características das cepas BRA1, BRA3 e BRA5 comparando-as com bacilos de referência	46
Tabela 6-	Crescimento em diferentes fontes de carbono	56
Tabela 7-	Produção de ácidos orgânicos voláteis e não voláteis para a cepa BRA1	59
Tabela 8-	Produção de ácidos orgânicos voláteis e não voláteis para a cepa BRA3	61
Tabela 9-	Produção de ácidos orgânicos voláteis e não voláteis para a cepa BRA5	63
Tabela 10-	Resultado dos ensaios utilizando diferentes fontes de carbono para cepa BRA1 com densidade óptica, pH inicial e final e produção total de ácidos	66
Tabela 11-	Resultado dos ensaios utilizando diferentes fontes de carbono para cepa BRA3 com densidade óptica, pH inicial e final e produção total de ácidos	67
Tabela 12-	Resultado dos ensaios utilizando diferentes fontes de carbono para cepa BRA5 com densidade óptica, pH inicial e final e produção total de ácidos	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLEA	Cromatografia Líquida de alta eficiência
DNA	Ácido DesoxirriboNucleico
dNTP	DesoxirriboNucleotídeos Fosfatados
D.O	Densidade óptica
pb	pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RB	Resíduos de Bauxita
RNAr	Ácido RiboNucleico ribossomal
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Formas de disposição do resíduo	18
3.2	Reaproveitamento e reabilitação do resíduo de bauxita	19
3.3	Microrganismos alcalifílicos	23
3.4	Gene 16S do RNA ribossomal	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Enriquecimento das bactérias alcalifílicas aeróbias isoladas do resíduo de bauxita.....	30
4.1.1	Meios de cultura	30
4.2	Caracterização das colônias isoladas.....	31
4.3	Identificação molecular dos isolados.....	31
4.3.1	Extração de DNA	32
4.3.2	Amplificação do gene do RNAr 16S pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase	32
4.3.3	Sequenciamento e análise	33
4.4	Ensaio preliminar de Crescimento Bacteriano em meio de cultivo	34
4.5	Testes bioquímicos	34
4.6	Crescimento em diferentes pH	35
4.7	Tolerância a NaCl	36
4.8	Crescimento em diferentes temperaturas	36
4.9	Utilização de carboidratos	37
4.9.1	Determinação da produção de ácidos	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Caracterização das colônias isoladas	39
5.2	Identificação molecular dos isolados	41
5.2.1	Extração do DNA	41
5.2.2	Amplificação do RNAr 16S	41

5.2.3	Sequenciamento e análise	42
5.3	Ensaio preliminar de Crescimento Bacteriano em meio de cultivo	44
5.4	Testes bioquímicos e fisiológicos para identificação dos isolados	45
5.5	Utilização de carboidratos	55
5.5.1	Produção de ácidos	58
5.5.2	Relação do crescimento celular com o pH e a produção de ácidos nas diferentes fontes de carbono	65
6	CONCLUSÕES	71
7	RECOMENDAÇÕES	72
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

O processo Bayer para extração da alumina consiste na adição do hidróxido de sódio e cal à bauxita e no subsequente tratamento térmico desse material, formando um rejeito alcalino conhecido como lama vermelha. O resíduo de bauxita possui alta concentração de íons solúveis, pH entre 9 e 13, baixa concentração de carbono orgânico e de nutrientes disponíveis.

O Brasil ocupa lugar de destaque no cenário mundial na produção de bauxita e estima-se que para cada tonelada de alumina extraída, duas toneladas de lama vermelha são geradas. Devido às questões ambientais e ao elevado custo associado ao seu manejo e disposição há uma preocupação crescente na destinação adequada desse resíduo.

Estudos apontam o uso alternativo do resíduo de bauxita na indústria cerâmica, construção civil, recuperação de metais, entre outros. No Brasil, no entanto, devido às distâncias continentais e infraestrutura, não há uma logística viável no transporte do resíduo, e o aproveitamento do mesmo em outros setores da economia é inviabilizado devido ao baixo valor agregado e ao alto custo do transporte. Remediar a lama vermelha na própria área de disposição mostra-se como uma alternativa, sendo a biorremediação, utilizando as propriedades metabólicas de microrganismos, uma técnica promissora.

Microrganismos alcalifílicos são peças chave para biorremediação de efluentes alcalinos como a lama vermelha, que necessitam de neutralização biológica devido aos altos riscos associados à neutralização por agentes químicos. Por outro lado, a aplicação desses microrganismos extremófilos nas áreas de biotecnologia também tem sido estudada amplamente devido às enzimas e compostos bioativos produzidos por bactérias alcalifílicas.

Bactérias alcalifílicas são capazes de se desenvolver em ambientes extremos, em geral são tolerantes à presença de altos níveis de sódio e metais, e a baixos teores de carbono orgânico e nutrientes disponíveis. Devido às características físico-químicas extremas do meio e de poucas espécies caracterizadas e identificadas nos resíduos de bauxita, fazem-se necessários mais estudos a fim de melhor compreender a microbiota desse ambiente, sendo o uso em conjunto de técnicas de biologia molecular e bioquímicas essenciais a esse propósito.

Em um estudo prévio realizado por Alves et al (2014), foram isoladas e

identificadas cepas de amostras coletadas de um depósito de lama vermelha em Poços de Caldas, onde os microrganismos alcalifílicos foram cultivados em meio de enriquecimento e isolados em aerobiose. Através de técnicas de biologia molecular, foi realizado o sequenciamento parcial (aproximadamente 600 pb ou 43% do gene) do gene que codifica o RNA ribossomal (RNAr) 16S das bactérias isoladas, indicando que a maior parte das cepas pertenciam à família *Bacillaceae*, sendo uma pertencente à família *Sporolactobacillaceae*.

Dando continuidade ao trabalho de Alves et al (2014), o presente estudo realizou a caracterização das cepas isoladas da lama-vermelha, com o sequenciamento de uma maior extensão do gene que codifica o RNA ribossomal 16S (aproximadamente 93% do gene) e testes bioquímicos, a fim de verificar seu potencial biorremediador.

2 OBJETIVOS

Os objetivos subdividem-se em geral e específicos:

2.1 Objetivo geral

Este projeto tem como objetivo geral identificar e caracterizar as cepas isoladas de resíduos de bauxita na região de Poços de Caldas por meio de técnicas de biologia molecular e de ensaios fisiológicos e bioquímicos.

2.2 Objetivos específicos

- a) Realizar seqüenciamento abrangente (~90%) do gene RNAr 16S dos isolados;
- b) Realizar identificação filogenética dos isolados
- c) Caracterizar as cepas quanto à morfologia das colônias e das células por microscopia óptica;
- d) Testar o crescimento das cepas com variações nas seguintes condições: pH, concentração de sódio, temperatura e fontes de carbono;
- e) Verificar a atividade das enzimas catalase, oxidase e amilase nas cepas isoladas;
- f) Realizar ensaios de produção de ácidos com uso de diferentes fontes de carbono e acompanhamento da alteração de pH da cultura promovida pelos metabólitos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O alumínio é o metal mais abundante na natureza e essencial devido a suas características e aplicações na indústria de transformação. É um metal leve ($2,7 \text{ g/cm}^3$), forte, resistente a corrosão, com boa condutividade elétrica, difícil combustão e liberação de gases, de fácil processamento, impermeável, não-tóxico, sem odor e facilmente reciclável (HYDRO, 2012).

De acordo com o Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM), o Brasil é o quarto maior produtor mundial, com reservas de bauxita lavráveis correspondentes a 590 milhões de toneladas, ocupando o décimo primeiro lugar da reserva mundial de bauxita, que em 2012 somaram 25,8 bilhões de toneladas. A maior reserva nacional encontra-se no Estado do Pará (DNPM, 2013).

A extração da alumina a partir da bauxita foi desenvolvida por Karl Bayer em 1888. Os processos de extração da alumina são limitados, cerca de 95% de toda alumina extraída no mundo é realizada através do processo Bayer. O processo consiste na digestão de bauxita por solução de hidróxido de sódio sob alta pressão, e temperaturas que variam de 140 a 280°C, dependendo da composição desse mineral, formando assim uma solução de aluminato de sódio. Essa solução é filtrada e cristais de hidróxido de alumínio (gipsita) são precipitados. Esse produto passa pela etapa de calcinação para formar o óxido de alumínio, a alumina (INTERNATIONAL ALUMINIUM INSTITUTE, 2013). A etapa de digestão da bauxita gera um resíduo insolúvel, conhecido como lama vermelha (AUTHIER-MARTIN et al., 2001).

A lama vermelha é um ambiente considerado inerte (KRISHNA, 2003) com condições extremas devido a alta concentração de íons trocáveis e de metais, elevado pH (>9) e escassez de nutrientes disponíveis. Contém em geral óxido de ferro, óxido de alumínio, sílica, cálcio, sódio e a condutividade elétrica desse resíduo varia entre 1,4 a 28,4 mS/cm (CUCCIA, 2006; GRÄFE; KLAUBER, 2011; KRISHNA et al., 2014). No resíduo de bauxita (RB), os altos valores de condutividade elétrica relatados na literatura se devem à elevada concentração de Na^+ em solução (GRÄFE; KLAUBER, 2011).

O meio alcalino do resíduo de bauxita é devido à dissolução de sólidos alcalinos como carbonato de sódio (Na_2CO_3), sodalita ($\text{Na}_6[\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}].[2\text{NaOH}, \text{Na}_2\text{SO}_4]$), alunita e/ou cancrinita ($\text{Na}_6[\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}] \cdot 2 [\text{CaCO}_3] \cdot 0[\text{H}_2\text{O}]$) durante o

tratamento para extração da bauxita (GRÄFE; KLAUBER, 2011). A capacidade de tamponamento do resíduo é tão elevada que em um estudo citado por Gräfe e Klauber (2011), o resíduo de bauxita passou por um processo sucessivo de lavagens com água e verificaram que, embora a massa sólida diminuísse com as lavagens, a concentração de Na^+ , $\text{Al}(\text{OH})_4^-$, CO_3^{2-} , OH^- e pH mantiveram-se inalterados.

Essas condições extremas do resíduo de bauxita dificultam o crescimento de microrganismos e vegetação. Os microrganismos capazes de se desenvolver em ambientes como esses são organismos extremófilos, adaptados a altas concentrações de sais, metais solúveis e elevado pH.

3.1 Formas de disposição do resíduo

Atualmente, milhões de hectares no mundo todo estão sendo destinados exclusivamente para a disposição do resíduo de bauxita. Estima-se que os depósitos de lama vermelha abrigam aproximadamente 2,7 bilhões de toneladas do resíduo e a cada ano são geradas 120 milhões de toneladas (GRÄFE; KLAUBER, 2011). Apesar de todos os estudos realizados para utilização desse resíduo como subproduto ou na recuperação de metais presentes na lama vermelha, as pilhas desse material continuam a acumular nas áreas de beneficiamento da bauxita.

De acordo com o manual de boas práticas do Instituto Internacional Do Alumínio (INTERNATIONAL ALUMINIUM INSTITUTE, 2013), a forma de disposição desse resíduo depende de diversos fatores, tais como: condições geológicas e climáticas, disponibilidade de áreas, proximidade do mar, idade da planta industrial, logística, natureza do resíduo e regulamentação local. Se no passado não havia controle quanto à disposição desse resíduo, atualmente existe uma série de exigências ambientais para as áreas de disposição do resíduo de bauxita (ADRB).

A abertura de lagoas para disposição do resíduo é a técnica mais utilizada no mundo. As lagoas devem ser impermeabilizadas com mantas para que não ocorra contaminação dos lençóis subterrâneos, mas infelizmente ainda é comum encontrar lagoas vermelhas sem mantas protetoras. As lagoas ou piscinas, como são conhecidas, tem vida útil específica. Em algumas plantas industriais, a disposição do resíduo é realizada também através de dutos que despejam o resíduo direto no mar (KRISHNA, 2003).

Algumas empresas de mineração de bauxita neutralizam as lagoas vermelhas como uma forma de pré-tratamento do rejeito, mas, geralmente, as áreas de disposição do resíduo não passam por nenhum tratamento e as características físicas e químicas da lama vermelha inibem a estabilização da microbiota e de vegetação no meio (GRÄFE et al., 2009).

O resíduo de bauxita, majoritariamente, tem sido estocado em áreas adjacentes às áreas de lavra do minério. O processo de estocagem do RB pode ser na forma de resíduo seco, úmido ou semi-secos. De acordo com Liu e colaboradores (2009), acredita-se que a tendência mundial é o processo de disposição a seco, por ser considerado o melhor método para disposição do resíduo.

Entre as vantagens da disposição à seco estão: a recirculação da água de lavagem da bauxita para o sistema, reaproveitamento da soda cáustica recuperada na recirculação da fase líquida, menor área requerida para disposição do resíduo, aumento da vida útil de cada dique aberto para acondicionamento da lama vermelha, melhor manuseio e maior segurança ambiental (LIU et al., 2009; SILVA FILHO et al., 2007).

A disposição inadequada do resíduo de bauxita pode acarretar em problemas ambientais como: contaminação dos lençóis freáticos e subterrâneos por hidróxido de sódio (soda cáustica), ferro, alumínio ou outro agente químico; ocupação de grandes áreas para disposição do rejeito; dispersão da poeira que pode formar a partir da lama vermelha, e contato direto com animais e plantas (CUNHA, 2011).

3.2 Reaproveitamento e reabilitação do resíduo de bauxita

A utilização do resíduo de bauxita como subproduto tem sido bem-sucedida em alguns casos (KRISHNA, 2003; TSAKIRIDIS et al., 2004), mas está condicionada a diversos fatores: adaptações no processamento final do efluente; custos do tratamento ou processo químico do resíduo; proximidade do local de disposição da bauxita às indústrias de beneficiamento; valor agregado do subproduto que compense investimento; e, não-geração de resíduos mais complexos que o existente.

Estudos apontam o uso alternativo do resíduo de bauxita na indústria cerâmica, construção civil (TSAKIRIDIS et al., 2004), na recuperação de metais, como coagulante na remoção de fosfatos em tratamento de águas residuárias e

como agente neutralizante de resíduos acidificados (GHORBANI et al., 2008). A recuperação de metais a partir da lama vermelha já passou por diversos processos químicos, mas de acordo com Ghorbani e colaboradores (2008), o grau de complexidade e alto custo dos processos químicos inviabilizam a recuperação de metais em escala industrial. No Brasil, devido às distâncias continentais, localização dos depósitos de bauxita e infraestrutura, não há uma logística viável no transporte do resíduo, e o aproveitamento do mesmo em outros setores da economia, até o momento, é inviabilizado devido ao baixo valor agregado e ao alto custo do transporte. De acordo com o Instituto Internacional do Alumínio (INTERNATIONAL ALUMINIUM INSTITUTE, 2013), atualmente, apenas uma pequena quantidade de RB é reutilizado nos diferentes setores industriais. Remediar a lama vermelha na própria área de disposição mostra-se como uma alternativa.

Gräfe e Klauber (2011) sugerem que para reabilitar áreas de disposição de resíduo de bauxita, é necessário que o resíduo atinja, e mantenha, cinco parâmetros importantes para restabilização das áreas, a saber: manter o pH do meio entre 5,5 e 9; condutividade elétrica abaixo de 4mS/cm; taxa de adsorção de sódio ≤ 7 , porcentagem de sódio trocáveis $\leq 9,5$ e carbonato de sódio residual ≤ 1.25 ; metais pesados, traços de metais, sódio e alumínio com concentrações inferiores ao permitido pela legislação local, com níveis de toxicidade abaixo do prejudicial a microrganismos e vegetação, e; densidade $\leq 1,6$. Além de macro e micronutrientes essenciais para desenvolvimento de plantas mais exigentes. Os autores acreditam que, uma vez restabelecida as condições físicas e químicas do resíduo, outras características negativas que impedem a reestruturação do meio podem ser remediadas. Ressaltam ainda que os cinco parâmetros citados acima, não podem ser considerados de forma isolada, e que as propriedades de cada uma são interdependentes.

Dentre os tratamentos do resíduo de bauxita, a neutralização do pH é uma das etapas fundamentais para restabilização do resíduo. Gräfe e colaboradores (2009) citam quatro alternativas de neutralização do resíduo de bauxita sem a utilização de ácidos minerais, são elas: utilização de água do mar; CO_2 e SO_2 ; gesso; e, neutralização biológica.

A adição de água do mar ao resíduo de bauxita diminui a concentração de OH^- e $\text{Al}(\text{OH})_4$ na solução devido a precipitação de hidróxidos de Mg, Ca, Al e carbonatos minerais (MENZIES et al., 2004). A neutralização do resíduo passa por

três estágios de tamponamento dependendo da proporção de resíduo/água do mar. Menzies e colaboradores (2004) relatam uma rápida reação que diminui o pH abruptamente em 5 minutos, com uma diminuição mais gradativa e suave que pode durar semanas. Ao final do tratamento, além da diminuição do pH (abaixo de 8,5), a neutralização utilizando água do mar proporcionou o enriquecimento do resíduo com os nutrientes Ca, Mg e K para as plantas.

A neutralização do RB utilizando os gases CO_2 e SO_2 baseia-se na difusão dos gases dentro da solução. Na presença de O_2 , o Na_2SO_3 oxida a Na_2SO_4 . O tratamento com SO_2 esgota o Na^+ na solução e aumenta a concentração de H^+ (GRÄFE et al., 2009). Khaitan e colaboradores (2009) variaram a pressão ($10^{-3,5}$ a 1 atm) do CO_2 e verificaram a influência no tempo e na diminuição do pH. Embora a diminuição do pH a 1 atm de CO_2 ocorra em apenas um dia, o tempo necessário para estabilizar o pH do RB em 7,5 são trinta dias (KHAITAN et al., 2009).

A utilização do gesso na neutralização do RB ocorre devido a precipitação do excesso de OH^- , $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ e CO_3^{2-} como $\text{Ca}(\text{OH})_2$, tricalcio aluminato, hidrocalalumita e CaCO_3 . A diminuição do pH do RB após adição do gesso está relacionada a dissolução e liberação do Ca^{2+} em solução que reage com OH^- , $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ e CO_3^{2-} . O produto da reação é o Na_2SO_4 que aumenta a condutividade elétrica do meio, sendo necessária uma etapa de tratamento posterior (GRÄFE et al., 2009).

A biorremediação, utilizando as propriedades metabólicas de microrganismos, vem sendo considerada uma das técnicas mais promissoras, apesar de relativamente pouco explorada (KRISHNA, 2009). O tratamento do resíduo de bauxita através da ação de microrganismos foi estudado por Ghorbani e colaboradores (2008), Hamdy e Williams (2001), Krishna et al., (2014), Vachon e colaboradores (1994), entre outros.

Hamdy e Williams (2001) utilizaram um consórcio de bactérias alcalifílicas e forneceram nutrientes para tratamento do resíduo de bauxita em escala laboratorial sob condições aeróbias e anaeróbias. Os resultados indicaram grande crescimento tanto em aerobiose quanto em anaerobiose em apenas 24 horas. Em aerobiose, o crescimento manteve-se estável ao longo de 20 dias e sem oxigênio no meio, o crescimento celular tendeu a diminuir após 24 horas. Embora o crescimento bacteriano tenha se mostrado mais favorável sob aerobiose, foi sob anaerobiose que o pH do meio diminuiu em até três unidades, indicando a melhor condição para redução da alcalinidade do meio. Na presença de oxigênio, após atingir o pH

mínimo, há um aumento constante do pH, mesmo mantendo o número de células constantes presente no meio. No mesmo estudo, testaram o crescimento de plantas em resíduo de bauxita (em escala de bancada) após 34 dias de tratamento (adição de nutrientes que favoreceram o crescimento da microbiota e redução do pH) e em RB sem tratamento (controle). Os resultados indicaram crescimento positivo de plantas, que se mantiveram vivas por mais de 300 dias, onde houve tratamento, e onde não houve tratamento, as plantas morreram dentro de 24 horas. O restabelecimento de vegetação nas áreas de disposição do resíduo é uma alternativa para mitigar a dispersão de poeiras. A revegetação dessas áreas minimiza a erosão do solo, a ação do vento na desagregação de partículas e consequentemente na formação de poeiras, além de tornar o ambiente mais favorável ao crescimento da microbiota (GRÄFE et al, 2009).

Microrganismos alcalifílicos também foram utilizados no tratamento de resíduos de bauxita na Índia. Após seis meses de tratamento com os microrganismos no RB, houve melhora das propriedades físico-químicas do meio quando comparadas ao controle (sem tratamento). O pH do meio diminuiu de 11 para 10.5, houve redução nos valores da condutividade elétrica, aumento do carbono orgânico, fósforo disponível e nitrogênio total no meio, além de constatar crescimento significativo de gramas onde houve tratamento com o consórcio de bactérias (KRISHNA et al., 2014). A Tabela 1 apresenta as melhoras do meio após tratamento biológico.

