

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA POLITÉCNICA

PATRÍCIA CURY RIBEIRO

**MICRORGANISMOS DETECTADOS EM ÁREAS CONTAMINADAS POR
RESÍDUOS DE MINERAÇÃO: REVISÃO DOS PRINCIPAIS BIOINDICADORES**

São Paulo
2022

PATRÍCIA CURY RIBEIRO

**MICRORGANISMOS DETECTADOS EM ÁREAS CONTAMINADAS POR
RESÍDUOS DE MINERAÇÃO: REVISÃO DOS PRINCIPAIS BIOINDICADORES**

Versão Corrigida

Monografia apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Especialista em Gestão de Áreas Contaminadas, Desenvolvimento Urbano Sustentável e Revitalização de Brownfields.

Orientador(a): Dra. Valéria Guimarães Silvestre Rodrigues

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-Publicação

Ribeiro, Patrícia Cury

MICRORGANISMOS DETECTADOS EM ÁREAS CONTAMINADAS POR RESÍDUOS DE MINERAÇÃO: REVISÃO DOS PRINCIPAIS BIOINDICADORES / P. C. Ribeiro -- São Paulo, 2022.

55 p.

Monografia (MBA em MBA em Gestão de Áreas Contaminadas, Desenvolvimento Urbano Sustentável e Revitalização de Brownfields) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Mineração 2.Bactérias 3.Chumbo 4.Cádmio 5.Arsênio I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente ao meu vovô Elsio, Nassim e vovó Joana que não estão mais aqui, mas que sempre estão guiando meu caminho, cuidando de mim a cada viagem a trabalho e dando forças para continuar! Espero que vocês olhem de cima e tenham muito orgulho de mim e da minha trajetória!

Dedico também a minha vovó Janete que está sempre preocupada com todos os meus passos, rezando a cada viagem e que hoje é o alicerce da minha família materna.

Dedico aos meus pais, minha irmã e a minha sobrinha Marion por sempre estarem ao meu lado, me colocando para cima e me dando espaço e oportunidade de estudar sempre, que é exatamente o QUE AMO FAZER.

AMO VOCÊS MAIS QUE TUDO!

Minha trajetória só tem sentido com vocês ao meu lado!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por sempre me dar força e motivos para buscar novos caminhos e me ajudar no meu processo interno de cura perante tudo o que vivi no mestrado.

À minha família (minha mãe Lilian, meu pai Décio e minha irmã Priscila) por me aplaudir de pé a cada vitória, pela paciência até eu me encontrar profissionalmente e por terem me dado todo o apoio ao final do mestrado para não seguir mais a carreira acadêmica (que ainda é um sonho futuro) mas que na época não fazia mais sentido para mim.

Especialmente aos meus pais que entenderam o quanto eu amo estudar e gosto de estar sempre me atualizando, e se ofereceram a pagar o curso para mim, o que gerou conquistas extremamente gratificantes.

À minha orientadora Valéria, que de professora passou a amiga, por quem admiro muito por toda ajuda, simplicidade, paciência e o mais importante – por me mostrar o quanto a carreira acadêmica pode ser muito inspiradora quando se ama e se dedica inteiramente à profissão. As nossas reuniões que eram estritamente para tratarmos da monografia se tornaram conversas de amigas e de conselhos muito valiosos que você foi passando para mim. Tive sorte em ter você como orientadora. Muito obrigada, de coração!

À toda equipe do MBA pela disposição em ajudar, aos professores pelas aulas muito boas e completas e por estarem sempre prontos para tirarem as dúvidas da turma. Por ser bióloga, mais de 50% das disciplinas foram temas extremamente novos para mim, o que me fez aproveitar muito mais o curso como uma área nova de oportunidade de trabalho.

Aos meus colegas de turma do MBA pelas dicas no grupo, oportunidade que foram compartilhadas, dúvidas que foram tiradas e por todas as conversas que tivemos!

Às minhas amigas mais próximas que conheci no curso: Taisi, Ariane e Aline! Muito obrigada pelas conversas e pela amizade! Compartilhamos tantas dúvidas que parecia que estávamos todas em uma mesma sala estudando!

Em especial à Yael que através de uma conversa me deu a grande oportunidade de ingressar no mundo corporativo! Muito, muito obrigada!

Para todos que fazem parte da minha vida hoje, me ajudando a crescer pessoalmente e profissionalmente: **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

RIBEIRO, P. C. Microrganismos detectados em áreas contaminadas por resíduos de mineração: revisão dos principais bioindicadores. 2022. 55 f. Monografia (MBA em Gestão de Áreas Contaminadas, Desenvolvimento Urbano Sustentável e Revitalização de Brownfields) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Um dos assuntos que mais esteve em evidência nos últimos anos devido ao rompimento de duas barragens, foi a contaminação causada pelos elementos potencialmente tóxicos nesses locais e as consequências futuras para o meio ambiente. Dentre os componentes do ambiente, o solo é um dos que mais sofre modificações, principalmente em sua população microbiana local. Essa população microbiana pode sofrer diferentes interferências de acordo com o elemento potencialmente tóxico presente e sua concentração, apresentando resultados positivos ou negativos. Por esses fatores, a diversidade microbiana é hoje considerada um importante bioindicador de ambientes contaminados. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi fazer uma revisão bibliográfica sobre os principais microrganismos (bactérias) empregados como bioindicadores em áreas de mineração contaminadas por elementos potencialmente tóxicos. Neste estudo foram priorizados trabalhos publicados no período de 2010 a 2021. As bases de dados utilizadas foram Scopus, Web of Science, Science Direct e Scielo. Os resultados encontrados indicaram que a alteração na comunidade microbiana do solo em áreas de mineração depende: dos elementos potencialmente tóxicos presentes na área contaminada, concentrações destes elementos, parâmetros do solo, clima do local, entre outros fatores. Em geral, cada estudo detectou diferentes filos, ordens e gêneros de bactérias, evidenciando ainda mais a importância da criação e utilização de um banco de dados com todas essas informações detalhadas disponíveis para consulta da comunidade científica. Além disso, percebe-se que avanços na área da genômica tem possibilitado análises mais detalhadas e completas sobre a diversidade microbiológica e sua interação com os elementos potencialmente tóxicos.

Palavras-chave: Bactérias; Chumbo; Zinco; Cádmio; Arsênio; Mineração

ABSTRACT

RIBEIRO, P. C. **Microorganisms detected in contaminated areas by mining residues: a review of the main bioindicators.** 2022. 55 p. Monografia (MBA em Gestão de Áreas Contaminadas, Desenvolvimento Urbano Sustentável e Revitalização de Brownfields) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

One of the issues that has been most in evidence in recent years due to the rupture of two dams was the contamination caused by potentially toxic elements in these places and the future consequences for the environment. Among the components of the environment, the soil is one of the most affected, especially in its local microbial population. This microbial population can suffer different interferences according to the potentially toxic element present and its concentration, presenting positive or negative results. Due to these factors, microbial diversity is now considered an important bioindicator of contaminated environments. In this context, the objective of this research was to review the literature on the main microorganisms (bacteria) used as bioindicators in mining areas contaminated by potentially toxic elements. In this study, works published between 2010 and 2021 were prioritized. The databases used were Scopus, Web of Science, Science Direct and Scielo. The results found indicated that the alteration in the soil microbial community in mining areas depends on: the potentially toxic elements present in the contaminated area, concentrations of these elements, soil parameters, local climate, among other factors. In general, each study detected different phyla, orders and genera of bacteria, further highlighting the importance of creating and using a database with all this detailed information available for consultation by the scientific community. Furthermore, advances in genomics have enabled more detailed and complete analyzes of microbiological diversity and its interaction with potentially toxic elements.

Keywords: Bacteria; Lead; Zinc; Cadmium; Arsenic; Mining

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma com as seis etapas na elaboração da revisão bibliográfica tradicional.....	19
Figura 2 - Técnica de polimorfismo em comprimento de fragmentos obtidos por restrição enzimática.....	37
Figura 3 - Esquema com as etapas da PCR	38
Figura 4 - Amostras de mesmo comprimento, mas com diferentes sequências de pares de bases, detectadas pelo método de DGGE.....	40
Figura 5 - Dissociação da molécula de DNA no gel desnaturante da forma helicoidal para a forma de um fragmento parcialmente dissociado.....	40
Figura 6 - Esquema representando desoxinucleotídeo e didesoxinucleotídeos, que se diferenciam pela ausência da hidroxila (OH) no carbono 3' do didesoxinucleotídeo; Representação do sequenciamento pelo método de Sanger, no qual em cada tubo é adicionado um tipo de didesoxinucleotídeo marcado junto com os demais desoxinucleotídeos. Após vários ciclos de reação de amplificação, os produtos dos tubos são submetidos à eletroforese, permitindo a leitura das sequências.....	41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Listagem de autores que correlacionaram os elementos potencialmente tóxicos com diferentes microorganismos.....	17
Tabela 2 - Trabalhos publicados com os respectivos poluentes e organismos encontrados.	22
Tabela 3 - Elementos potencialmente tóxicos e suas respectivas concentrações normais e limites de concentrações aceitáveis no solo.	23
Tabela 4 - Grupos de microorganismos relacionados aos elementos potencialmente tóxicos.	24
Tabela 5 - Relação entre alguns fatores ambientais e suas respectivas condições ótimas.	25
Tabela 6 - Microbiota geneticamente modificada, microorganismos correspondentes e respectivas referências.....	31
Tabela 7 - Índices de diversidade microbiana, a equação utilizada e uma breve descrição.	34