Tabela 1- Efeito do consórcio bacteriano após seis meses de inoculação nas propriedades físico-químicas do RB.

	Controle	Consórcio bacteriano
Crescimento [peso seco em (g)]	0.83 ± 0.01	8.7 ± 0.5*
pH	11.08 ± 0.01	10.48 ± 0.03
EC (MS/cm)	2.89 ± 0.04	0.74 ± 0.01
Carbono orgânico (%)	0.43 ± 0.01	1.13 ± 0.07*
Matéria orgânica (%)	0.75 ± 0.3	2.03 ± 0.75*
Nitrogênio Total (mg/kg)	5.68 ± 0.2	29.3 ± 0.7*

* Significância de $P < 0.05$

Fonte: Krishna et al., 2014, p. 8.

Ghorbani e colaboradores (2008) estudaram a possibilidade de utilizar fungos na lixiviação biológica do Alumínio presente na lama vermelha e o comportamento do pH na presença dos microrganismos. Verificaram que após o tratamento com fungos, houve decaimento do pH do meio, produção de ácidos cítrico e oxálico e recuperação dos metais alumínio e titânio.

Esses estudos reforçam a teoria de que, ao fornecer uma fonte de carbono aos microrganismos presentes em meios extremos, de modo a favorecer o crescimento celular, os mesmo são capazes de melhorar as estruturas físico-químicas do resíduo de bauxita, favorecendo a adaptação de outros microrganismos, plantas e até animais.

Os microrganismos têm papel fundamental na ciclagem dos nutrientes, essa população está ligada a transformação do carbono orgânico, enxofre, nitrogênio e metais, e, de maneira geral, desempenham função importante na estabilização do meio além de serem importantes bio-indicadores (KRISHNA et al., 2014).

3.3 Microrganismos alcalifílicos

Há poucos estudos sobre os alcalifílicos e sua descoberta é relativamente recente. No ano de 1968 havia apenas 16 artigos científicos publicados, e deu-se maior atenção a esse grupo de extremófilos devido às características fisiológicas que favorecem a produção de enzimas aplicáveis na indústria (BOYER et al., 1973; FRITZE et al., 1990) e após verificada a capacidade de que microrganismos alcalifílicos reduziram naturalmente alcalinidade na presença de carbonato de sódio no Japão (HORIKOSHI, 1999).

As alcalifílicas consistem em dois grupos fisiológicos: alcalifílicas e haloalcalifílicas. Ambas toleram elevado pH, superior a 9, mas diferem-se quanto a tolerância à salinidade. As haloalcalifílicas conseguem suportar a presença de cloreto de sódio superior a 33% (HORIKOSHI, 1999). Microrganismos alcalifílicos podem viver em diferentes ambientes, alcalinos ou não. Algumas espécies diferenciam-se devido as suas funções fisiológicas e capacidade de se adaptar a diferentes meios (AINO, et al., 2008; HORIKOSHI, 1999; KROPINSKI, 2005).

Dentre os microrganismos alcalifílicos já identificados predominam os do gênero *Bacillus*. Ainda assim, há poucos artigos que caracterizam essas bactérias, sendo que até o ano de 2007, apenas 30 espécies de bacilos haviam sido

identificadas (AINO et al., 2008; NOGI et al., 2005). O gênero *Bacillus* foi definido em 1872 por Ferdinand Cohn (DE VOS et al., 2009), e os primeiros alcalifílicos pertencentes a esse gênero foram descritos por A. Vedder mais de seis décadas depois (SPANKA; FRITZE, 1993). Desde então, esses microrganismos vem ganhando maior atenção devido a sua condição de habitar ambientes extremos e produzir enzimas resistentes a alto pH e temperaturas elevadas (HORIKOSHI, 1999; NOGI et al., 2005).

Os mecanismos de adaptação dos microrganismos em ambientes alcalinos vem sendo estudados há décadas (AONO et al., 1999; GOTO et al., 2005; GUFFANTI et al., 1978; HIRABAYASHI et al., 2012; HORIKOSHI, 1999; KRULWICH, 1995; KRULWICH et al., 2001). O sistema de transporte de solutos e a estrutura da parede celular são peças chaves para o entendimento do metabolismo desses microrganismos (AONO et al., 1999; KRULWICH et al., 2001; GOTO et al., 2005), que mesmo em ambientes extremamente alcalinos, conseguem manter o pH do citoplasma mais ácido que o meio externo.

De acordo com a teoria quimiosmótica de Mitchell de 1961, a força próton motiva, utilizada para síntese do ATP, consiste em um componente elétrico e um componente químico, em que o potencial de membrana ($\Delta\Psi$) mantém o interior da célula carregado negativamente (e o meio exterior positivo) e o gradiente de prótons (ΔpH) mantém o interior celular alcalino (AONO et al., 1999; GOTO et al., 2005; GUFFANTI et al., 1978; HIRABAYASHI et al., 2012; HORIKOSHI, 1999; KRULWICH, 1995; YUMOTO, 2002). No entanto, o que se percebe com os microrganismos alcalifílicos é justamente o oposto. Em meios alcalinos (pH 7,5 a 11,4), o pH intracelular se mantém até duas unidades abaixo que o meio externo (HORIKOSHI, 1999), como pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2- pH intracelular de espécies de bacilos alcalifílicos em diferentes valores de pH externo.

Microrganismo	pH externo	pH interno
<i>B. alcalophilus</i>	8,0	8,0
	9,0	7,6
	10,0	8,6
	11,0	9,2
<i>B. firmus</i>	7,0	7,7
	9,0	8,0
	10,8	8,3
	11,2	8,9
<i>Bacillus cohnii</i> YN-2000	11,4	9,6
	7,5	8,5
	8,5	7,9
	9,5	8,1
	10,2	8,4

Fonte: HORIKOSHI, 1999, p. 738.

Em geral, os bacilos alcalifílicos conseguem manter o pH interno (citoplasma) aproximadamente 2,3 unidades mais ácidos que o meio externo, sendo esse comportamento também verificado na cepa OF4 (KRULWICH, 1995; JANTO et al., 2012). O sequenciamento do genoma do *B. pseudofirmus* OF4 sugere que uma forma de manter o crescimento em pH tão elevado é devido a capacidade de armazenar alguns tipos de compostos que podem ser catabolizados de acordo com a necessidade, como por exemplo: poli-hidroxicanoatos, glicogênio e ácidos graxos, incluindo os de cadeia ramificada (JANTO et al., 2012).

A teoria de Mitchell, quando aplicada ao metabolismo dos microrganismos alcalifílicos sugere que, em meio alcalino, as condições não seriam favoráveis e quando comparados aos neutrofílicos, haveria desvantagens para a produção de ATP. No entanto, Hirabayashi e colaboradores (2012) estudaram a relação entre a taxa de extrusão de prótons através da cadeia respiratória e a taxa de síntese de ATP utilizando um bacilo alcalifílico obrigatório *B. clarkii* DSM 8720^T e um neutrofílico *Bacillus subtilis* e verificaram que a taxa de síntese de ATP em *B. clarkii* em pH 10 foi aproximadamente 7,5 vezes maior que a verificada em *B. subtilis* em pH 7.

Guffanti e Krulwich (1994) verificaram que o *B. firmus* OF4 (reclassificado como *B. pseudofirmus*) submetido a crescimento em pH próximo a neutralidade (pH= 7,5) e alcalino (pH=10,5), a síntese de ATP foi mais rápida quanto mais alcalino o meio, principalmente na presença de 200mM de K₂SO₄.

Alguns bacilos alcalifílicos dependem do íon Na⁺ para manter o citoplasma relativamente acidificado em relação ao meio exterior e para crescimento em meio alcalino com pH superior a 9,5 (KRULWICH, 1995; KRULWICH et al., 2001). *Bacillus halodurans*, que teve seu genoma seqüenciado, é dependente do íon Na⁺ para crescimento em meio alcalino. O íon, nesse caso, é essencial para o transporte de soluto através da membrana citoplasmática (DE VOS et al., 2009).

Kitada e Horikoshi (1977) estudaram a influência do sódio em espécies de bacilos alcalifílicos no consumo de ácido aminoisobutírico (AIB). De acordo com os autores, a internalização e consumo de AIB é dependente do pH alcalino, assim como de elevadas concentrações de NaCl. Para os bacilos investigados, outros cátions monovalentes não substituem o Na⁺.

Os microrganismos alcalifílicos necessitam de mais estudos, a fim de caracterizá-los bioquimicamente, devido às suas propriedades metabólicas e sua importância para indústrias na neutralização de meios extremamente alcalinos. Os testes fisiológicos a serem realizados com os microrganismos isolados da lama-vermelha no presente trabalho fazem-se necessários devido a escassez de trabalhos realizados com microrganismos presentes nesse meio extremo e seu potencial biorremediador.

3.4 Gene do RNA ribossomal 16S

A partir da década de 1980, o seqüenciamento do gene do RNAr 16S começou a ser desenvolvido para estudos de filogenia e taxonomia de bactérias (CLARRIDGE, 2004). Woese (1987) mostrou que a relação filogenética entre os microrganismos poderia ser determinada comparando uma parte conservada do código genético.

Os genes altamente conservados, candidatos a seqüenciamento para interesse de taxonomia e filogenia, foram o RNAr 5S, 16S e o 23S, e espaços entre esses genes. No entanto, o gene mais utilizado na identificação de bactérias atualmente é o RNAr 16S. Esse gene está presente em todas as bactérias. Além de

manter muitas regiões conservadas, as mudanças verificadas na sequência do gene do RNAr 16S comportam-se como cronometro molecular, marcando as distâncias evolutivas e parentescos dos organismos (CLARRIDGE, 2004; WOESE, 1987). As taxas de mutação na sequência do gene 16S, também conhecidas como “*hot spots*”, não são conhecidas e difíceis de estimar, pois pode variar em cada organismo (dos diferentes grupos taxonômicos), pode variar de tempo em tempo durante a evolução e pode variar em diferentes regiões dentro do próprio gene.

O gene RNAr 16S possui comprimento de aproximadamente 1550 pares de base (pb), composto por regiões bastante conservadas e regiões variáveis, contém informações essenciais para identificação das bactérias. As informações contidas no RNAr 16S podem ser comparadas não somente entre todas as bactérias, mas também com sequências do gene do RNAr 16S de arqueobactérias e com RNAr 18S dos eucariotos (CLARRIDGE, 2004).

Foram identificadas 9 regiões hipervariáveis ao longo do gene do RNAr 16S (BROSIUS et al., 1978; CHAKRAVORTY et al., 2007; VAN de PEER et al., 1996). Essas regiões estão apresentadas na Tabela 3. De acordo com Chakravorty e colaboradores (2007), as regiões V2, V3 e V6 são as regiões que possibilitam melhor identificação entre as espécies.

Tabela 3- Regiões hipervariáveis do gene do RNA ribossomal 16S.

Região	Bases
V1	69-99
V2	137-242
V3	433-497
V4	576-682
V5	822-879
V6	986-1043
V7	1117-1173
V8	1243-1294
V9	1435-1465

Fonte: CHAKRAVORTY et al., 2007.

Essas regiões podem ser amplificadas milhões de vezes, utilizando determinados *primers*, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esse

método foi desenvolvido por Kary Mullis na década de 1980 e atualmente é um dos métodos mais utilizados de análise de DNA (ROCHA, 2013). A técnica é baseada no uso da enzima DNA polimerase capaz de sintetizar fragmentos específicos de DNA, através de *primers* que são fitas de DNAs iniciadores com aproximadamente 20 nucleotídios complementares, que se ligam a região de interesse para amplificação. O sequenciamento dos produtos de PCR permite a identificação taxonômica e filogenética dos organismos.

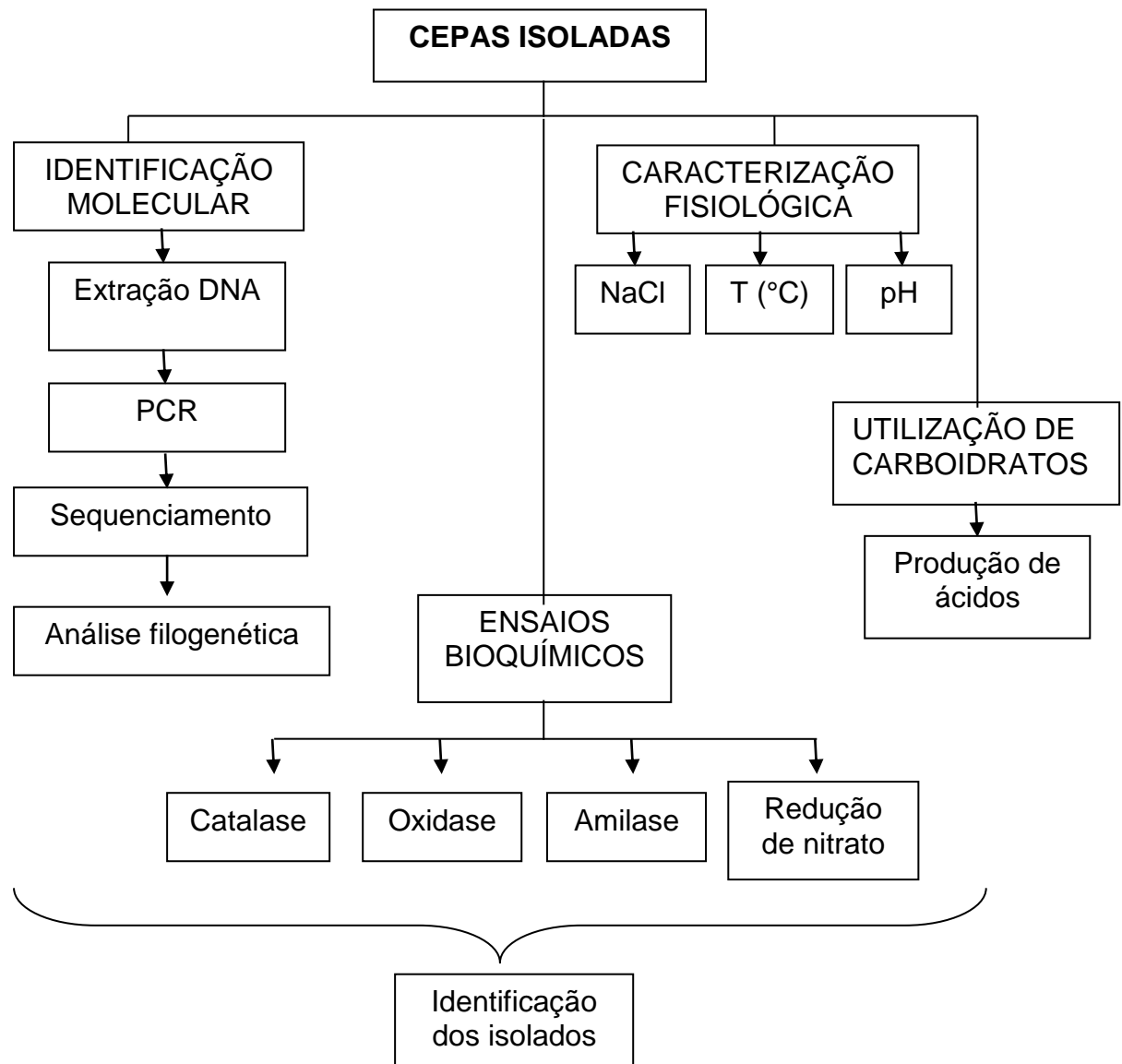
A técnica de seqüenciamento do gene do RNAr 16S é atualmente uma ferramenta muito importante na identificação de espécies. Segundo Janda e Abott (2007), a técnica de hibridização DNA-DNA, embora bastante confiável, perde espaço cada vez mais devido ao trabalho intensivo em laboratório e aos custos associados à técnica. Ressaltam ainda, as limitações de estudos de taxonomia e filogenia baseando-se somente no sequenciamento do gene do RNAr 16S e a importância da técnica de hibridização DNA-DNA e testes de caracterização na identificação final de espécies. Janda e Abott (2007) relatam ainda os problemas de identificação que ocorrem com alguns gêneros de bactérias, incluindo o gênero *Bacillus*. Após seqüenciamento do gene do RNAr 16S, duas espécies de bacilos *B. globisporus* e *B. psychrophilus* apresentam mais de 99,5% de similaridade entre as espécies mas apresentam apenas 23 a 50% de similaridade de DNA em testes utilizando a técnica de hibridização, o mesmo foi verificado com espécies do gênero *Edwardsiella* em que três espécies apresentam similaridade de 99,35 a 99,81% entre elas mas diferenciam-se bioquimicamente e homologia de DNA entre 28 e 50% (JANDA; ABOU, 2007).

Os problemas relatados por Janda e Abott (2007) com relação à identificação a partir do gene do RNAr 16S de alguns gêneros de bactéria e diante da revisão de literatura realizada, especialmente com bacilos alcalifílicos, percebe-se que esses extremófilos pertencem a um grupo bastante heterogêneo, que utilizam mecanismos diferentes de adaptação. Diante disso, ressalta-se a importância da realização da técnica de sequenciamento do gene do RNAr 16S para identificação em nível de espécie, mas também testes complementares como os bioquímicos e os fisiológicos que são essenciais na caracterização de cepas não identificadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma (FIGURA 1) sintetiza as principais etapas da metodologia que serão descritas detalhadamente nos próximos ítems:

Figura 1: Fluxograma experimental representativo das etapas do trabalho.



Fonte: Da autora.

4.1 Enriquecimento das bactérias alcalifílicas aeróbias isoladas do resíduo de bauxita

A coleta de amostras de resíduo de bauxita e o isolamento das cepas bacterianas que foram caracterizadas neste trabalho foram realizados como parte da dissertação de Enne Alves (ALVES et al., 2014), em que foram coletadas amostras de um depósito de resíduos de bauxita em Poços de Caldas, Minas Gerais, em diferentes profundidades: 0,25 m, 0,5 m e 1 m e uma amostra da água de dreno em Dezembro de 2013. Os microrganismos foram enriquecidos em meio de cultura oxalato, em aerobiose e pH ajustado com NaOH para 10,5. Foram isoladas seis cepas e realizado o seqüenciamento parcial do gene do RNAr 16S das mesmas. Os resultados indicaram alta similaridade com três grupos distintos de bactérias alcalifílicas. As cepas isoladas foram congeladas e mantidas a -20°C em solução a 10% de glicerol.

No presente estudo, as cepas isoladas anteriormente, classificadas como BRA1, BRA2, BRA3, BRA4, BRA5 e BRA6 foram descongeladas e inoculadas em meio de enriquecimento (descrito a seguir) (GUFFANTI, et al., 1978) com pH 10,3. As bactérias isoladas foram enriquecidas com incubação em *Shaker* 30°C e 150 rpm por 72 horas.

4.1.1 Meios de cultura

O meio de enriquecimento foi constituído por: (i) meio mineral basal adaptado de Guffanti e colaboradores (1978) que consiste em: 7 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mM de KH_2PO_4 e 100 mM da solução tampão Na_2CO_3 para ajustar o pH para 10,5; (ii) 0,1% de extrato de levedura; (iii) 0,1 % (v/v) de solução traço de metais; (iv) glicose com concentração final de 50 mM. Os três últimos componentes foram adicionados à solução mineral basal a partir de soluções estoque estéreis. A solução traço de metais foi composta por (g/L): ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA), 2,5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,4 g; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g; $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g (WANG, et al., 2011).

A solução basal, a solução estoque de extrato de levedura e a solução traço de metais foram autoclavados por aproximadamente 20 minutos a 120°C , em frascos separados. A solução de glicose (50 mM) foi esterilizada através do processo de

filtração em membrana 0,22 µm de diâmetro do poro interno. O pH do meio pronto foi aferido através de medição em pHmetro.

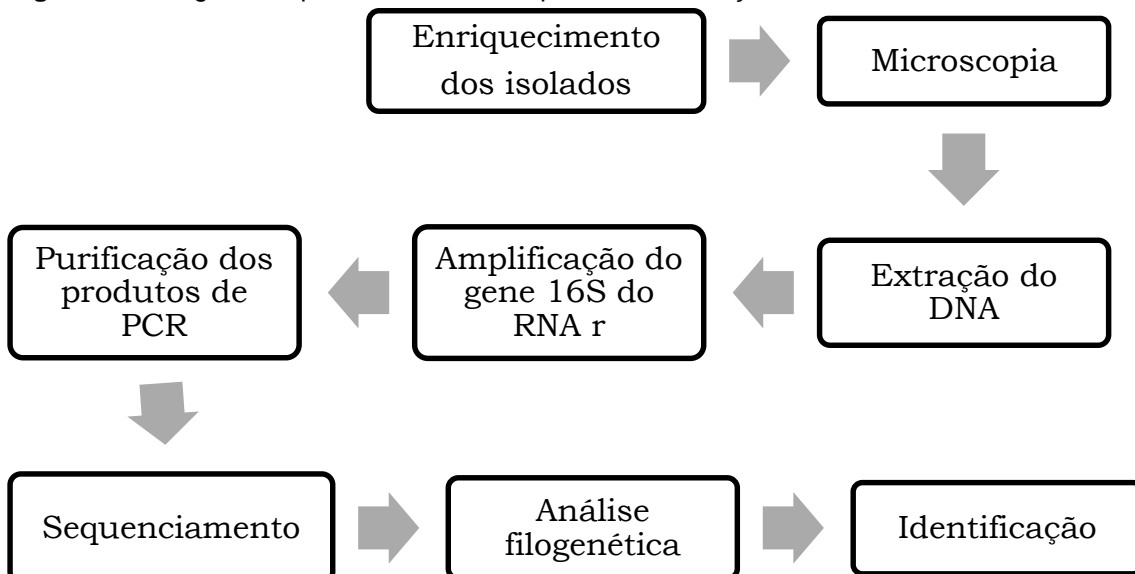
4.2 Caracterização das colônias isoladas

As colônias foram isoladas em placas de ágar e caracterizadas quanto a tamanho, forma, opacidade, margem, textura e pigmentação das colônias. Foram selecionadas 2 colônias de cada placa de A1, B1 e C1, e devido a comprovação anterior de contaminação das cepas BRA2 e BRA4, foram selecionadas 3 colônias e inoculadas em tubos de ensaio com 10 ml do meio de enriquecimento. A cepa BRA6 não cresceu às condições submetidas. Após 40 horas em estufa, as colônias haviam crescido nos tubos de ensaio e foi realizado microscopia para verificar a pureza das colônias. As colônias isoladas selecionadas foram novamente enriquecidas e utilizadas para todos os ensaios posteriores.

4.3 Identificação molecular dos isolados

Para identificação molecular, foi realizada a extração do DNA de cada cepa isolada, amplificação do RNA ribossomal 16S, purificação dos produtos de PCR, seqüenciamento de cerca de 1300 pb do gene do RNAr 16S, tratamento dos resultados, análise filogenética e por fim a identificação dos isolados (FIGURA 2).

Figura 2- Fluxograma representativo das etapas da identificação molecular dos isolados.



Fonte: Da autora

4.3.1 Extração de DNA

Foi retirada uma alíquota de 15 ml de cada cultura e centrifugadas por 8 minutos a 3500 rpm. O sobrenadante foi retirado e a biomassa foi ressuspensa adicionando-se 5 ml de tampão fosfato-salino (PBS). Alíquotas de 1,5 ml de cada amostra foram transferidas para microtubos de 1,5 ml e centrifugadas novamente por 2 minutos a 14000 rpm em microcentrífuga para dar início ao procedimento de extração de DNA das cepas BRA1, BRA2, BRA3, BRA4 e BRA5. O kit utilizado para extração do DNA foi o Wizard® Genomic, DNA Purification Kit, Promega®.

A confirmação da extração de DNA das cepas isoladas foi realizada com corrida eletroforética no sistema DIGEL® em gel de agarose 1,0% e TEB 0,5 X com marcador de peso molecular 1kb (Promega). A corrida eletroforética teve duração de 60 minutos a 100 V. Em seguida, os géis de agarose foram corados em brometo de etídeo a 0,05 µg/mL em TEB 0.5X por 20 minutos, lavados por 10 minutos em água destilada e expostos à luz UV em transiluminador UV e fotodocumentados através do L-pix STi (Loccus®).

4.3.2 Amplificação do gene do RNAr 16S pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase

Os DNAs extraídos foram submetidos à amplificação do gene RNAr 16S por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando dois diferentes pares de *primers* 27f / 1401r e 338f / 1401r, específicos para o Domínio Bactéria (FIGURA 3).

Figura 3- Descrição dos pares de *primers* utilizados nas reações de PCR.

Gene-alvo	Primer	Sequência 5' → 3'
DNAr 16S Bactéria	27f	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG
DNAr 16S Bactéria	1401r	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG
DNAr 16S Bactéria	338f	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG
DNAr 16S Bactéria	1401r	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG

Fonte: Da autora

Para amplificação dos DNAs extraídos, foram adicionados 10 µl da amostra de DNA em diferentes diluições, mais 40 µl do *mix* de reagentes, totalizando 50 µl

em microtubos de 0,2 ml. O mix reparado contém: tampão de PCR, 1X; MgCl₂, 1,5mM; *primer* 27F, 0,2 µM; *primer* 1401R, 0,2 µM; dNTP, 200µM; Taq DNA Polimerase, 0,04 U/ µl; e H₂O.

A programação do termociclador MaxyGene Gradient (Axygen®) foi ajustada para que na primeira etapa do ciclo a temperatura fosse elevada a 94°C por 5 minutos para desnaturação. A segunda etapa realizou 30 ciclos com três diferentes temperaturas: 94°C durante 30 segundos para desnaturação, 55°C para anelamento por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. A terceira etapa possui único ciclo em que faz a extensão final do DNA a 72°C por 7 minutos.

A confirmação da amplificação do RNAr 16S com os *primers* citados anteriormente foi realizada em gel de agarose 1,5% com marcador de peso molecular 100 pb (EasyGen). A aplicação das amostras no gel de agarose foi realizada utilizando 1µL do tampão de carregamento e 4 µL do produto de PCR.

Após a confirmação da amplificação, os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega®. O volume final de cada produto purificado variou de acordo com a concentração desejada para posterior sequenciamento. Para estimar a quantidade dos produtos amplificados e purificados foi realizada a corrida em gel de agarose 2% em eletroforese, aplicando-se 2 µL das amostras (mais 0,5 µL de tampão de carregamento), utilizando 2 µL do Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) como referencia.

4.3.3 Sequenciamento e análise

Os produtos de PCR purificados foram encaminhados ao Centro de Pesquisa em Genoma Humano- IB USP para sequenciamento. O Centro de Pesquisa em Genoma Humano utiliza o sistema de análise *ABI 3730 DNA Analyser*, tecnologia *Life Technologies- Applied Biosystems*. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando os *primers* 27f, 338f e 1401r através do *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (código 4337456) gerando 3 sequências contíguas por amostra de cepa. As corridas foram feitas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. As sequências foram analisadas através do *software Sequencing Analysis 5.3.1* utilizando o *Base Caller KB*.

Os resultados obtidos foram tratados no *Electropherogram Quality Analysis* (TOGAWA; BRIGIDO, 2003) onde é possível classificar a qualidade do

sequenciamento através da escala de Phred e selecionar apenas as sequências de boa qualidade (Phred ≥ 21). As sequências de boa qualidade foram selecionadas para o processo de união das 3 sequências contíguas do gene. Para tanto, primeiro, a partir do resultado do sequenciamento com o 1401r, foi gerada uma sequência reversa complementar, com o auxílio da ferramenta encontrada no link <http://www.reverse-complement.com/>. O alinhamento dos seqüenciamentos foi realizado de acordo com Huang e Madan (1999), utilizando a ferramenta disponibilizada no link <http://doua.prabi.fr/software/cap3>.

O programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* foi utilizado para reunir as sequencias em um único arquivo *fasta*. Com esses dados, a árvore filogenética foi montada a partir da ferramenta do RDP *The Ribosomal Database Project*.

4.4 Ensaio preliminar de Crescimento Bacteriano em meio de cultivo

A análise de crescimento das culturas foi realizada para verificar o tempo de crescimento populacional das cepas isoladas a fim de definir o tempo necessário para os ensaios fisiológicos. As curvas de crescimento celular foram encontradas através de leituras no espectrofotômetro medindo turbidimetria a um comprimento de onda de 600nm (KITADA ; HORIKOSHI, 1977). O ensaio foi realizado para as cepas BRA1, BRA2, BRA3, BRA4 e BRA5, sem repetições, inoculadas em meio de enriquecimento (a cepa BRA6 não resistiu às condições de estocagem), com pH inicial 10,32 e incubadas em *shaker* 150 rpm a 30°C.

Para a medição de Densidade Óptica (D.O), alíquotas de 3 ml foram retiradas em fluxo laminar horizontal (para não haver contaminação), a cada leitura no tempo especificado. Foram realizadas leituras nos tempos: 0, 6, 12, 24, 30, 48, 51, 55, 72 e 77 horas.

4.5 Testes bioquímicos

As bactérias isoladas foram submetidas a testes bioquímicos como: teste de Gram, reações de catalase, oxidase, redução de nitrato, hidrólise de amido e produção de ácidos.

Para os testes de catalase e oxidase, foi utilizado o meio basal, 0.1 % extrato de levedura, 100 mM do tampão carbonato de sódio e Agar 2%. Após crescimento

das colônias em placas de Petri, a reação de catalase foi realizada pingando 20 µL de peróxido de hidrogênio e verificando se houve reação. Reação positiva, com formação de bolhas instantâneas, indica que a cepa é catalase positiva. Para reação de oxidase, foi utilizado o kit da Newprov onde se retirou uma colônia isolada, esfregou-se na tira de oxidase e esperou alguns minutos, conforme indicação do fabricante. Manchas com tons azuis ou roxos indicam oxidase positiva.

Para o teste de hidrólise de amido, utilizou-se o meio Agar nutriente (2% agar, 0.5 % extrato de carne, 0.5 % triptona), 1 % amido e 100 mM do tampão carbonato de sódio. Após crescimento das colônias, o aparecimento de halos de degradação indica a hidrólise positiva para amido (DE VOS et al., 2009).

O meio para redução de nitrato foi o adaptado por De Vos et al. (2009) em que se utilizou (m/v): 0.5 %, triptona; 0.3 %, extrato de carne; 0.1 %, KNO_3 ; 100 mM Na_2CO_3 e água destilada. O meio autoclavado, foi adicionado a tubos de ensaio (10 mL), fluxionado nitrogênio por três minutos e inoculado com as cepas isoladas. Os tubos de ensaios foram incubados em estufa 30°C por 72 horas e mantidos sob anaerobiose. Após crescimento utilizou-se o kit da Newprov em que foram adicionadas duas gotas do reagente A (dimetil- alfa- naftilamina) e igual quantidade do reagente B (ácido sulfânico), conforme indicação do fabricante. A coloração vermelha ou fúcsia no meio após adição dos reagentes e o meio inalterado após adição do pó de zinco, indica resultado positivo.

4.6 Crescimento em diferentes pH

O crescimento bacteriano foi realizado em triplicatas, utilizando o meio de enriquecimento com a seguinte composição: 7 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mM de KH_2PO_4 (GUFFANTI, et al., 1978), 50mM glicose anidra (dextrose) e 1% extrato de levedura. O acompanhamento do crescimento bacteriano foi verificado em diferentes níveis de alcalinidade (pH 7, 8, 9, 10, 11 e 12) variando apenas o tampão entre os pH's.

O tampão utilizado para o ensaio com pH 7 foi $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, foram preparados separadamente com concentração 1M em que adicionou-se 77,4 ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e 22,6 ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para cada 1000 ml. Para pH 8 foi utilizado NaHCO_3 , 100mM. Ao NaHCO_3 foi adicionado Na_2CO_3 , 100 mM para alcançar pH 9. Para ajustar o meio para pH 10 foi utilizado o

tampão carbonato de sódio (100mM) e pH 11 o tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ com concentração final 100 mM ajustado com NaOH. Foi utilizado o tampão Na_2CO_3 , 100 mM e NaOH para ajustar o meio para pH 12. O meio e as soluções-tampão foram esterilizados por autoclavagem a 121°C por 20 min.

Os inóculos para o ensaio consistiram de culturas das cepas BRA1, BRA3 E BRA5 incubadas por 24 horas, 150 rpm, 30°C, com densidade óptica (D.O) aproximada de 0,5, 1 e 0,4, respectivamente. Foram adicionados 10 ml do inóculo das cepas isoladas em 200 ml do meio específico, em triplicatas, incubadas em *shaker* 150 rpm, 30°C, com duração de 28 horas nos diferentes níveis de alcalinidade. O acompanhamento do crescimento das cepas foi realizado por turbidimetria ($A= 600\text{nm}$) e a cada 4 horas retiradas alíquotas de 5 ml para realizar a leitura.

4.7 Tolerância a NaCl

A tolerância a sal foi testada nas diferentes concentrações: 0, 5, 10 e 17% de NaCl, utilizando meio de enriquecimento (citado no item 4.1.1), tampão K_2CO_3 (1mM; pH 8), temperatura 30°C, mantidos em *shaker* a 150 rpm. O ensaio foi realizado em triplicata e o crescimento foi acompanhado por turbidimetria em 16 e 24 horas de ensaio. Os ensaios com maiores concentrações de sais (10 e 17% NaCl) tiveram durações de 140 horas para verificar crescimento das cepas.

4.8 Crescimento em diferentes temperaturas

Para verificar o crescimento bacteriano nas temperaturas 10, 20, 40 e 50°C, a mesma metodologia e o mesmo meio de enriquecimento utilizados nos ensaios citados acima foram mantidos, o tampão utilizado foi o Na_2CO_3 (100 mM; pH 10). O ensaio em 10°C teve duração de 15 dias; 20°C, 48 horas; 40°C, 20 horas, e; 50°C com duração de 72 horas. Como os ensaios anteriores foram realizados a 30°C, não houve necessidade de repetição. Ao final do ensaio foi realizada turbidimetria das amostras para verificar o crescimento bacteriano.

4.9 Utilização de carboidratos

Foi utilizado o mesmo meio basal adaptado de Guffanti e colaboradores (1978), 100 mM da solução tampão Na_2CO_3 (pH 10,5), 0,1% de extrato de levedura e 50 mM das seguintes fontes de carbono: Frutose, Glicose, Lactose, Manitol, Sacarose e Xilose. Um ensaio foi realizado sem fonte de carbono, utilizando apenas o extrato de levedura (0,1%) como substrato para verificar crescimento.

Foi realizado o repique das cepas com duração de aproximadamente 24 horas, alíquotas de 15 ml foram retiradas e centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm. Após retirada do sobrenadante, a biomassa resultante foi lavada com o próprio meio basal e alíquotas de 1 ml foram retirados para inocular os Erlenmeyers. Os ensaios tiveram duração de 24 horas, incubadas em shaker 150 rpm, submetidos a aerobiose. A utilização dos carboidratos foi confirmada através de turbidimetria verificando se houve crescimento em 16 e 24 horas.

4.9.1 Determinação da produção de ácidos

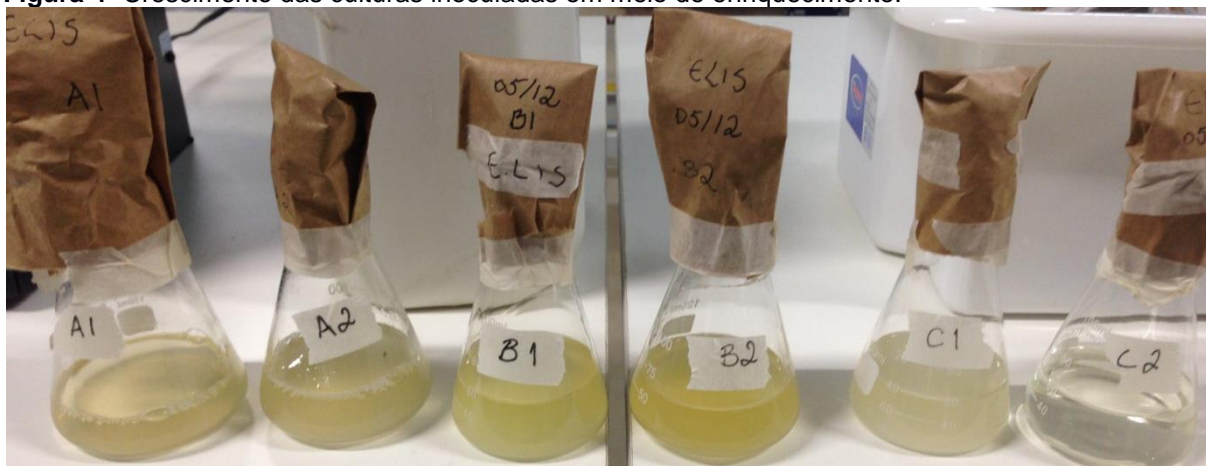
A análise da produção de ácidos foi realizada a partir dos ensaios realizados para verificar crescimento com diferentes fontes de carbono, descrito no item anterior, selecionando somente as amostras onde houve crescimento celular.

Para determinar os ácidos formados a partir das fontes de carbono utilizou-se o Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência- CLAE (HPLC, Shimadzu®) de acordo com metodologia descrita por Penteado e colaboradores (2013). O CLAE foi equipado com bomba LC-10ADVP, amostrador automático SIL-20^a HT, forno CTO-20A a 43°C, dois detectores ligados em série: um detector de ultravioleta (UV) com arranjo de diodos (SDP-M10 AVP), um detector por índice de refração (RID-10A), controlador (SCL-10AVP) e coluna Aminex® HPX-87H (300 mm, 7.8 mm, BioRad®). Utilizou-se o H_2SO_4 (0,01 N) a 0,5 ml/min como fase móvel (PENTEADO et al., 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como as cepas isoladas haviam sido mantidas armazenadas por congelamento, foi feito o trabalho inicial de reaclimação e enriquecimento das mesmas, bem como a verificação da pureza das culturas. O enriquecimento das cepas isoladas no meio alcalino foi bem sucedido, e após 72 horas de incubação em *shaker* a 30°C e 150 rpm todas as cepas haviam crescido exceto C2 (FIGURA 4). Este fato pode estar relacionado às condições do meio adotado no presente trabalho, que difere do meio utilizado no trabalho de Alves e colaboradores (2014) ou à baixa resistência da cepa às condições de estocagem.

Figura 4- Crescimento das culturas inoculadas em meio de enriquecimento.



Fonte: Da autora.

O meio de cultura utilizado no presente trabalho baseou-se em meios de enriquecimento bastante utilizados na literatura, em que microrganismos alcalifílicos foram isolados e enriquecidos com êxito na utilização do mesmo (GUFFANTI et al., 1978; JAIN et al., 2011; KITADA; HORIKOSHI, 1977; KRISHNA et al., 2014; KULSHRESHTHA et al., 2010; PAAVILAINEN et al., 1994). O meio mineral basal adaptado de Guffanti e colaboradores (1978) mostrou-se melhor para o crescimento celular dos isolados quando comparado ao meio utilizado por Alves e colaboradores (2014).

Durante inspeção por microscopia, foi possível verificar que as culturas das cepas BRA2 e BRA4 continham populações mistas, provavelmente por contaminação cruzada durante manipulação das mesmas. Para obtermos sucesso no isolamento, a partir desse enriquecimento foi feito estriamento em placas de

Petri, com o mesmo meio de cultura e ágar para as cepas BRA1, BRA2, BRA3, BRA4 e BRA5. Após 36 horas em estufa a 30°C, as bactérias haviam crescido e foi possível isolar as colônias em todas as cepas.

5.1 Caracterização das colônias isoladas

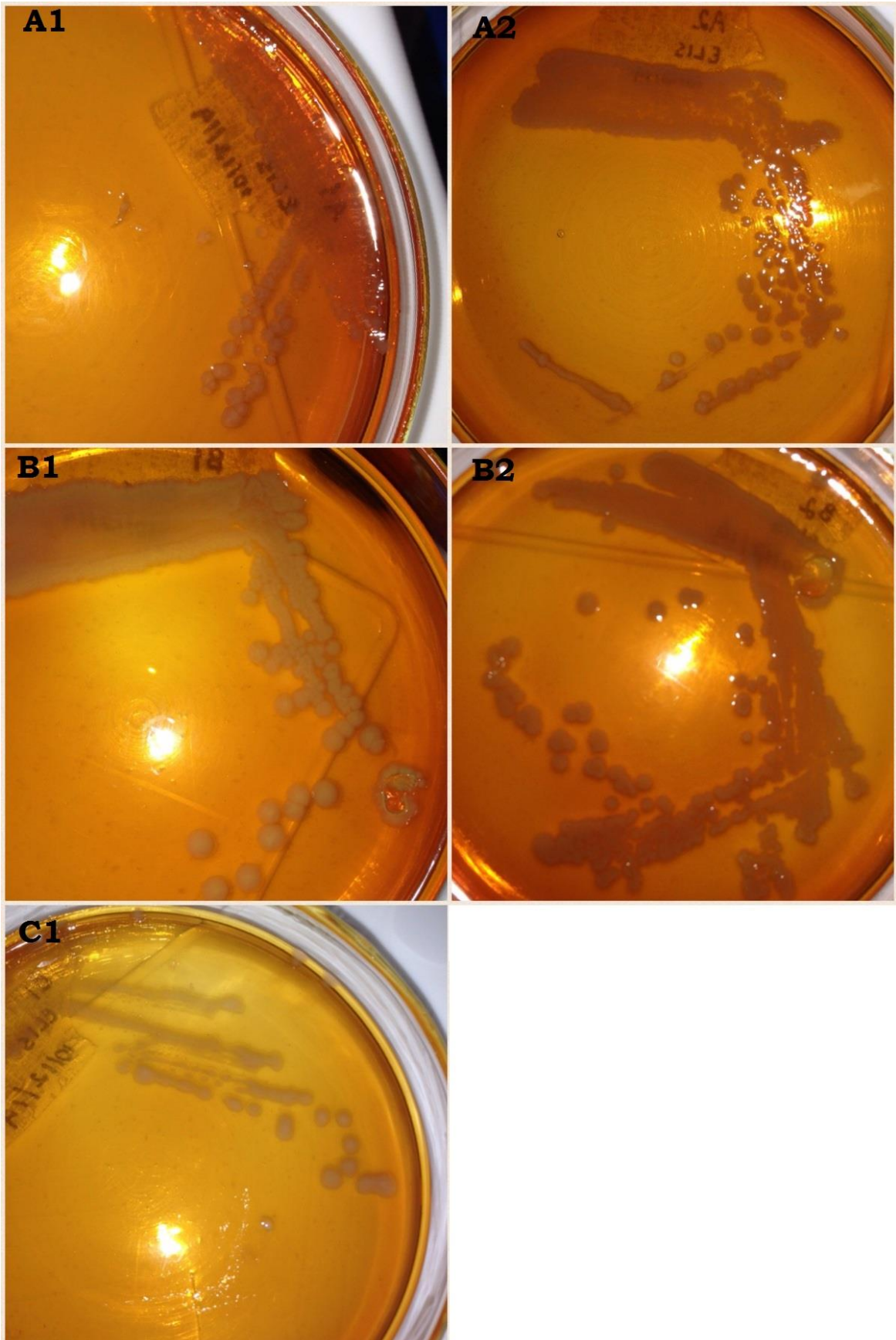
O crescimento em placas possibilitou a caracterização das colônias como circulares, opacas, com margem regulares, texturas lisas e cores esbranquiçadas, como apresentado na Tabela 4 e Figura 5.