ÍNDICE DE SIGLAS E SÍMBOLOS

16s – pequena subunidade 30s de ribossomos procarióticos

Ag – Prata

Al – Alumínio

As – Arsênio

Au – Ouro

B – Boro

BP – Dominância Berger-Parker

Cd – Cádmio

Co – Cobalto

CO₂ – Dióxido de carbono

Cr – Cromo

Cr³⁺ - Cromo trivalente

Cr⁶⁺ - Cromo hexavalente

CTC – Capacidade de troca catiônica

Cu – Cobre

DAM – Drenagem ácida de mina

DGGE – Eletroforese em gel de gradiente desnaturante

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Eh – Potencial redox

EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

Fe – Ferro

GC – Guanina e Citosina

GEM – Microorganismos geneticamente modificados

H⁺ - Próton sem elétron

Hg – Mercúrio

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

MG – Minas Gerais

Mn – Manganês

Mo – Molibdênio

N – Nitrogênio

Ni – Níquel

O₂ – Oxigênio

P – Fósforo

Pb – Chumbo

PCBs – Bifenilas Policloradas

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

PIB – Produto Interno Bruto

PRAD – Plano de Recuperação de Áreas Degradadas

R – Riqueza

RNA – Ácido ribonucleico

Sb – Antimônio

Se – Selênio

SNG – Sequência de nova geração

TGGE – Eletroforese em gel de gradiente de temperatura

Ti – Titânio

U – Urânio

V – Vanádio

Zn – Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
3. JUSTIFICATIVA	14
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6.1. Microrganismos no solo	20
6.2. Elementos potencialmente tóxicos e microorganismos.....	27
6.4. Técnicas para determinar a comunidade microbiana no solo.....	35
6.4.1. Isolamento e identificação de DNA no solo.....	36
6.4.2. Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante	39
6.4.3. Sequenciamento de nova geração (SNG).....	40
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

A atividade de mineração é de extrema importância para a economia brasileira. Dentre os principais fatores que explicam essa afirmação, destaca-se o equilíbrio econômico causado por essa atividade, a influência histórica, sua relação com fenômenos sociais, grande influência no Produto Interno Bruto (PIB) nacional e geração de empregos.

Com o início da extração de minérios na época do Brasil colonial, a mineração atraiu grandes interesses internacionais que culminaram em grande parte na ocupação nacional e geração de riquezas. Além disso, a mineração está diretamente ligada com o crescimento e desenvolvimento de outras atividades, oferecendo produtos para indústrias siderúrgicas, petroquímica, metalúrgicas e fertilizantes. Por esses motivos, o setor sempre recebeu altos investimentos e modernização ao longo do tempo.

Ao mesmo tempo em que a mineração traz vários benefícios para o Brasil, na contramão do desenvolvimento se destaca a preocupação com o meio ambiente e todos os seres vivos que dependem deste meio para sobreviver. Ela gera vários impactos positivos como também impactos ambientais negativos (degradação do solo, água e ar). A mineração, por ser uma atividade que degrada o meio ambiente, ela deve ser planejada. As atividades de mineração devem seguir o Plano de Recuperação de Áreas Degradadas (PRAD) e o Estudo de Impacto Ambiental e Relatório de Impacto Ambiental (EIA/RIMA).

Dois acontecimentos atuais mostram com clareza o quanto à atividade de mineração pode vir a degradar o meio ambiente: o rompimento da barragem em Mariana (MG) em 2015, que atingiu paisagens naturais chegando ao rio Doce, e a tragédia em Brumadinho (MG) em 2019 que resultou em muitas mortes, incluindo os animais e o homem. Considerados os dois maiores desastres ambientais da história do Brasil relacionados com a mineração, tem-se levantado muitas questões sobre a contaminação do meio ambiente causada durante e após a extração de minérios, e como quantificar e remediar esses locais.