Tabela 4- Característica das colônias isoladas.

Característica da colônia	A1	A2	B1	B2	C1
Tamanho	<2 mm	<2 mm	4 mm	3 mm	≈3 mm
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Opacidade	Opaca	Opaca	Centro opaca, translúcida na borda	Centro opaca, translúcida na borda	Opaca
Margem	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular
Textura	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Pigmentação	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca

Fonte: Da autora

Figura 5- Culturas de isolamento em placas de Agar das colônias isoladas referentes às cepas BRA1, BRA2, BRA3, BRA4 e BRA5



Fonte: Da autora

5.2 Identificação molecular dos isolados

A identificação molecular foi possível após a extração do DNA, a amplificação do gene RNAr 16S e posterior sequenciamento, como será mostrado a seguir.

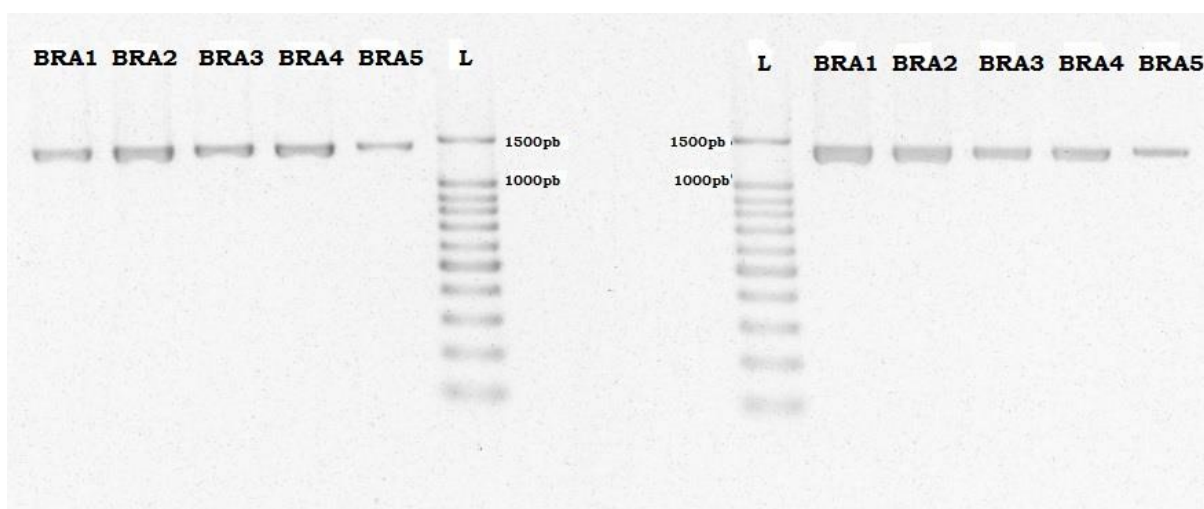
5.2.1 Extração do DNA

A extração do DNA utilizando o kit da Promega® foi realizado para as cepas BRA1, BRA2, BRA3, BRA4 e BRA5 e no decorrer do procedimento foi possível visualizar os pellets de DNA extraídos, sinalizando que o processo havia sido bem sucedido. A confirmação da extração do DNA foi visualizada na corrida eletroforética com gel de agarose 1%.

5.2.2 Amplificação RNAr 16S

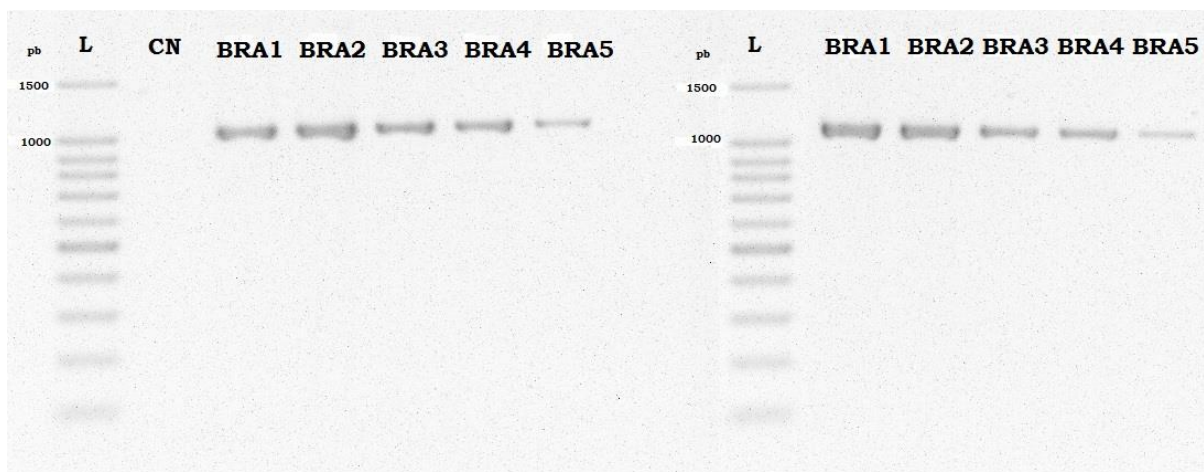
Com o objetivo de seqüenciar o gene do RNAr 16S das cepas isoladas, foi feita a amplificação desse gene por PCR, utilizando os pares de *primers* 27f/1401r (FIGURA 6) e 338f/1401r (FIGURA 7). Os produtos esperados dessa amplificação consistem em fragmentos de aproximadamente 1400 pares de base (pb) e 1060 pb, respectivamente, o que foi confirmado pela corrida em gel de agarose a 1,5% conforme visto abaixo.

Figura 6- Imagem negativa do gel de agarose com produtos de PCR utilizando *primers* 27f/1401r



Fonte: Da autora.

Figura 7- Imagem negativa do gel de agarose com produtos de PCR utilizando *primers* 338f/1401r.



Fonte: Da autora

5.2.3 Sequenciamento e análise

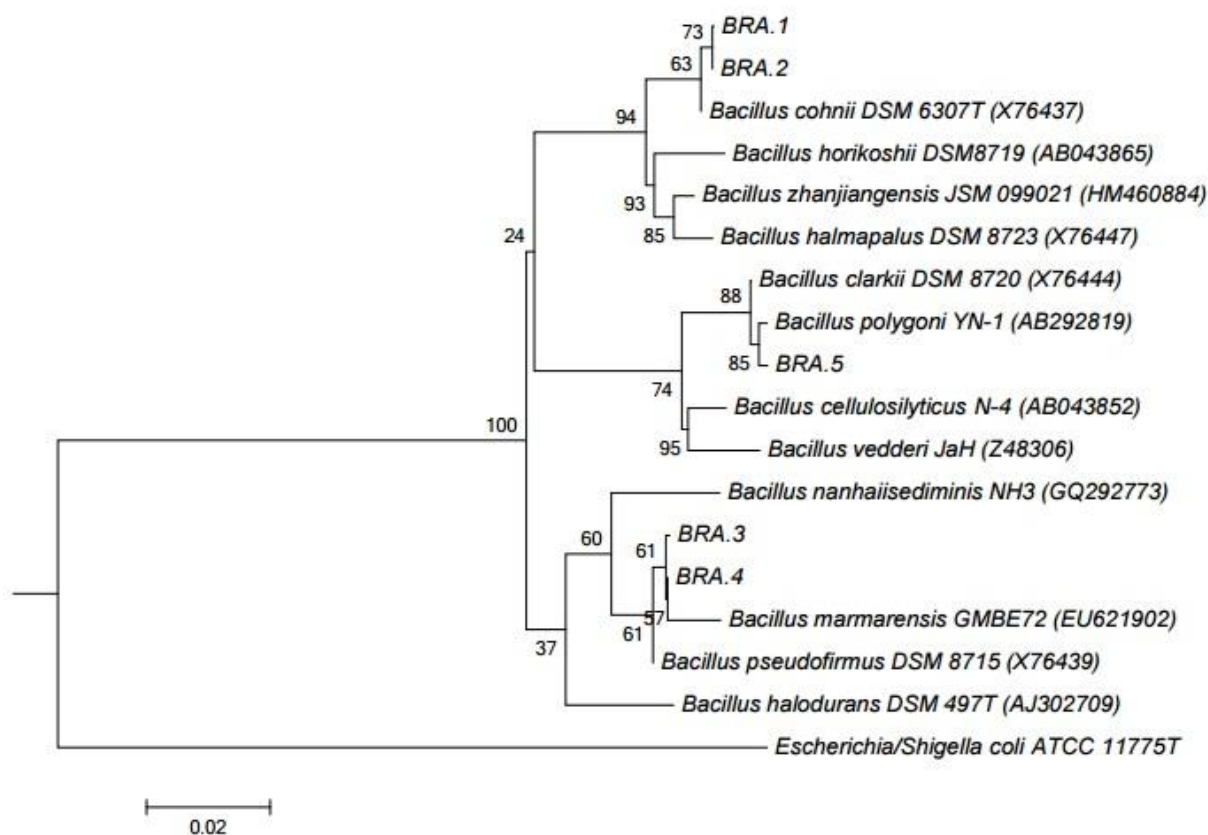
Alves et al., (2014) sequenciou aproximadamente 600 pb da porção inicial do gene RNA ribossomal 16S das cepas isoladas. Janda e Abbott (2007) apontam que o sequenciamento mínimo recomendado para identificação mais confiável de cepas desconhecidas é de 500 a 525 pares de base, e o ideal de 1300 a 1500 pb do gene do RNAr 16S. No presente estudo, foi feito um sequenciamento mais extensivo, abrangendo quase a totalidade do gene do RNAr 16S. A técnica de sequenciamento utilizada possibilita o sequenciamento contínuo de fragmentos de no máximo 650pb, portanto, foi feito o sequenciamento de três regiões parcialmente sobrepostas do gene para a posterior montagem da sequência completa. Dos 1400 pb do gene do RNAr 16S sequenciados no presente estudo, aproximadamente 1300 pb foram considerados de boa qualidade de acordo com a escala Phred (≥ 21).

Clarrigde (2004) descreve a importância de algumas regiões do gene e destaca que o sequenciamento dos 500 pb iniciais são suficientes para identificação de organismos isolados devido a essa região apresentar maior diversidade por quilobase sequenciada. Mas quando há dúvidas quanto à alta similaridade entre duas espécies distintas, ou possibilidade de identificar uma nova espécie, um sequenciamento com maior abrangência de nucleotídeos do gene faz-se necessário (CLARRIGDE, 2004). Yarza e colaboradores (2014) verificaram que apenas o sequenciamento quase completo do gene RNAr 16S possibilita a identificação taxonomica com maior precisão.

A comparação das sequências obtidas com as cepas de referência no banco

de dados mostrou que as cepas BRA1 e BRA2 tem índice de similaridade de 99,7 e 99,8%, respectivamente, com a espécie *Bacillus cohnii*; BRA3 e BRA4 similaridade de 99,7% para *Bacillus pseudofirmus*; BRA5 apresentou índice de similaridade de 99,7% tanto para *Bacillus clarkii* quanto para *Bacillus polygoni* (FIGURA 8). Segundo Janda e Abbot (2007), índices de similaridade superiores a 99,5% com as espécies de referência, correspondem a um resultado confiável de identidade da cepa. Yarza e colaboradores (2014) afirmam que a identificação molecular a nível de espécie é bem aceita utilizando sequências do gene RNAr 16S com índices de similaridades entre 98 e 99%, outras técnicas como hibridização DNA-DNA, também são bem aceitas. Para identificação taxonômica mais acurada, as técnicas de biologia molecular devem vir acompanhadas das propriedades fenotípicas do organismo (YARZA et al., 2014). Com relação à cepa BRA5, como houve o mesmo nível de similaridade entre *B. clarkii* e *B. polygoni*, não se pode identificar a espécie baseando apenas no seqüenciamento desse gene (JANDA; ABBOTT, 2007).

Figura 8- Árvore filogenética obtida com base na sequência do gene RNAr 16S.



Fonte: Da autora.

Baseado no banco de dados *Living Tree Project* (LTP), Yarza e colaboradores (2014) verificaram os limites de identidade no sequenciamento capazes de distinguir gênero, família, ordem, classe e filo. Com base no sequenciamento de dois genes do RNAr 16S, 94,5% de identidade ou abaixo disso indicam gêneros distintos; 86,5% ou abaixo há fortes indícios que pertencem a famílias distintas; 82% ou abaixo há evidências de ordens distintas; 78,5% ou abaixo, pertencem a classes distintas, e; 75% ou abaixo disso, há grandes evidências de filo distintos (YARZA et al., 2014).

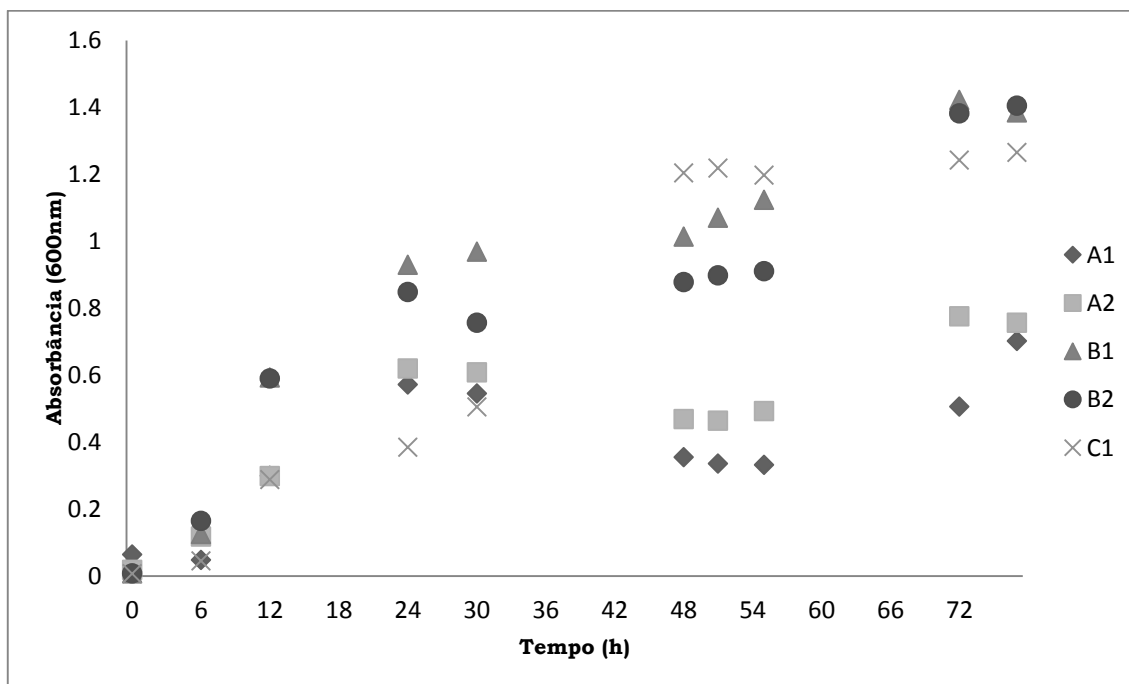
Clarridge (2004) comparou o seqüenciamento do gene do RNAr 16S de 100 microrganismos com comprimentos de 500 e 1500pb para geração de dendrogramas e verificaram que os resultados relacionando às espécies foram bastante similares, mas não idênticos. Os resultados desse seqüenciamento confirmaram os resultados obtidos anteriormente por Alves e colaboradores (2014).

Segundo Janda e Abbott (2007), devido às limitações da técnica para alguns gêneros de microrganismos, além do sequenciamento do gene do RNAr 16S, testes complementares como testes fisiológicos e bioquímicos são importantes para assegurar a identificação de espécies com maior nível de confiança.

5.3 Ensaio preliminar de crescimento bacteriano em meio de cultivo

Esse experimento preliminar foi realizado a fim de verificar o tempo de crescimento populacional das cepas isoladas nas fases *lag* (adaptação das bactérias), *log* (crescimento celular) e estacionária, em que foram aferidas dez leituras a partir do tempo zero e finalizadas em 77 horas após incubação. Com base nos resultados obtidos nesse ensaio, os tempos de incubação e os pontos de aferição mais adequados para os demais testes foram determinados.

Analisando a Figura 9, foi possível verificar que a partir de 6 horas houve crescimento exponencial para todas as culturas isoladas. Houve tendência a estabilização para cepas BRA1 e BRA2 entre 24 e 30h. As cepas BRA3 e BRA4 ficaram parcialmente estabilizadas de 24 a 55h e houve leve crescimento após esse tempo. BRA5 diferenciou-se das demais cepas devido ao crescimento lento nas primeiras 30h e aumento considerável entre 30 e 48h seguida de notável estabilização do crescimento.

Figura 9- Curva de crescimento das cepas isoladas.

Fonte: Da autora.

Diante dos resultados, ficou definido que 28 horas de incubação seria o tempo necessário para os ensaios fisiológicos e com leituras a cada 4 horas para melhor acompanhamento dos testes.

Devido à grande semelhança na morfologia, na sequência de DNA do gene do RNAr 16S e no perfil de crescimento em cultura entre as cepas BRA1 e BRA2 e entre BRA3 e BRA4, indicando tratarem-se provavelmente de uma mesma espécie, foram escolhidas apenas uma cepa representante de cada (BRA1, BRA3 e BRA5) para os posteriores testes.

5.4 Testes bioquímicos e fisiológicos para identificação dos isolados

A Tabela 5 apresenta os resultados que caracterizam as cepas BRA1, BRA3 e BRA5 quanto aos testes fisiológicos e bioquímicos e os comparam com espécies identificadas com alto índice de similaridade de acordo com os resultados obtidos a partir do seqüenciamento do gene do RNAr 16S.

Tabela 5- Características das cepas BRA1, BRA3 e BRA5 comparando-as com bacilos de referência.

Reações	Cepa BRA1 ¹	<i>B. cohnii</i> ²	Cepa BRA3 ¹	<i>B. Pseudo firmus</i> ³	Cepa BRA5 ¹	<i>B. clarkii</i> ⁴	<i>B. polygoni</i> ⁵
Gram	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	-	-	+	+	-
Amilase	+	+	+	+	-	-	-
Red. Nitrato	+	+	-	-	+	+	-
pH							
6,7	-	-	-	-	-	-	-
7,2	+	V	+	V	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+
11	-	V	-	V	-	V	+
12	-	V	-	-	-	-	+
Temperatura							
10°C	-	+	+	+	-	-	+
20°C	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+
50°C	-	-	-	-	-	-	-
NaCl (%)							
0	+	+	-	-	-	V	-
5	+	+	+	+	+	+	+
10	+	V	+	+	+	+	+
17	-	-	-	V	-	+	-

+, positivo

-, negativo.