Um dos maiores problemas causados pela atividade de mineração é a contaminação por elementos potencialmente tóxicos no solo, água superficial e subterrânea, ar e biota. Sabe-se que alguns elementos potencialmente tóxicos são encontrados de forma natural no meio ambiente, dependendo da formação e constituição do solo. Atividades antropogênicas como a disposição de resíduos e rejeitos podem potencializar e aumentar as concentrações destes elementos nos diferentes compartimentos. Dentre os elementos potencialmente tóxicos mais

citados na literatura relacionados com a mineração, destaca-se o cobre (Cu), zinco (Zn), chumbo (Pb), manganês (Mn), cádmio (Cd), cromo (Cr) e arsênio (As).

Reações como adsorção, oxidação, redução, precipitação e complexação mostram o quanto complexo são os diferentes tipos de comportamento químico dos elementos potencialmente tóxicos no solo. A disponibilidade desses elementos no solo é definida também pelos processos de solubilidade e lixiviação. Outros fatores que também influenciam a mobilidade desses elementos no solo são o potencial hidrogeniônico (pH), o potencial redox (Eh), a capacidade de troca de cátions (CTC), a matéria orgânica presente, a textura do solo (areia, silte ou argila), temperatura, entre outros.

Além disso, todas essas características do solo também podem influenciar na microbiota local. De acordo com as condições ambientais, pode-se encontrar diferentes microorganismos adaptados ao solo. Para sobreviver, o microorganismo precisa responder fisiologicamente de forma positiva às adversidades do ambiente. Dessa forma, estudos da microbiota local são importantes indicativos da contaminação no solo, o que classifica este grupo como bioindicador.

Os microorganismos podem apresentar diferentes resultados na mobilidade dos elementos potencialmente tóxicos, aumentando ou até diminuindo devido à sua retenção no solo. Baixas concentrações dos elementos potencialmente tóxicos podem estimular o crescimento bacteriano, embora estudos recentes também relatam que os microorganismos conseguem se adaptar a locais com altas concentrações desses elementos (Sun et al., 2020; Sharma et al., 2021). Alguns dos principais processos em que os microorganismos podem responder à presença de elementos potencialmente tóxicos no solo são: precipitação, complexação e cristalização extracelular, acumulação intracelular dependente do metabolismo microbiano, transformação redox, aumento de matéria orgânica, liberação do elemento na forma volátil e geração de compostos quelantes desses elementos.

Pesquisas tendo como objetivo verificar as comunidades de microorganismos em função do estresse gerado pela presença de elementos potencialmente tóxicos no solo vem aumentando nos últimos anos. Além disso, é importante também analisar a biodiversidade microbiana, caracterizando a espécie, a sua diversidade química e genética (comparando o grau de parentesco de cada espécie). Diferentes métodos são empregados durante esta caracterização que serão descritos posteriormente.

Logo, é extremamente importante a realização de um levantamento bibliográfico sobre este tema, visando avaliar os principais avanços e as principais lacunas em áreas de mineração.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo da presente pesquisa foi fazer uma revisão bibliográfica sobre os principais microorganismos (mais especificamente as bactérias) empregados como bioindicadores em áreas de mineração contaminadas por elementos potencialmente tóxicos, bem como caracterizar estes microorganismos de acordo com o contaminante presente, as condições de sobrevivência e fazer uma comparação entre os trabalhos já existentes sobre o tema. Também, foram abordadas as principais técnicas para detecção desses microorganismos e qual a importância de cada etapa para obtenção dos resultados esperados.

3. JUSTIFICATIVA

Por ser um assunto que ganhou maior notoriedade recentemente, essa revisão bibliográfica é importante para organizar os trabalhos já existentes, identificar pontos que devem ser explorados de forma mais profunda nos próximos projetos de pesquisa e propor novas abordagens sobre o tema como complemento dos resultados já encontrados.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

Nos últimos cem anos, inúmeras atividades humanas foram responsáveis pela contaminação de ambientes naturais por elementos potencialmente tóxicos (Jacob et al., 2018). Atividades como desenvolvimento de recursos minerais, fundição e processamento de metais, descarga de fábricas e produção de produtos químicos têm sido as maiores fontes de contaminação por elementos potencialmente tóxicos (Chen et al., 2014; Zhang et al., 2015). Dentre eles, Cr, Pb, Cu, Cd e Zn apresentam alta toxicidade, biodisponibilidade duradoura e retenção de longo prazo (Liu et al., 2005; Chen et al., 2014). Além dos metais citados anteriormente, tem-se também a contaminação por As, que é um metaloide, que é altamente tóxico.