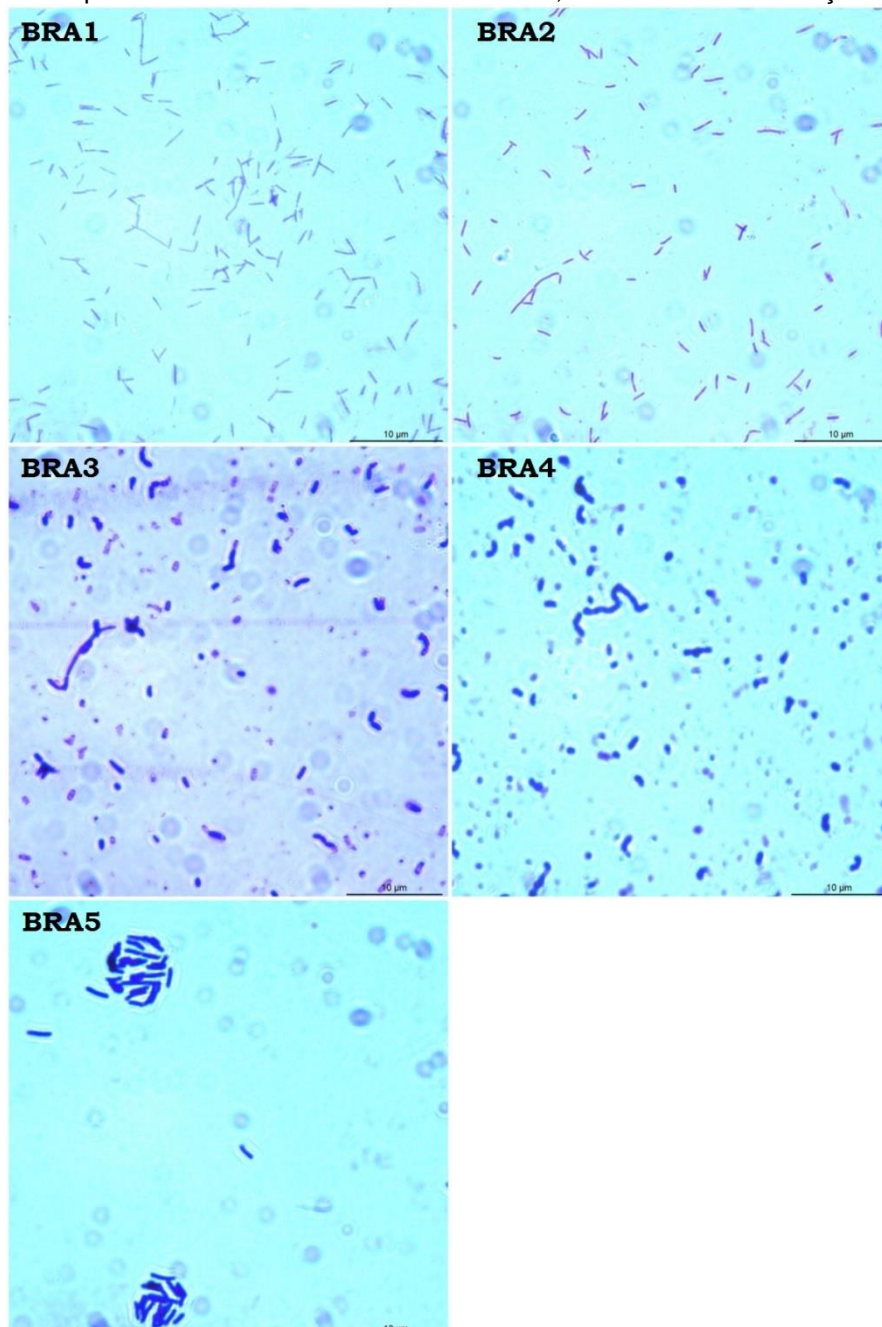
v, variável

¹, resultados do presente estudo.², Spanka; Fritze, 1993 e Yumoto et al., 2000.³,Nielsen et al., 1995 e Ma et al., 2012.⁴, Takada et al., 2002 e Aino et al., 2008.⁵, Aino et al., 2008.**Fonte:** Da autora

Cepa BRA1

De acordo com os testes bioquímicos, a cepa BRA1 (identificada com 99,7% de similaridade pelo seqüenciamento com a espécie *Bacillus cohnii* cepa DSM 6307^T) é catalase, oxidase, amilase e Gram positiva (FIGURA 10). Os resultados estão de acordo com o verificado na literatura (NIELSEN et al., 1995; SPANK; FRITZE, 1993; YUMOTO et al., 2000).

Figura 10- Microscopia das colônias isoladas sob aerobiose, em lâminas de coloração Gram.



Fonte: Da autora.

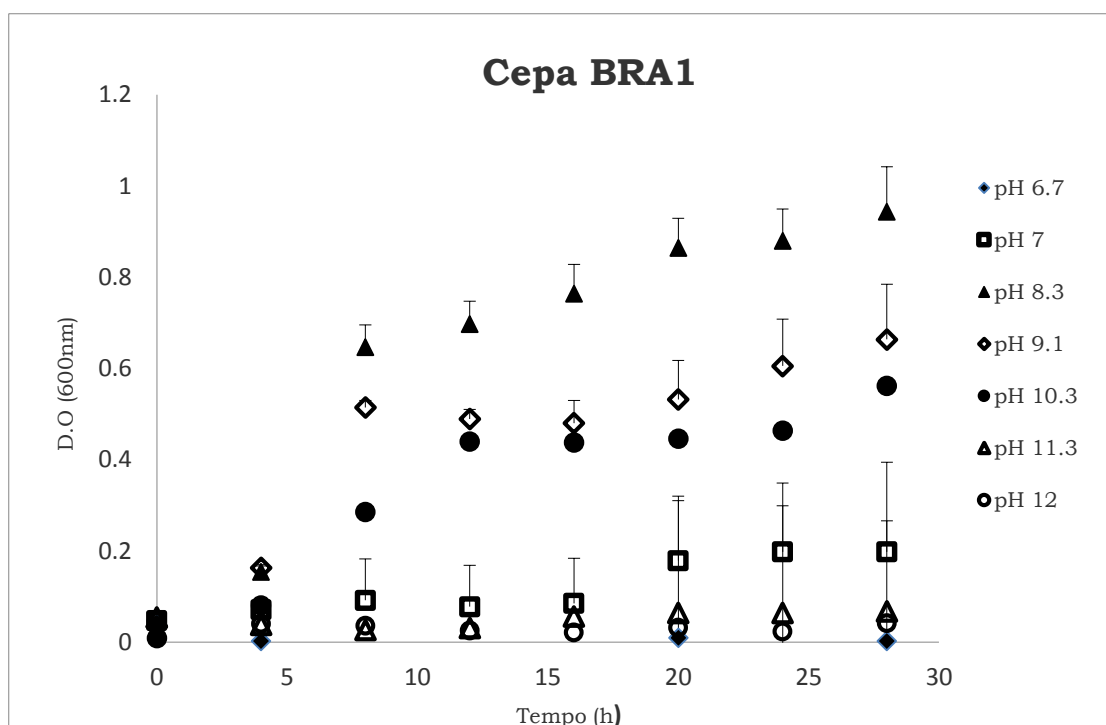
O crescimento da cepa BRA1 foi verificado de 20 a 40°C e temperatura ótima de 30°C. Embora dados na literatura indiquem crescimento positivo para *B. cohnii* a 10°C (NIELSEN et al., 1995; SPANK; FRITZE, 1993), algumas cepas da espécie não apresentam crescimento em baixas temperaturas como observado no trabalho realizado por Yumoto e colaboradores (2000).

A cepa BRA1 obteve crescimento na ausência de Na⁺, na concentração de 5% e 10% de NaCl mas não houve em 17%. De acordo com De Vos et al. (2009), *B. cohnii* não necessita de NaCl para crescimento, cresce em 0, 2 e 5% NaCl e não cresce em 10%. Spanka e Fritze (1993) caracterizaram um grupo de cepas identificadas como *B. cohnii* e não constatou crescimento em NaCl 10% mas sim em 5%. Nielsen et al., (1995) caracterizaram cepas da mesma espécie e verificou 100% de crescimento das cepas com 5 e 7% de NaCl; 36% das cepas cresceram em 8 e 9% de NaCl e não registrou crescimento a partir de 10%. Entretanto, Yumoto e colaboradores (2000) testaram cepas de *B. cohnii*: DSM 6307^T e YN- 2000 para verificar crescimento nas concentrações 0, 3, 5, 7, 8, 10, 11, 12 e 13% de NaCl e confirmaram crescimento em todos os ensaios, verificaram ainda a possibilidade de crescimento para a cepa a partir de 14% de NaCl e obtiveram resultado negativo.

Comparando as cepas analisadas pelos diferentes autores com a cepa caracterizada no presente estudo, o crescimento em 5% de NaCl foi confirmado por todos, havendo diferenças apenas nos resultados verificados a partir da concentração de 10% de NaCl. Em que a Cepa BRA1 obteve resultados semelhante ao de Yumoto e colaboradores (2000), mas diferenciaram-se dos demais registros encontrados na literatura (NIELSEN et al., 1995; SPANKA; FRITZE, 1993; DE VOS et al., 2009).

De acordo com a Figura 11, a cepa BRA1 apresentou melhor crescimento entre pH 8 e 10. Não houve crescimento em pH 6.7, 11 e 12, e em pH 7,2 houve leve crescimento somente 20 h após incubação, indicando certa tolerância a pH neutro. O crescimento máximo foi verificado ao final do experimento em todos os ensaios. O crescimento bacteriano máximo entre os ensaios foi encontrado em pH 8.3 com D.O 0.944, seguido de D.O 0.664 em pH 9 e 0.562 em pH 10.3.

Figura 11- Curva de crescimento da cepa BRA1 nos diferentes pH's.



Fonte: Da autora

Nielsen e colaboradores (1995) caracterizaram 11 cepas da espécie *B. cohnii* e verificaram que 54% das mesmas obtiveram crescimento bacteriano em pH 7, as demais não apresentaram crescimento nesse pH. Yumoto e colaboradores (2000) identificaram a cepa YN- 2000, com 99,6% de similaridade com a espécie *B. cohnii* cepa DSM 6307^T, e o seu crescimento em pH 7 foi positivo. Dentre as cepas de *Bacillus cohnii* caracterizadas por Spanka e Fritze (1993), nenhuma obteve crescimento em pH neutro, caracterizando-as como alcalifílicas obrigatórias com elevado crescimento celular em pH 8 a 10, e nesse estudo o pH ótimo de 8,32. A cepa do presente estudo foi submetida ao teste de crescimento em pH próximo a neutralidade em dois ensaios: um, em pH 6,7 e outro em pH 7,2, utilizando o mesmo tampão. No primeiro ensaio não houve crescimento ao longo de 28 horas, e no segundo ensaio em que o meio estava levemente mais alcalino, ao longo de 15 horas percebe-se um leve crescimento celular e na leitura posterior, de 20 horas, verifica uma mudança no crescimento em que praticamente dobrou o valor da D.O, o que pode indicar uma grande sensibilidade à redução de pH nessa faixa próxima da neutralidade.

Tekin e colaboradores (2012) ao estudarem a produção de proteases alcalinas, também caracterizaram a cepa APT5 100% similar à cepa DSM 6307^T de

B. cohnii, caracterizando-a como alcalifílica obrigatória com crescimento entre pH 9 a 12 com pH ótimo 10, não havendo crescimento em pH abaixo de 9. A cepa ATP5 diferenciou-se da cepa de *B. cohnii* caracterizada por Nielsen e colaboradores (1995) bem como da cepa caracterizada no presente estudo, pois o pH ótimo de crescimento para a cepa caracterizada por Tekin et al. (2012) foi 10; para Nielsen e colaboradores, 9 e; o presente estudo, 8.32.

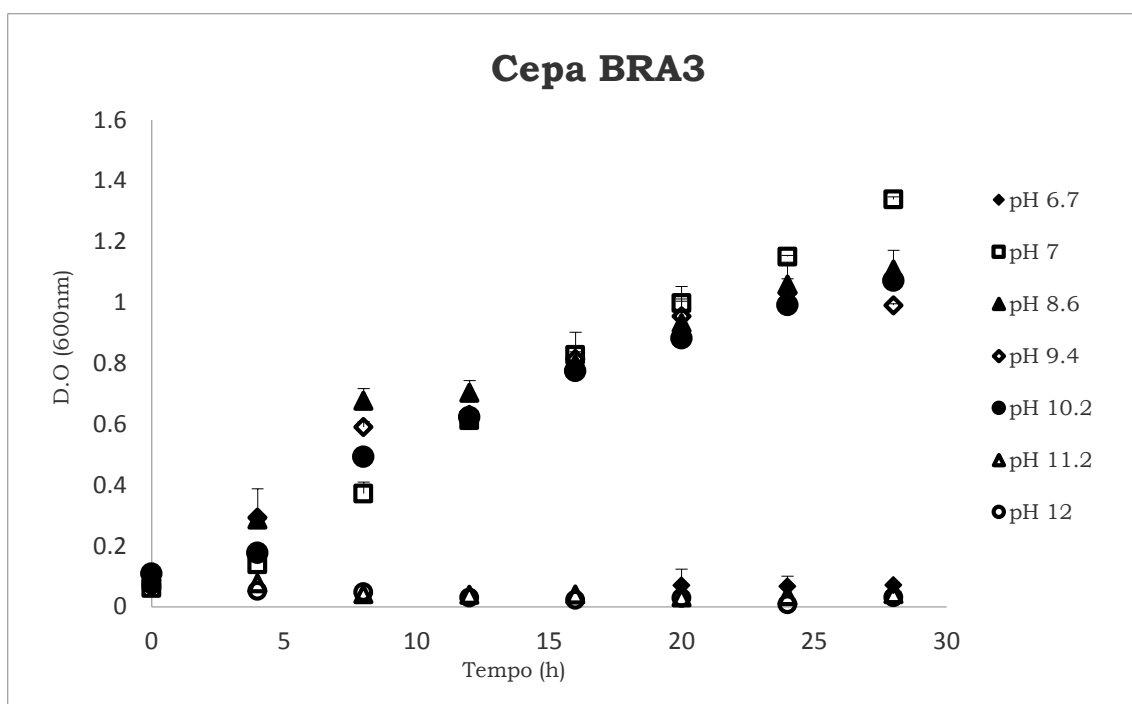
Cepa BRA3

A cepa BRA3 (99,7% de similaridade com *Bacillus pseudofirmus* DSM 8715^T) foi caracterizada como Gram-positiva (FIGURA 10), catalase e oxidase positiva, amilase negativa e não redutora de nitrato (TABELA 5). Registrou crescimento de 10 a 40°C e não cresceu a 50°C. De acordo com a literatura, *B. pseudofirmus* cresce entre as faixas de 10 a 45°C (NIELSEN et al., 1995; DE VOS et al., 2009).

Ao longo de 24 horas de ensaio, a Cepa BRA3 registrou bom crescimento com 5% e levemente em 10% de NaCl. Não foi observado crescimento em 0 e 17% de NaCl, mesmo após 120 horas de incubação. A espécie *B. pseudofirmus* possui uma ampla faixa de crescimento em diferentes concentrações de NaCl, crescendo em concentrações entre 5 e 10% de NaCl (NIELSEN et al., 1995; DE VOS et al., 2009). Nielsen e colaboradores (1995) confirmaram crescimento de todas as cepas de *B. pseudofirmus* analisadas, nas concentrações de 5 a 16% de NaCl e; 78% das cepas obtiveram crescimento favorável à altíssima concentração de sais de 17%. Ma e colaboradores (2012) caracterizaram-na como halotolerante com crescimento positivo em meio contendo NaCl até 16%, e também na ausência do sal.

De acordo com a Figura 12, a cepa BRA3 obteve bom crescimento entre pH 7,2 e 10,2; não houve crescimento em pH 6,7, 11 e 12. A variação do crescimento celular para esta cepa em pH 8,6, 9,4 e 10,2 é pouco significativa, com D.O final: 1,109, 0,991 e 1,072, respectivamente. Assim como a cepa BRA1, esta cepa também foi inoculada em meio com pH 6,7 e em pH 7,2. Embora tenha sido observado um ótimo crescimento em pH 7,2, no ensaio com pH 6,7 não houve crescimento desta cepa ao longo de 28 horas.

Figura 12- Curva de crescimento da cepa BRA3 nos diferentes pH's.



Fonte: Da autora

Nielsen et al. (1995) caracterizaram as cepas de *B. pseudofirmus* DSM 8715^T como alcalifílicas estritas, embora tenham obtido crescimento positivo em pH 7 em 11% das 18 cepas estudadas por esses autores. Dentre as 18 cepas de *B. pseudofirmus* caracterizadas por Nielsen e colaboradores (1995), 100% indicaram pH ótimo em 9; 17% mostraram-se melhores em pH 10 em relação a pH 8 e; 6% em pH 10 em relação ao pH 9.

Ma e colaboradores (2012) isolaram e identificaram a cepa MC02 com 99,6% de similaridade com a espécie *B. pseudofirmus* DSM 8715^T. Os autores caracterizaram-na como alcalifílica obrigatória com crescimento entre pH 8 e 10 e pH ótimo de crescimento em 9,5 e não observaram crescimento em meio neutro. Janto e colaboradores (2012) sequenciaram o genoma completo da cepa OF4 de *B. pseudofirmus* e verificaram crescimento positivo entre pH 7,5 e 11,4.

Assim como no presente estudo, não foi verificado crescimento celular da cepa de *B. pseudofirmus* DSM 8715^T em pH 11 (DENIZCI et al. 2010). No entanto, a espécie *B. marmarensis* cepa GMBE 72^T, 99% similar a cepa BRA3, foi identificada por Denizci e colaboradores (2010) e caracterizaram-na como alcalifílica obrigatória pois não houve crescimento tanto em pH 7 como em 7,5. Diferente da espécie *B.*

pseudofirmus e da cepa BRA3 deste trabalho, *B. marmarensis* registrou crescimento em pH 11, sendo sua faixa de crescimento de pH 8 a 12.5.

Cepa BRA5

A cepa BRA5 (possui 99,7% de similaridade com duas espécies distintas, *B. clarkii* DSM 8720^T e *B. polygoni* YN-1^T) foi caracterizada como Gram-positiva, oxidase e catalase positiva, amilase negativa e redutora de nitrato. Apresentou crescimento positivo entre 20 e 40°C (TABELA 5). *B. clarkii* e *B. polygoni* são catalase positiva, mas diferem quanto ao teste de oxidase e da redução de nitrato. *B. clarkii* DSM 8720^T é positiva para oxidase e redução de nitrato, enquanto *B. polygoni* YN-1^T é negativa. Ambas as espécies são amilase negativa (TAKADA et al., 2002; AINO et al., 2008). *B. clarkii* cresce entre 15 a 45°C (NIELSEN et al., 1995; MA et al., 2012; SPANK; FRITZE, 1993) e *B. polygoni* YN-1^T entre 5 e 45°C (AINO et al., 2008). A cepa BRA5 com 99,7% de similaridade com ambas as espécies, apresentou resultados iguais aos verificados em *B. clarkii* na literatura.

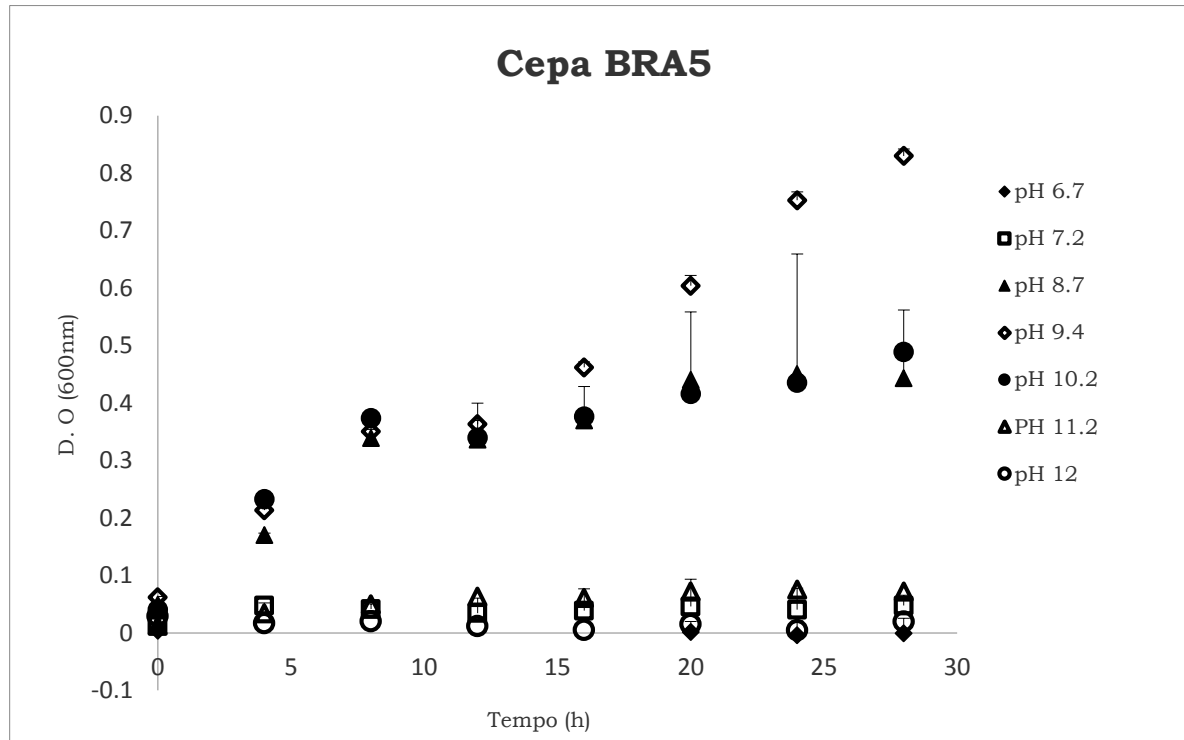
Constatou-se crescimento da cepa BRA5 em 5 e 10% de NaCl, mas não em 0 e 17%. A espécie *B. clarkii* é tolerante a elevadas concentrações de sais, de 5 a 18% de NaCl e não cresce na ausência de Na⁺ (NIELSEN et al., 1995; DE VOS, 2009). No entanto, Aino e colaboradores (2008) afirmam que há crescimento positivo de *B. clarkii* cepa DSM 8720^T na ausência de íons de sódio. De acordo com Aino et al., (2008) ao caracterizarem *Bacillus polygoni* YN-1^T, observaram que a espécie suporta concentrações de 3 a 14% de NaCl, sendo considerado moderadamente halofílico, e, dependente de Na⁺ para crescimento celular.

Kitada e Horikoshi (1977) estudaram o crescimento do *Bacillus* no.8-1 em concentrações de 0, 0.5 e 1.5% de NaCl em pH 7 e 9. Os autores verificaram que o bacilo era dependente do Na⁺ para crescimento e perceberam também que em pH 9 o crescimento era superior nessas concentrações de sais. Com base nos estudos de Kitada e Horikoshi (1977), uma das possibilidades para o crescimento negativo na concentração de 17% de NaCl para a cepa BRA5 é devido ao pH (que estava próximo a neutralidade), influenciar no crescimento nessa concentração de NaCl.

A cepa BRA5 apresentou pH ótimo de crescimento em pH 9.4 (FIGURA 13), com crescimento significativo e semelhantes entre pH 8 e 10. Mostraram-se

alcalifílicas obrigatórias, pois não houve crescimento expressivo em meio neutro, assim como em pH 11 e 12.

Figura 13- Curva de crescimento da cepa BRA5 nos diferentes pH's.



Fonte: Da autora.

Bacillus clarkii e *B. polygoni* são alcalifílicas obrigatórias e não foi observado crescimento em pH neutro (AINO et al., 2008; NIELSEN et al., 1995). As cepas de *Bacillus polygoni* isoladas de bolas de índigos no Japão por Aino e colaboradores (2008) apresentaram crescimento ótimo em pH 9 e crescimento em pH 12. *B. clarkii* tem pH ótimo em 10 e não apresenta crescimento em pH 12 (AINO et al., 2008; NIELSEN et al., 1995). O não-crescimento em pH 12, aproxima a cepa BRA5 do *Bacillus clarkii*.

As diferentes características apresentadas pelas cepas estudadas no presente trabalho, quando comparadas com cepas de referência pode ser justificada devido a algumas bactérias alcalifílicas apresentarem comportamentos diferentes dependendo do ambiente em que se encontram. As funções fisiológicas podem diferir entre cepas da mesma espécie se o ambiente de adaptação de cada cepa tiver características específicas e distintas (AINO et al., 2008).

A partir dos resultados da análise de seqüenciamento e testes fisiológicos e bioquímicos é possível concluir que as cepas BRA1, BRA3 e BRA5 são: *Bacillus*

cohnii, *Bacillus pseudofirmus* e *Bacillus clarkii*, respectivamente. A Figura 8 em que apresenta a árvore filogenética, a cepa BRA5 está mais próxima a *B. polygoni*, no entanto, após os testes bioquímicos e fisiológicos, a cepa BRA5 aproxima-se mais das características associadas ao *B. clarkii*. Janda e Abbott (2007) destacam a importância da realização desses testes e de testes de hibridização DNA-DNA na identificação mais confiável dos organismos. Nielsen e colaboradores (1995) reuniram bacilos alcalifílicos de acordo com as características bioquímicas e filogenéticas em 11 grupos taxonômicos. As três cepas caracterizadas no presente trabalho são representantes de três grupos distintos: grupo 1 (*B. pseudofirmus*), grupo 3 (*B. clarkii*) e grupo 7 (*B. cohnii*). Vale ressaltar que essas três cepas são os primeiros bacilos alcalifílicos desses grupos isolados e caracterizados no Brasil.

Bacillus cohnii são alcalifílicas facultativas, Gram-positivas, catalase e oxidase positivas, redutoras de nitrato, tolerante a NaCl até 10%, temperatura de crescimento bacteriano mínimo de 10°C e máximo de 47°C. Crescimento variado de pH 7 a 10 (SPANKA; FRITZE, 1993; YUMOTO et al., 1998). Foram isoladas de diferentes ambientes alcalinos e não alcalinos (YUMOTO et al., 2000). Essa espécie foi identificada e caracterizada por Ghorbel e colaboradores (2009), Spanka e Fritze (1993) e Yumoto e colaboradores (2000). Ghorbel et al., (2009) e Tekin e colaboradores (2009) verificaram a produção de enzimas por essa espécie para aplicação na indústria. Outros estudos foram realizados para essa espécie (HAMANA; NIITSU, 1999; PRASAD; RAO, 2013).

Ghorbel et al. (2009) utilizando uma nova cepa termofílica identificada como bactéria *Bacillus cohnii*, estudaram a atividade enzimática da amilase e os efeitos do pH e temperatura na produção da enzima. Os ensaios foram realizados em pH 4 a 10 e temperatura entre 40 a 90 °C. Os resultados encontrados indicaram em média 80% de atividade enzimática nos diferentes pH's, sendo pH e temperatura ótimos 9 e 70 °C, respectivamente.

Prasad e Rao (2013) com o objetivo de descolorir e degradar um corante amplamente utilizado nas indústrias têxtil (azocorante Direct Red- 22, DR-22), utilizaram o *Bacillus cohnii* cepa MTCC 3616 e testaram sua eficiência em diferentes níveis de alcalinidade (pH 7 a 11). A descoloração de DR-22 foi possível de pH 7 a 11, com melhor eficiência em pH 9 com 95% de eficiência.

Bacillus pseudofirmus são alcalifílicas obrigatórias, aeróbios facultativos, cresce na faixa de pH entre 7,5 e 11,4 com pH ótimo de crescimento na faixa de 9

(JANTO et al., 2012). São capazes de crescer entre temperaturas de 10 a 45 °C e são tolerantes a presença de NaCl em até 17%. Utilizando ribose ou D-xilose como fonte de carbono desenvolvem bem, mas não há crescimento em L-arabinose, galactose, ramnose, sorbitol, lactose, melibiose, meliziotose ou D-raffinose (NIELSEN et al., 1995).

A cepa OF4 do *B. pseudofirmus* teve seu genoma seqüenciado e foram isolados de diferentes ambientes, como solo e fezes de animais (KOJIMA et al., 2006; NIELSEN et al., 1995). *B. pseudofirmus* vem sendo bastante estudado devido à aplicação industrial das enzimas produzidas pela espécie (KOJIMA et al., 2006; LU et al., 2014; MA et al., 2012).

Bacillus clarkii são alcalifílicas obrigatórias (YOSHIMUNE et al., 2010), pH ótimo de crescimento entre 9 e 10, crescimento microbiano entre 15 e 45°C, tolerantes a presença de 16% NaCl, Gram-positivas (NIELSEN et al., 1995) e anaeróbias facultativas (NIELSEN et al., 1995; JARREL et al., 1997). As cepas de *B. clarkii* caracterizadas por Nielsen e colaboradores (1995) foram isoladas do solo. Estudos da produção de ciclodextrinas por esses bacilos foram investigados por Takada et al., (2002); Nakagawa et al., (2008); Nakagawa et al., (2010) e Wu e colaboradores (2012).

5.5 Utilização de carboidratos

Para verificar a utilização de alguns carboidratos pelas cepas isoladas, foram utilizados frutose, glicose, lactose, manitol, sacarose e xilose. O extrato de levedura serviu como controle. A Tabela 6 apresenta os resultados quanto ao crescimento das cepas. Dentre as fontes de carbono analisadas no presente estudo, a utilização da glicose como substrato obteve melhores crescimentos em todas as cepas testadas. A cepa BRA1 cresceu bem em glicose, manitol, frutose e sacarose. Praticamente não houve utilização de lactose e xilose que foram semelhantes ao do extrato de levedura (FIGURA 14).

Tabela 6- Crescimento em diferentes fontes de carbono.

Carboidratos	Cepa BRA1	Cepa BRA3	Cepa BRA5	1*
E.L	+	++	+	s.r
Frutose	++	++	++	+
Glicose	+++	+++	+++	+
Lactose	-	-	-	-
Manitol	++	++	++	s.r
Sacarose	++	++	++	+
Xilose	-	-	-	v

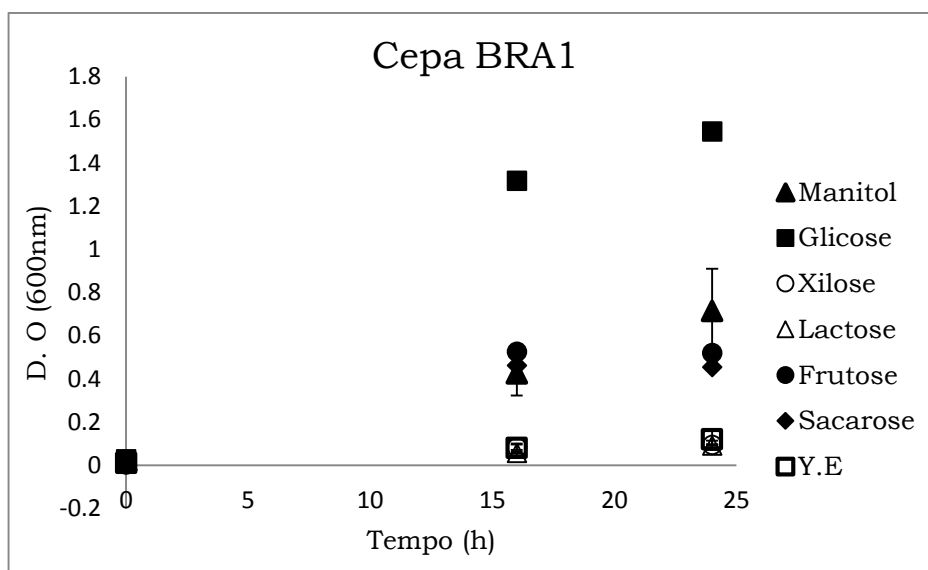
¹ *B. pseudofirmus*

+, leve; ++, médio; +++, bom.

E.L- extrato de levedura

* s.r, sem resultados na literatura; +, crescimento positivo; -, negativo e; v, variado.

Fonte: Da autora

Figura 14- Curva de crescimento da Cepa BRA1 nas diferentes fontes de carbono.

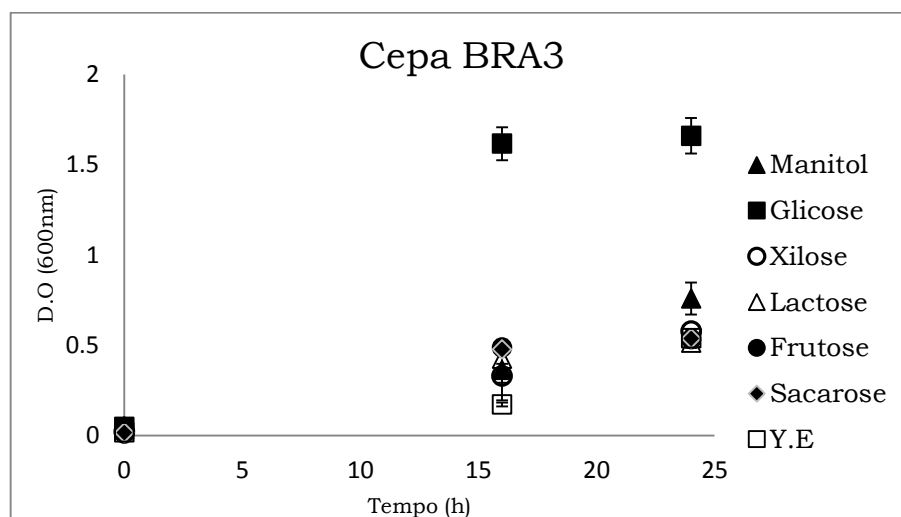
Fonte: Da autora.

Comparando o crescimento entre as cepas BRA1 e BRA5, BRA1 apresentou maior crescimento celular apenas em glicose e manitol, 1,5 e 0,7, respectivamente, contra 1,2 em glicose e 0,56 em manitol da cepa BRA5. A cepa BRA1, para todos os carboidratos, teve desempenho inferior à cepa BRA3.

A cepa BRA3 (identificada como *B. pseudofirmus*) registrou densidade óptica superior a 0,5 em todos os substratos verificados. Dentre as fontes de carbono testadas, a glicose favoreceu melhor crescimento, quase o dobro do verificado em manitol. As demais fontes de carbono: frutose, sacarose, xilose e lactose, obtiveram

crescimentos semelhantes ao meio contendo apenas extrato de levedura, com diferença entre eles de apenas 0,02 a 0,04 unidades de D.O (FIGURA 15). Em todos os substratos, a cepa BRA3 foi a que apresentou melhor crescimento celular. Nielsen e colaboradores (1995) caracterizaram *B. pseudofirmus* e também verificaram a utilização dos açúcares glicose, frutose e sacarose e não realizaram testes com manitol para *B. pseudofirmus*. Os autores testaram a utilização da xilose e em 55% das cepas não houve utilização dessa fonte de carbono. Não houve crescimento em meio contendo lactose (NIELSEN et al., 1995). Os resultados do presente trabalho para a cepa BRA3 estão de acordo com os encontrados por Nielsen e colaboradores (1995). Além da utilização das fontes de carbono citadas acima, Nielsen e colaboradores verificaram ainda a utilização das seguintes fontes de carbono: celobiose, glicerol, maltose, trealose e N-acetilglucosamina; Mais de 55% das cepas de *B. pseudofirmus* foram capazes de utilizar amido, gluconato, glicogênio, salicina, manose e ribose; entre 5 e 40% das cepas cresceram em D-arabinose, L- arabinose, galactose, inositol, α -metil-D-glucosídeo, xilitol, entre outros e; crescimento negativo em raminose, sorbitol, melibiose, dulcitol, rafinose e outros.

Figura 15- Curva de crescimento da Cepa BRA3 nas diferentes fontes de carbono.

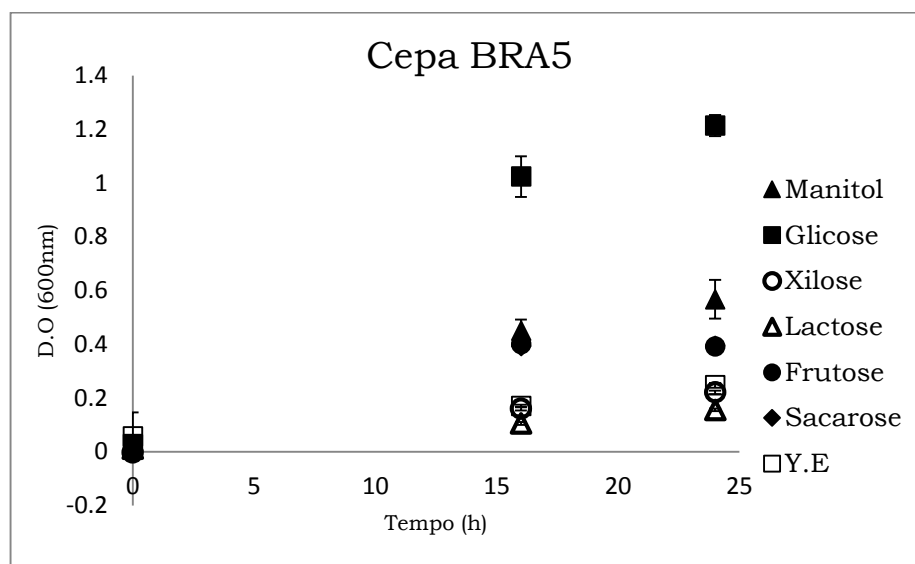


Fonte: Da autora.

A cepa BRA5 não se diferenciou do comportamento das demais cepas e também teve melhor crescimento utilizando glicose como substrato. De acordo com a Figura 16, observou-se menor crescimento em maltose, sacarose e frutose e pouquíssimo em lactose, xilose e extrato de levedura. Vale ressaltar que o valor da D.O registrado em xilose e lactose foram inferiores ao observado no meio contendo

extrato de levedura. Até onde se sabe, não há registro na literatura de testes de utilização de carboidratos para as espécies *B. clarkii* e *B. cohnii*.

Figura 16- Curva de crescimento da Cepa BRA5 nas diferentes fontes de carbono.



Fonte: Da autora.

O crescimento de todas as cepas utilizando os carboidratos xilose e lactose pode ter ocorrido devido à presença do extrato de levedura. Analisando as Figuras 14, 15 e 16, o crescimento verificado utilizando somente o extrato de levedura como substrato são iguais ou superiores aos verificados na utilização da xilose e lactose. A adição do extrato de levedura ao meio para testar a utilização dos carboidratos pode ter interferido nos resultados, induzindo assim, um falso positivo nesses dois carboidratos nas cepas BRA1, BRA3 e BRA5.

5.5.1 Produção de ácidos

A fim de verificar os ácidos produzidos pelas cepas BRA1, BRA3 e BRA5 em quatro diferentes fontes de carbono, as amostras foram diluídas (1:1) para análise cromatográfica líquida. Os resultados apresentados nas tabelas a seguir indicam a concentração de ácidos presentes ao final do ensaio.

De acordo com a Tabela 7, houve maior produção de ácidos pela cepa BRA1 quando se utilizou manitol (1,4 g/L) como substrato, seguidos de glicose (1 g/L), frutose (0,52 g/L) e sacarose (0,44 g/L). Utilizando manitol, esta cepa produziu cerca de três vezes mais ácidos orgânicos quando comparado às culturas com frutose e

sacarose. A proporção de cada ácido produzido com os diferentes substratos foi diversificada.

Tabela 7- Produção de ácidos orgânicos voláteis e não voláteis para a cepa BRA1.

Ácidos (mg/L)	Glicose	Manitol	Frutose	Sacarose
Ác. cítrico	2,66	3,44	1,51	7,36
Ác. málico	33,70	57,71	13,49	124,32
Ác. succínico	13,74	21,88	21,00	5,68
Ác. láctico	49,17	6,77	6,44	10,88
Ác. fórmico	11,30	26,39	41,70	17,55
Ác. acético	365,41	295,23	86,71	128,85
Ác. propiônico	6,62	506,13	9,68	12,71
Ác. isobutírico	250,74	249,92	207,45	88,59
Ác. butírico	0,00	2,44	3,18	0,00
Ác. isovalérico	279,42	209,61	100,35	38,29
Ác. valérico	5,51	4,17	7,91	12,83
Ác. capróico	17,49	26,11	24,71	0,00
Total	1.035,76	1.409,79	524,13	447,06

Fonte: Da autora.

Na presença do manitol, houve grande acúmulo de ácido propiônico (506,13 mg/L), acético (295,23 mg/L), isobutírico (249,92 mg/L) e isovalérico (209,61 mg/L). Somente utilizando manitol houve essa grande produção de ácido propiônico, utilizando as demais fontes de carbono, a produção foi mínima. A concentração total de ácidos verificada em manitol após o ensaio foi 1,4 g/L, isso corresponde a 15% do total de fonte de carbono oferecido (manitol) convertido em ácido. Utilizando glicose, a concentração final dos ácidos produzidos foi aproximadamente 1 g/L, isso significa que 11% do açúcar foram convertidos em ácidos. O ácido acético foi o mais produzido (365,41 mg/L), seguido dos ácidos isovalérico e isobutírico.

Menos de 6% do açúcar frutose foi convertido em ácidos (524,13 mg/L), os ácidos produzidos em maior proporção utilizando a frutose foram: ácido isobutírico, isovalérico e acético. Com sacarose, houve menor produção dos ácidos já citados, no entanto, a produção de ácido málico foi duas vezes maior que a verificada em manitol.

A cepa BRA3 produziu mais ácidos utilizando a frutose como fonte de carbono, com quase 1g/L na soma de todos os ácidos produzidos, e a menor concentração foi verificada em sacarose, com menos de 600 mg/L. Com glicose, verificou-se grande produção de ácido isobutírico, acético, málico e isovalérico. Utilizando manitol, a maior produção foi de ácido succínico, equivalente a 30% de todo ácido produzido nessa condição. O ácido fórmico, acético, isobutírico e isovalérico também representaram grande parcela dos metabólitos produzidos. Em frutose, cerca de 10% do açúcar fornecido foi convertido em ácidos, o ácido málico representou 43% de toda produção, em menores concentrações destacaram-se também os ácidos: acético, fórmico, isobutírico, láctico, succínico e isovalérico. Os ácidos produzidos em sacarose foram em menores concentrações e mais balanceados, assim como em frutose, o ácido málico teve maior produção. Os ácidos acético, láctico e fórmico foram produzidos quase que na mesma proporção (TABELA 8).

Tabela 8- Produção de ácidos orgânicos voláteis e não voláteis para a cepa BRA3.

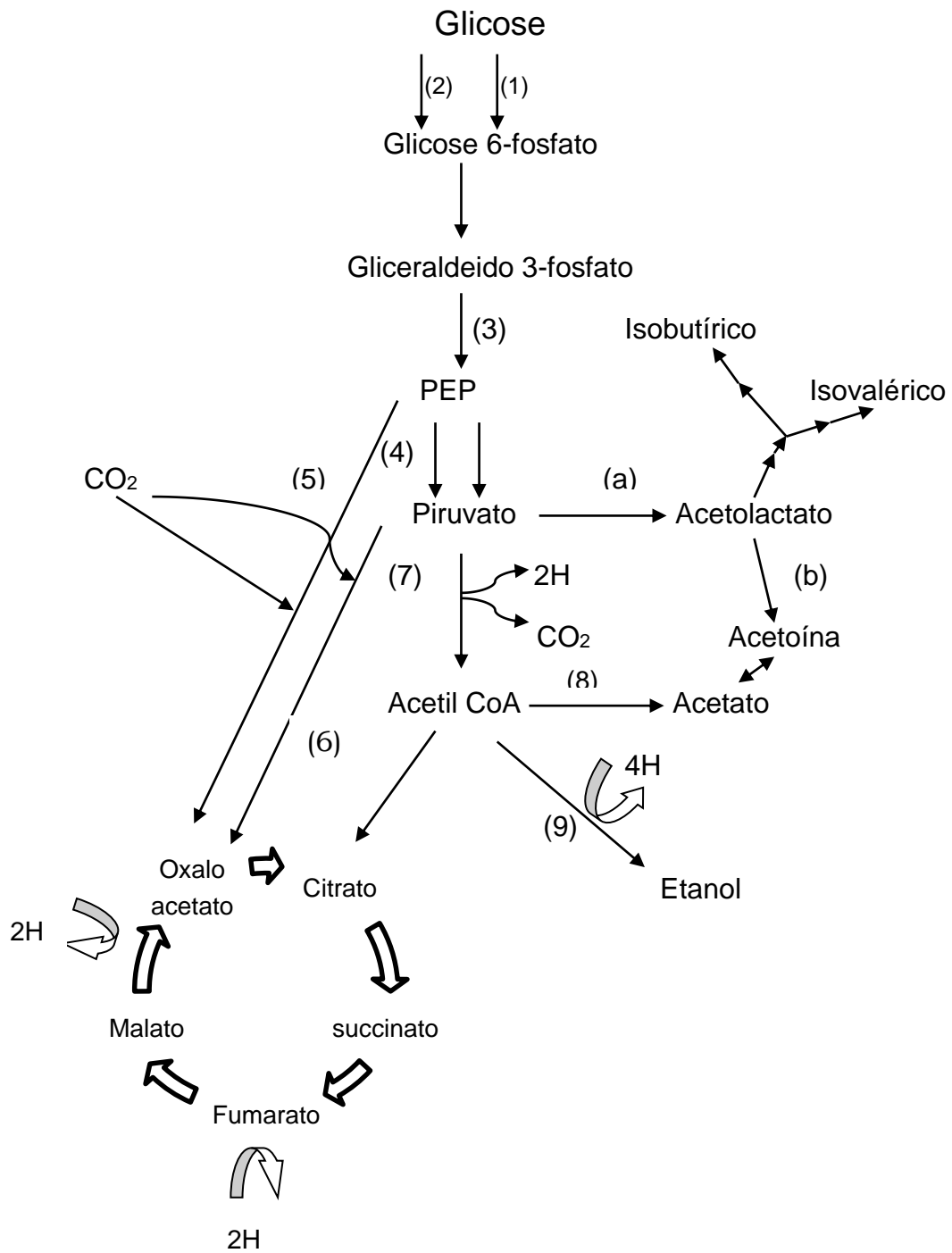
Ácidos (mg/L)	Glicose	Manitol	Frutose	Sacarose
Ác. cítrico	15,94	0,78	6,92	6,08
Ác. málico	114,99	38,62	395,91	141,60
Ác. succínico	13,82	209,70	59,01	29,22
Ác. láctico	26,64	7,87	64,85	78,71
Ác. fórmico	37,39	86,31	100,58	73,73
Ác. acético	172,59	73,36	103,96	96,72
Ác. propiônico	20,32	25,50	30,18	30,23
Ác. isobutírico	247,81	117,66	71,33	18,41
Ác. butírico	3,14	2,93	0,00	0,00
Ác. isovalérico	93,60	62,34	44,84	44,29
Ác. valérico	5,35	2,06	14,49	17,99
Ác. capríco	27,74	17,37	25,80	20,86
Total	779,34	644,49	917,87	557,85

Fonte: Da autora.

De acordo com Kulshreshtha e colaboradores (2012), *B. pseudofirmus* produz grandes quantidades de ácido acético, em diferentes fontes de carbono, devido à conversão do piruvato a acetato durante a respiração celular. A produção de ácido acético através da cepa BRA3 representou pouco mais de 20% dos metabólitos de glicose; 11% em manitol; 11% em frutose e 17% em sacarose. Para a cepa estudada no presente estudo, utilizando a glicose como substrato, o ácido isobutírico teve maior produção. Isso pode se dever ao fato de o piruvato obtido na glicólise converter-se na síntese do acetolactato, levando a produção do ácido isobutírico e isovalérico (FIGURA 17), e possivelmente ao acético (SPECK; FREESE, 1973).

Figura 17- Esquema do processo de respiração e fermentação em vários microrganismos.

- | | |
|--------------------------------------|--|
| (1) PTS | (7) Piruvato desidrogenase |
| (2) Glicosinase | (8) Fosfacetil transferase e aceto quinase |
| (3) Gliceraldeído fosfodesidrogenase | (9) Acetaldeído desidrogenase e álcool desidrogenase |
| (4) Piruvato quinase | (a) Síntese acetolactase |
| (5) PEP carboxilase | (b) Acetolactase decarboxilase |
| (6) Piruvato carboxilase | |



Fonte: Adaptado de SPECK; FREEZE, 1973; VEMURI et al., 2002.

Dentre as fontes de carbono testadas, a cepa BRA5 produziu mais ácidos utilizando a glicose como substrato (TABELA 9). Os ácidos produzidos em glicose foram pelo menos 1,5 vez maior que em frutose; 2.3 vezes mais que em manitol e quase três vezes o produzido em sacarose. Os ácidos mais produzidos com glicose foram os ácidos isobutírico, acético e isovalérico. Os três ácidos sozinhos representam quase 90% dos ácidos produzidos nessa condição. Os ácidos succínico e láctico também foram produzidos em menores concentrações.

Tabela 9- Produção de ácidos orgânicos voláteis e não voláteis para a cepa BRA5.

Ácidos (mg/L)	Glicose	Manitol	Frutose	Sacarose
Ác. cítrico	3,70	1,51	8,97	4,47
Ác. málico	7,87	13,53	370,08	96,67
Ác. succínico	80,11	21,00	13,30	3,18
Ác. láctico	41,66	6,44	17,69	9,73
Ác. fórmico	10,54	41,70	26,16	8,57
Ác. acético	401,17	87,11	64,23	67,90
Ác. propiônico	11,99	9,68	10,68	10,68
Ác. isobutírico	415,10	207,45	222,78	203,05
Ác. butírico	0,00	3,18	2,02	1,34
Ác. isovalérico	271,00	100,35	0,50	14,32
Ác. valérico	2,49	7,91	2,14	2,17
Ác. capróico	0,00	24,71	23,40	24,36
Total	1.245,63	524,13	761,96	446,44

Fonte: Da autora.

Utilizando manitol, a maior concentração foi do ácido isobutírico (cerca de 40%) seguido do ácido isovalérico, acético e fórmico. Em frutose também houve elevada concentração do ácido isobutírico, mas a maior produção foi do ácido málico, os dois juntos representaram aproximadamente 78% dos ácidos, nessa

condição, praticamente não houve acúmulo do ácido isovalérico. Utilizando a sacarose, o maior acúmulo de ácido foi do isobutírico, málico e acético.

O que se pôde perceber nesse experimento foi que, o comportamento das cepas BRA1, BRA3 e BRA5 foi diferenciado para cada substrato metabolizado, assim como a concentração dos ácidos diferiram. Os ácidos: isobutírico, isovalérico e acético, são ácidos formados por via fermentativa em que o piruvato é convertido para a síntese de acetolactato (SPECK; FREESE, 1973), por outro lado, os ácidos málicos e succínicos são resultantes da respiração aeróbia. A presença desses ácidos (após 24 horas de incubação das cepas utilizando as diferentes fontes de carbono) pode indicar que as cepas seguiram rotas de respiração aeróbia e fermentativas nos ensaios. Como a quantificação dos ácidos produzidos só ocorreu na fase final do experimento, não foi possível saber a cinética de produção dos ácidos ao longo do ensaio.

De acordo com Janto e colaboradores (2012), *B. pseudofirmus* exige muita energia para manter crescimento em meio com pH acima de 9,5, principalmente submetido a aerobiose. A hipótese para os metabólitos produzidos via fermentação, identificados na análise cromatográfica para as cepas BRA1, BRA3 e BRA5 é que, mesmo submetidas à aerobiose, as cepas tenham preferido outras rotas respiratórias para melhor crescimento e adaptação ao meio alcalino.

Paavilainen et al. (1994) estudaram a produção de ácidos a partir de fontes de carbono diversas por bacilos alcalifílicos, sendo eles *Bacillus circulans* var. *alkalophilus*, *B. alcalophilus* ssp. *halodurans*, *B. alcalophilus* e *Bacillus* sp. 17-1. A produção de ácidos utilizando as mesmas fontes de carbono (glicose, manitol, frutose e sacarose) utilizadas no presente estudo, indicou maior produção de ácido acético para todas as cepas, com exceção de uma que, utilizando sacarose, a produção de outros ácidos foi superior ao acético, entre eles: ácido isovalérico e ácido láctico (PAAVILAINENT et al., 1994).

Os ácidos cítrico e oxálico foram os metabólitos mais produzidos pelos fungos utilizando a glicose como fonte de carbono (GHORBANI et al., 2008). Utilizando as espécies *Penicillium* e *Aspergillus Níger*, o pH do meio diminuiu mais de 3 unidades, sendo pH inicial aproximadamente 6 para ambos os casos. Após 15 dias iniciado os ensaios, verificou-se o aumento do pH, que retornou ao valor inicial. Esse aumento pode ter ocorrido devido ao consumo dos metabólitos produzidos após o esgotamento da fonte de carbono (GHORBANI et al., 2008).

Krishna e colaboradores (2014) isolaram diversos microrganismos da lama vermelha na Índia e utilizaram-no para o tratamento da mesma. Nesse estudo (KRISHNA et al., 2014) verificam a produção de ácidos dos isolados a partir de diversas fontes de carbono, utilizando meio de cultivo alcalino (pH 10). O ácido mais produzido foi o ácido acético com todos os isolados, além do acético, houve produção do ácido succínico para uma única cepa. Algumas cepas não registraram produção de ácidos, mesmo em glicose (KRISHNA et al., 2014).

Kulshreshtha e colaboradores (2010) verificaram a produção de ácidos para o gênero *Exiguobacterium* e encontraram metabólitos de ácidos carboxílicos. O ácido acético foi o principal metabólito produzido, utilizando sacarose como substrato; na comparação entre três fontes de carbono (glicose, frutose e sacarose), a produção do ácido fórmico foi maior utilizando a sacarose (KULSHRESHTHA et al., 2012).

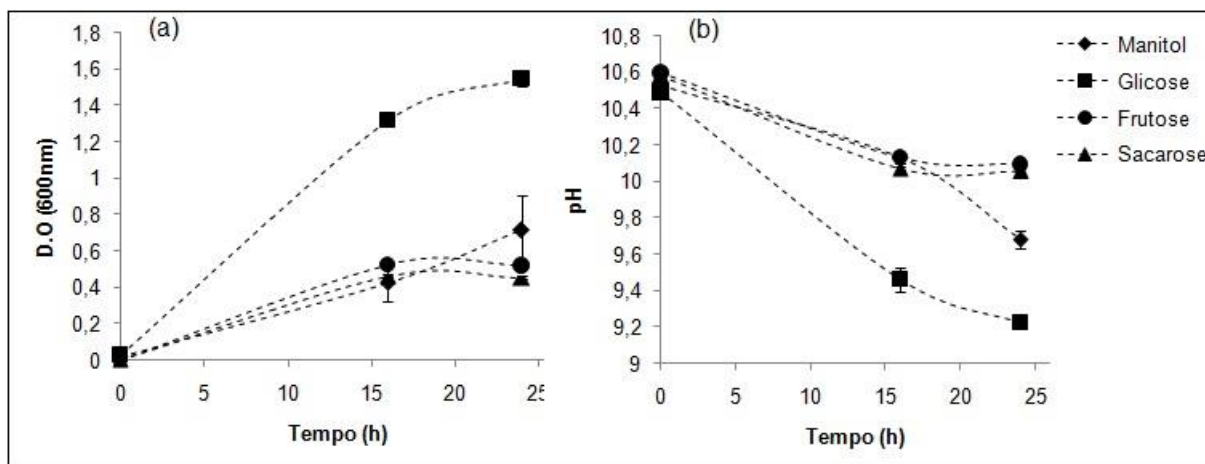
Kulshreshtha e colaboradores (2012) verificaram que a duração do ensaio influencia na concentração dos ácidos, o mesmo foi verificado por Paavilainen e colaboradores (1994) que em 48 horas de ensaio, a produção de ácidos representava quase o dobro do verificado em 24 horas. A concentração de ácidos do presente trabalho pode ter sido inferior aos produzidos por Paavilainen e colaboradores (1994) devido a duração do ensaio. Foi verificado também que a concentração dos ácidos continuam a aumentar mesmo depois de atingir o pH mínimo (KULSHRESHTHA et al., 2012; PAAVILAINENT et al., 1994). A predominância do ácido acético relatado em grande parte dos estudos citados aqui nesta seção, à diferença deste estudo, onde verificou-se a presença significativa de outros ácidos, pode também estar relacionado à diferenças no tempo de ensaio. A aeração, bem como o nível de alcalinidade do meio, são fatores que também influenciam na produção de ácidos para as bactérias alcalifílicas (PAAVILAINENT et al., 1994).

5.5.2 Relação do crescimento celular com o pH e a produção de ácidos nas diferentes fontes de carbono.

A Figura 18 (a) apresenta o crescimento celular e (b) a alteração do pH nas diferentes fontes de carbono. Dentre as fontes de carbono testadas, utilizando glicose, a cepa BRA1 teve o melhor crescimento (D.O= 1,54), diminuição do pH em 1,2 unidade e a produção de ácidos foi em torno de 1 g/L (TABELA 10). Com

manitol, houve redução de quase uma unidade de pH e a maior concentração de ácidos.

Figura 18- Crescimento populacional e alteração do pH do meio na presença de diferentes fontes de carbono em cultura da cepa BRA1.



Fonte: Da autora.

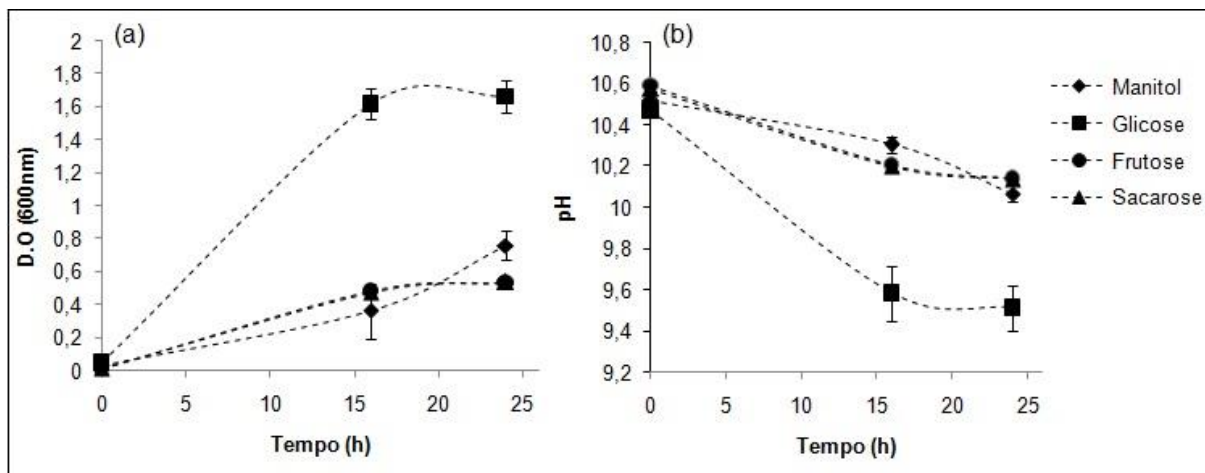
Tabela 10- Resultado dos ensaios utilizando diferentes fontes de carbono para cepa BRA1 com densidade óptica, pH inicial e final e produção total de ácidos.

Ensaio	D.O o	D.O f	pH o	pH f	pHo – pH f	Ácidos (mg/L)
Glicose	0,02	1,54	10,5	9,2	1,3	1.035,76
Manitol	0,02	0,7	10,53	9,68	0,84	1.409,79
Frutose	0,004	0,52	10,59	10,09	0,5	524,13
Sacarore	0,004	0,45	10,58	10,05	0,53	447,06

Fonte: Da autora.

Para a cepa BRA3, o meio contendo frutose e sacarose alcançaram os mesmos valores de D.O (FIGURA 19a) e pH (FIGURA 19b), mas a concentração dos ácidos metabólitos produzidos diferenciaram em quase 400mg/L (TABELA 11). Em frutose houve o maior acúmulo de ácidos. Mas em glicose houve maior crescimento celular e diminuição do pH (quase 1 unidade de pH).

Figura 19- Crescimento populacional e alteração do pH do meio na presença de diferentes fontes de carbono em cultura da cepa BRA3.



Fonte: Da autora.

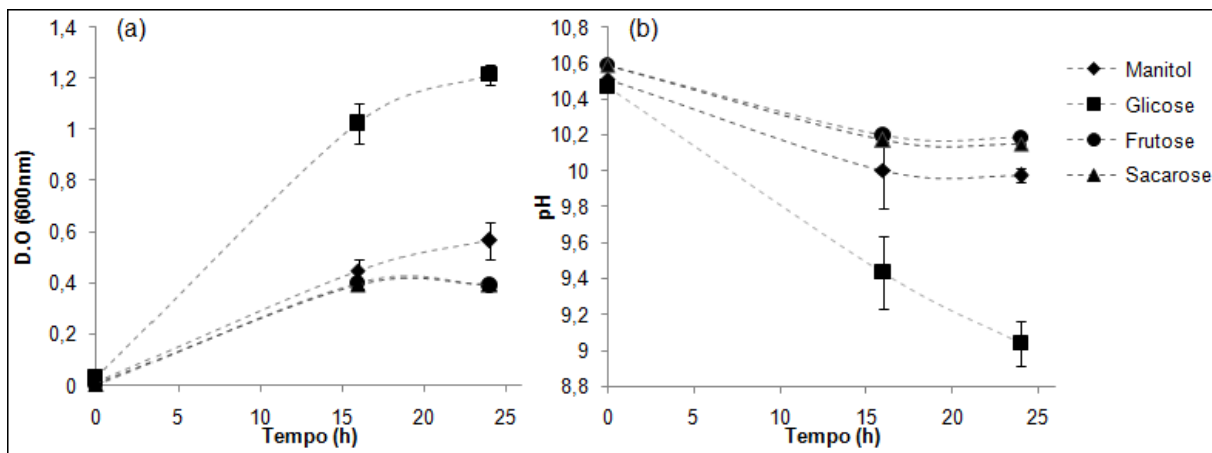
Tabela 11- Resultado dos ensaios utilizando diferentes fontes de carbono para cepa BRA3 com densidade óptica, pH inicial e final e produção total de ácidos.

Ensaio	D.O o	D.O f	pH o	pH f	pHo – pH f	Ácidos (mg/L)
Glicose	0,04	1,65	10,47	9,51	0,96	779,34
Manitol	0,03	0,75	10,52	10,06	0,45	644,49
Frutose	0,009	0,53	10,59	10,14	0,45	917,87
Sacarore	0,015	0,53	10,57	10,13	0,44	557,85

Fonte: Da autora.

O comportamento verificado na cepa BRA5 diferenciou-se das demais cepas, pois, a maior produção de ácidos foi verificada no meio contendo glicose, onde houve maior diminuição de pH (FIGURA 20b) e maior crescimento celular (FIGURA 20a), dentre as quatro fontes de carbono testadas. O pH diminuiu quase 1,5 unidade utilizando a glicose, foi a maior diminuição verificada entre as 3 cepas (TABELA 12).

Figura 20- Correlação de crescimento populacional e alteração do pH do meio na presença de diferentes fontes de carbono em cultura da cepa BRA5.



Fonte: Da autora.

Tabela 12- Resultado dos ensaios utilizando diferentes fontes de carbono para cepa BRA5 com densidade óptica, pH inicial e final e produção total de ácidos.

Ensaio	D.O o	D.O f	pH o	pH f	pHo – pH f	Ácidos (mg/L)
Glicose	0,02	1,2	10,47	9,04	1,43	1.245,63
Manitol	0,01	0,56	10,51	9,97	0,53	524,13
Frutose	0,003	0,39	10,59	10,18	0,40	761,96
Sacarore	0,004	0,39	10,58	10,14	0,44	446,44

Fonte: Da autora.

Analisando as Tabelas 7, 8 e 9, onde houve diminuição mais significativa do pH (em meio contendo glicose) para as cepas testadas, houve também maior produção dos ácidos acético, isobutírico e isovalérico, esses ácidos também foram verificados em outros bacilos alcalifílicos. O ácido propiônico produzido em alta concentração pela cepa BRA1 (0,5 g/L) utilizando manitol bem como os ácidos isobutírico e isovalérico são ácidos produzidos a partir de aminoácidos, de acordo com Paavilainen e colaboradores (1994). O pKa dos metabólitos produzidos (entre 3,77 a 5,2) indicam que os ácidos produzidos são considerados ácidos fracos mas a diferença em uma unidade de pKa dos ácidos pode alterar em até 2 unidades de pH no meio.

De acordo com Paavilainen e colaboradores (1994) os ácidos isobutírico, isovalérico e láctico são ácidos comumente produzidos por bacilos neutrofílicos, mas a produção de ácido succínico (produzido pelas cepas BRA1, BRA3 e BRA5 do

presente trabalho) por bacilos é rara. O esgotamento da fonte de carbono e a entãõ utilização dos metabólitos produzidos pode justificar a menor concentraçãõ de ácidos apresentada pelas cepas BRA1 e BRA3 utilizando glicose (Tabela 7 e 8). O *B. subtilis* (bacilo neutrofilico) foi estudado por Speck e Freese (1973), que explicam que após exaustãõ do açucar, *B. subtilis* oxida os ácidos produzidos para evitar a acidificaçãõ excessiva.

A reduçãõ do pH verificada nos ensaios pode estar relacionada a produçãõ de ácidos, o que foi verificado por Paavilainen e colaboradores (1994) e Kulshreshtha e colaboradores (2012). A diminuiçãõ do pH nos ensaios realizados no presente estudo podem indicar também a remoçãõ de bases (consumo de alcalinidade) pelas cepas estudadas como verificado por Kulshreshtha e colaboradores (2012).

Paavilainen e colaboradores (1994) verificaram o crescimento em diversas fontes de carbono e a relaçãõ com o pH para quatro bacilos alcalifílicos distintos. Em meio utilizando glicose como substrato, o máximo crescimento foi D.O igual a 4 e o mínimo pH atingido foi 8.5 (pH inicial = 10,5) para *Bacillus circulans* var. *alkalophilus*; utilizando amido como substrato, o mesmo bacilo obteve crescimento maior quando comparado ao da glicose mas o menor pH alcançado foi de 8.7, outros resultados semelhantes foram encontrados com outros bacilos investigados (PAAVILAINENT et al., 1994). Esse comportamento não foi verificado nos estudos realizados com as cepas BRA1, BRA3 e BRA5, pois, onde houve maior crescimento celular houve também maior queda do pH.

A reduçãõ do pH em até 1,5 unidade verificada nos ensaios do presente estudo pelas cepas estudadas mostraram-se promissoras na neutralizaçãõ de efluentes alcalinos. Paavilainen e colaboradores (1994) observaram o consumo de aproximadamente 60 mmol de HCl para diminuir o pH de 10 para 9 e o consumo de 9 para 8 de apenas 25 mmol de HCl. Gräfe et al., (2009) relata a capacidade de neutralizaçãõ dos ácidos no resíduo de bauxita e aponta que para neutralizar a lama vermelha com pH inicial superior a 10 é necessário aproximadamente 1,2 mol H⁺ kg⁻¹ de resíduo.

Kulshreshtha et al., (2010) e Jain et al., (2011) compararam a neutralizaçãõ biológica de efluentes alcalinos com meios convencionais em que utilizaram ácidos minerais, verificando sólidos totais dissolvidos (STD) ao final do experimento. Kulshreshtha et al., (2010) constataram que STD aumentou em 3,5% utilizando ácido mineral na neutralizaçãõ e houve reduçãõ de 0,6% com tratamento biológico

quando comparados ao meio sem tratamento. Jain et al., (2011) relataram diminuição de STD entre 19 a 22% com tratamento biológico e aumento de 29 a 43% com tratamento químico, dependendo do ácido utilizado na neutralização do meio em comparação ao controle sem tratamento.

A utilização de ácidos minerais no tratamento da lama vermelha aumentam a concentração de STD (Kulshreshtha et al., 2010 e Jain et al., 2011) e o aumento de STD está relacionado com a condutividade elétrica do meio (GRÄFE, et al., 2009). Além de ser um tratamento com custos elevados, o manuseio desses produtos perigosos comprometem a segurança dos trabalhadores envolvidos. Assim, o uso de recursos biológicos apresenta significativas vantagens no tratamento e neutralização do resíduo de bauxita, e os resultados experimentais deste trabalho mostraram que as cepas isoladas desse ambiente são ferramentas promissoras e a compreensão da fisiologia das mesmas é essencial para a otimização e devido uso do seu potencial para esse fim.

6 CONCLUSÕES

As cepas BRA1, BRA3 e BRA5 foram isoladas, identificadas e caracterizadas como pretendido. A análise filogenética do sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S indicou que as cepas isoladas BRA1 e BRA3 possuem alto índice de similaridade com as espécies: *Bacillus cohnii* e *Bacillus pseudofirmus*, respectivamente, e a cepa BRA5 similar à *Bacillus clarkii* e *Bacillus polygoni*. Os testes bioquímicos e fisiológicos confirmaram os resultados do sequenciamento para as cepas BRA1 e BRA3 e indicam que a cepa BRA5 pertence à espécie *B. clarkii*.

A maior produção de ácidos após 24 horas de crescimento foi verificada pela cepa BRA1. Os ácidos produzidos pelas cepas BRA1, BRA3 e BRA5 indicam que mesmo sob condições aeróbias, as cepas isoladas utilizaram também às vias fermentativas. Os ácidos mais produzidos foram o acético, isobutírico e isovalérico.

Utilizando glicose como fonte de carbono, houve maior diminuição do pH do meio e maior crescimento celular para todas as cepas. O uso das cepas BRA1, BRA3 e BRA5 na redução de pH em meios alcalinos mostrou-se promissor.

7 RECOMENDAÇÕES

Como recomendações para futuros trabalhos, sugerem-se:

- Testar o crescimento das cepas do resíduo de bauxita em meios anaeróbios e verificar o comportamento do pH do meio.

- O ensaio da produção de ácidos, sugiro que o faça com duração de 48 horas, e análise dos ácidos verificar ao longo de todo o ensaio para entender quais ácidos estão sendo produzidos e, talvez, consumidos ao longo do crescimento celular.

- Realizar o tratamento biológico em escala laboratorial, utilizando o resíduo de bauxita e inoculando o consórcio bacteriano das cepas isoladas com meio de enriquecimento para verificar o comportamento do pH e de outras características físico-químicas do resíduo.

- Sugiro o sequenciamento do Genoma de pelo menos uma das cepas isoladas.

REFERÊNCIAS

- AINO, K. et al. *Bacillus polygoni* sp. nov., a moderately halophilic, non-motile obligate alkaliphile isolated from indigo balls. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 120-124, 2008.
- AONO, R; ITO, M; MACHIDA, T. Contribution of the Cell Wall Component Teichuronopeptide to pH Homeostasis and Alkaliphily in the Alkaliphile *Bacillus lentus* C-125. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 21, p. 6600–6606, Nov, 1999.
- ALVES, E. G. **Isolamento de bactérias alcalifílicas associadas aos resíduos de bauxita**. 2014. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG 2014.
- AUTHIER-MARTIN, M. et al. The mineralogy of bauxite for producing smelter-grade alumina. **JOM: the journal of the Minerals, Metals & Materials Society**, v. 53, p. 36-40, 2001.
- BOYER, E. W; INGLE, M. B; MERCER, G. D. *Bacillus alcalophilus* subsp. *halodurans* subsp. nov.: an Alkaline- Amylase-Producing, Alkalophilic Organism. **International Journal of Sistematic Bacteriology**, v. 23, no. 3, p. 238-242, July, 1973.
- Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). **Sumário Mineral Brasília: DNPM**, 2013. 137 p.
- BROSIUS, J et al. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, n. 10, p. 4801-4805, Oct, 1978.
- CHAKRAVORTY, S et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **J Microbiol Methods**, v. 69, p. 330–339, May, 2007.
- CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 840–862, Oct, 2004.
- CUCCIA, V.; OLIVEIRA, A. H. **Estudo da distribuição de radionuclídeos naturais na bauxita, processo bayer e seus produtos e resíduos**. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências e Técnicas Nucleares). Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.
- CUNHA, M. V. P. O.; CORRÊA, J. A. M. Síntese e caracterização de hidróxidos duplos a partir da lama vermelha. **Revista Cerâmica**, v. 57, p. 85-93, 2011.
- DENIZCI, A. A; KAZAN, D; ERARSLAN, A. *Bacillus marmarensis* sp. nov., an alkaliphilic, protease-producing bacterium isolated from mushroom compost. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1590–1594, 2010.

DE VOS, P. et al. (Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, New York: Springer, 2009. v. 3. P 21-127.

FRITZE, D; FLOSSDORF, J; CLAUS, D. Taxonomy of Alkaliphilic *Bacillus* Strains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 1, p. 92-97, 1990.

GHORBANI. Y; OLIAZADEH. M; SHAHVEDI. A. Aluminum solubilization from red mud by some indigenous fungi in Iran. **Journal of Applied Biosciences**, v. 7, p. 207 – 213, 2008.

GHORBEL, R. E; MAKTOUF, S; MASSOUD, E. B; BEJAR, S; CHAABOUNI, S. E. New thermostable amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a broad pH applicability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, p. 50-60, 2009.

GOTO, T. et al. Review. Cytochrome *c* and Bioenergetic Hypothetical Model for Alkaliphilic *Bacillus* spp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 4, p. 365-379, 2005.

GRÄFE, M; POWER, G; KLAUBER, C. Review of bauxite residue alkalinity and associated Chemistry. **Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation**, DMR-3610 May, 2009.

GRÄFE, M. KLAUBER, C. Bauxite residue issues: IV. Old obstacles and new pathways for in situ residue bioremediation. **Hydrometallurgy**, v. 108, p. 46–59, 2011.

GUFFANTI, A. A. et al. The protonmotive force and α -aminoisobutyric acid transport in an obligately alkaliphilic bacterium. **The journal of biological chemistry**, v. 253, n. 3, p. 708-715, Feb, 1978.

GUFFANTI, A. A; KRULWICH, T. A. Oxidative Phosphorylation by ADP + Pi-loaded Membrane Vesicles of Alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4. **The journal of biological chemistry**, v. 269, n. 34, p. 21576-21582, Aug, 1994.

HAMANA. KOEI; NIITSU, MASARU. Production of 2-phenylethylamine by decarboxylation of L-phenylalanine in alkaliphilic *Bacillus cohnii*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 45, p. 149- 153, 1999.

HAMDY, M. K.; WILLIAMS, F. S. Bacterial amelioration of bauxite residue waste of industrial alumina plants. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 27, p. 228-233. 2001.

HIRABAYASHI, T et al. Relationship between rates of respiratory proton extrusion and ATP synthesis in obligately alkaliphilic *Bacillus clarkii* DSM 8720^T. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 44, p. 265- 272, 2012.

HORIKOSHI, K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 735-750, 1999.

HUANG, X. MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res.**,v. 9, p. 868-877, 1999.

HYDRO. **Aluminium, environment and society**. Disponível em: < http://www.hydro.com/upload/Aluminium/Download/Aluminium_environment-and-society.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2014.

INTERNATIONAL ALUMINIUM INSTITUTE. **Bauxite Residue Management: Best Practice**. 32.p, Abril, 2013. Disponível em :< http://bauxite.world-aluminium.org/uploads/media/Bauxite_Residue_Management_-_Best_Practice.pdf>. Acesso em 22 jun. 2015.

JAIN, R. M et al. Biological neutralization of chlor-alkali industry wastewater. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 2377–2383, 2011.

JANDA, J. M; ABBOTT, S. L. Minireview. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls.**Journal Of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, Sept, 2007.

JANTO, B. et al. The genome of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 reveals adaptations that support the ability to grow in an external pH range from 7.5 to 11.4. **National institutes of health public access**, author manuscript. 29p. Available in PMC 2012 Dec 1.

JARREL, K. F; VYDYKHAN, T.; LEE, P.; AGNEW, M. D.; THOMAS, N. A. Isolation and characterization of bacteriophage BCJA1, a novel temperate bacteriophage active against the alkaliphilic bacterium, *Bacillus clarkii*. **Extremophiles**, v. 1, p. 199-206. 1997.

KHAITAN, S; DZOMBAK, D. A; LOWRY, G. V. Mechanisms of Neutralization of Bauxite Residue by Carbon Dioxide. **Journal of Environmental Engineering © ASCE**,p. 433-438, Jun, 2009.

KITADA, M.; HORIKOSHI, K. Sodium ion-stimulated α -[1-¹⁴C] aminoisobutyric acid uptake in alkalophilic bacillus species. **Journal of bacteriology**, v. 131, no. 3, p. 784-788, Sept, 1977.

KOJIMA. M. et al. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. **Extremophiles**, v. 10, p. 229- 235, 2006.

KRISHNA, P. **Bioremediation of bauxite residue (Red Mud) using microbes**. Dissertação de Mestrado. Thapar Institute of Engineering and Technology, Patiala, Punjab. 2003.

KRISHNA, P.; BABU, A. G.; REDDY, M. S. Bacterial diversity of extremely alkaline bauxite residue site of alumina industrial plant using culturable bacteria and residue 16S rRNA gene clones. **Extremophiles**, v. 18, p. 665-676. 2014.

KROPINSKI, A. M. et al. The genome of BCJA1c: a bacteriophage active against the alkaliphilic bacterium, *Bacillus clarkii*. **Extremophiles**, v. 9, p. 99-109, 2004.

KRULWICH, T. A. Alkaliphiles: 'basic' molecular problems of pH tolerance and bioenergetics. **Molecular Microbiology**, v. 15, p. 403-410, 1995.

KRULWICH, T. A; GUFFANTI, A. A. Alkalophilic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 43, p. 435-463. 1989.

KRULWICH, T. A; ITO, M; GUFFANTI, A. A. The Na⁺-dependence of alkaliphily in *Bacillus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1505, p. 158-168, 2001.

KULSHRESHTHA, N. M. et al. Neutralization of alkaline industrial wastewaters using *Exiguobacterium* sp. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 191-196, 2010.

KULSHRESHTHA, N. M. et al. Usefulness of Organic Acid Produced by *Exiguobacterium* sp. 12/1 on Neutralization of Alkaline Wastewater. **The scientific World Journal**, v. 2012, p. 6, 2012.

LIU, W. YANG, J. XIAO, B. Review on treatment and utilization of bauxite residues in China. **International Journal of Mineral Processing**, v. 93, p. 220- 231, 2009.

LU. Z. et al. Identification and characterization of a novel alkaline α -amylase Amy703 belonging to a new clade from *Bacillus pseudofirmus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p 783-793, May, 2014.

MA. C. et al. Alkaline extracellular reduction: isolation and characterization of an alkaliphilic and halotolerant bacterium, *Bacillus pseudofirmus* MC02. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 883- 891, 2012.

MENZIES, N. W; FULTON, I. M; MORRELL, W. J. Seawater Neutralization of Alkaline Bauxite Residue and Implications for Revegetation. **J. Environ. Qual.**, v. 33, p. 1877-1884, 2004.

NAKAGAWA. Y., et al. Gene cloning and enzymatic characteristics of a novel γ -cyclodextrin-specific cyclodextrinase from alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 2004-2011, 2008.

NAKAGAWA. Y., et al. Characterization of two γ -Cyclodextrin-specific Enzymes from *Bacillus clarkii* 7364. **J. Appl. Glycosci.**, v. 57, p. 121- 129, 2010.

NIELSEN, P.; FRITZE, D.; PRIEST, F. G. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. **Microbiology**, v. 141, p. 1745-1761, 1995.

NOGI, Y.; TAKAMI, H.; HORIKOSHI, K. Characterization of alkaliphilic *Bacillus* strains used in industry: proposal of five novel species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 2309-2315, 2005.

PAAVILAINEN, S.; HELISTO, P.; KORPELA, T. Conversion of carbohydrates to organic acids by alkaliphilic bacilli. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, p. 217-222. 1994.

PENTEADO, E.D et al. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 6137-6145, 2013.

PRASAD, A. A. S; BHASKARA RAO, K. V. Aerobic biodegradation of Azo dye by *Bacillus cohnii* MTCC 3616; an obligately alkaliphilic bacterium and toxicity evaluation of metabolites by different bioassay systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 7469-7481, 2013.

ROCHA, M. L. **Desenvolvimento de marcadores genéticos para identificação de espécies de tubarões comercializados no Brasil**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2013.

SILVA FILHO, E. B.; ALVES, M. C. M.; DA MOTTA, M. Lama vermelha da indústria de beneficiamento de alumina: produção, características, disposição e aplicações alternativas. **Revista Matéria**, v. 12, n. 2, p. 322 – 338, 2007.

SPANKA, R.; FRITZE, D. *Bacillus cohnii* sp. nv., a new, obligately alkaliphilic, oval-spore-forming *Bacillus* species with ornithine and aspartic acid instead of diaminopimelic acid in the cell wall. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, n°1, p. 150-156, 1993.

SPECK, E.L; FREESE, E. Control of Metabolite Secretion in *Bacillus subtilis*. **Journal of General Microbiology**, v. 78, p. 261-275, 1973.

TAKADA, M; NAKAGAWA, Y; YAMAMOTO, M. Biochemical and Genetic Analyses of a Novel γ -Cyclodextrin Glucanotransferase from an Alkaliphilic *Bacillus*. **J. Biochem**, v. 133, p. 317-324, 2003.

TEKİN, N. et al. Alkaline protease production of *Bacillus cohnii* APT5. **Turkish Journal of Biology**, v. 36, p. 430-440, 2012.

TOGAWA, R.C; BRIGIDO, M.M. **PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis**. 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology – IcoBiCoBi, 14th to 16th May, 2003.

TSAKIRIDIS, P. E.; AGATZINI-LEONARDOU, S.; OUSTADAKIS, P. Red mud addition in the raw meal for the production of Portland cement clinker. **Journal of Hazardous Materials**. v. 116, p. 103–110, 2004

VACHON, P.; TYAGI, R. D.; AUCLAIR, J.; WILKINSON, K. J. Chemical and biological leaching of aluminium from red mud. **Environmental Science Technology**, v. 28, p. 26-30. 1994.

VAN DE PEER, Y; CHAPELLE. S; WACHTER, R. D. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 17, p. 3381–3391, 1996.

VEMURI, G. N. et al. 2002. Effects of Growth Mode and Pyruvate Carboxylase on Succinic Acid Production by Metabolically Engineered Strains of *Escherichia coli*. **Appl. Envir. Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1715-1727.

WANG, J. et al. Isolation and characterization of an *Arthrobacter* sp. strain HB-5 that transforms atrazine. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 33, p. 259–266, 2011.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, Jun, 1987.

WU. D., et al. Gamma-Cyclodextrin Production Using Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus clarkii* 7364. **Appl. Biochem Biotechnol**, v. 167, p. 1954-1962, 2012.

YARZA. P, et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nature Reviews Microbiology**, v.12, p. 635–645, 2014.

YOSHIMUNE, K. et al. The obligate alkaliphile *Bacillus clarkii* K24-1U retains extruded protons at the beginning of respiration. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 42, p. 111-116, 2010.

YUMOTO, I. Bioenergetics of Alkaliphilic *Bacillus* spp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 4, p. 342-353, 2002.

YUMOTO, I. et al. *Bacillus horti* sp. nov., a new Gram-negative alkaliphilic bacillus. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 565-571, 1998.

YUMOTO, I. et al. Identification of facultatively alkaliphilic *Bacillus* sp. strain YN-2000 and its fatty acid composition and cell-surface aspects depending on culture pH. **Extremophiles**, v. 4, p. 285–290, 2000.