Embora alguns elementos potencialmente tóxicos sejam necessários para os processos fisiológicos (como o Zn, Cu, entre outros), quando encontrados em altas concentrações e com acúmulo excessivo em organismos vivos, podem apresentar desvantagens. Um ecossistema sustentável depende de comunidades microbianas funcionais que desempenham papel significativo na decomposição da matéria orgânica, degradação de substâncias tóxicas, ciclagem de nutrientes, fixação de nitrogênio e produção de fitohormônios (Lewin et al., 2013;

Li et al., 2014; Goupil et al., 2015). A interação entre os elementos potencialmente tóxicos e microorganismos é relativamente nova e ainda é objeto de estudo de muitos pesquisadores.

Os microorganismos são sensíveis tanto ao excesso quanto a deficiência de elementos potencialmente tóxicos no solo, mas também possuem a capacidade de se adaptar a essas condições extremas (Kabata-Pendias, 2011). Dessa forma, eles podem ser considerados como bioindicadores de locais contaminados com esses elementos. A rápida capacidade de detectar mudanças no ambiente, de reter metais e metaloides, de sobreviver em condições adversas e a fácil detecção no solo os tornam ainda mais interessantes como bioindicadores (Zakaria et al., 2004; Avidano et al., 2005; Parmar et al., 2016).

Dentre as técnicas utilizadas para identificação e associação de comunidades e espécies microbianas com elementos potencialmente tóxicos, pode-se citar o sequenciamento de alto rendimento que nos permite identificar as composições filogenéticas das comunidades microbianas, métodos de cultura independente que conseguem amplificar sequências genéticas com o objetivo de detectar espécies bacterianas e o pareamento de sequências de DNA desconhecidas juntamente com um banco de dados, para comparação de resultados já obtidos anteriormente em outros estudos (Ma et al., 2016; Li et al., 2017).

Algumas respostas biológicas que podem modificar a toxicidade e mobilidade dos elementos potencialmente tóxicos foram descritas em microorganismos por Gadd (1990, 2004) e McBride (2007). O acúmulo de elementos potencialmente tóxicos nas paredes celulares fúngicas e bacterianas que podem imobilizar os metais, a liberação dos elementos potencialmente tóxicos na forma volátil que pode ser considerada um mecanismo de autodefesa, a geração de compostos quelantes de elementos potencialmente tóxicos, o aumento da matéria orgânica, a precipitação e a complexação podem ser algumas das respostas encontradas na literatura.

De acordo com Sumampouw e Risjani (2014), as bactérias mais encontradas em ambientes contaminados e que são bioindicadoras de poluição em geral são: *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Escherichia coli*, *Thiobacillus sp.*, *Arcobacter sp.*, *Vibrio sp.*, *Clostridia sp* e *Bifidobacterium pseudolongum*. Além disso, foram encontrados diversos trabalhos relacionando diferentes microorganismos com os elementos potencialmente tóxicos. Piotrowska- Seget, Cycón e Kozdrój (2005) relacionaram a presença de Zn e Cd com *Flavobacterium*, *Pseudomonas gladioli*, *Variovorax paradoxos* e *Methylobacterium mesopilicum*. O As, Cd, cobalto (Co), Cr, Cu, níquel (Ni), Pb, Zn e urânio (U) foram relacionados por Rastogi et al. (2011) com *Devosia*, *Rhodoplanes* e *Bradyrhizobiaceae*.

Kasemodel et al. (2019) avaliaram a contaminação de Pb, Zn e Cd em áreas de disposição de resíduos de mineração de Pb (escórias de fundição). Para isso, a área foi dividida em três locais diferentes para análises microbiológicas (NS e EW). Foi observado que as altas concentrações alteraram a comunidade microbiana do solo, e que os diferentes locais apresentaram diferentes resultados. Os principais filos detectados nas amostras foram: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Acidobacteria*. Bactérias tolerantes à presença de elementos potencialmente tóxicos, como *Rhodoplanes*, *Kaistobacter*, *Sphingomonas* e *Flavisolibacter* também foram identificadas nas amostras analisadas. A Tabela 1 relaciona alguns autores, os microorganismos detectados por eles e os elementos potencialmente tóxicos presentes em altas concentrações na área investigada.

Tabela 1 - Listagem de autores que correlacionaram os elementos potencialmente tóxicos com diferentes microorganismos.

Autor	Microorganismos	Elementos Potencialmente Tóxicos
Haller et al. (2011)	<i>Deschloromonas</i>	Cu, Zn, Cd, Pb, Cr, mercúrio (Hg)
Altimira et al. (2012)	<i>Sphingomonas</i>	Cu
Kudo et al. (2013)	<i>Anaeromyxobacter sp., Sedimentibacter sp., Geobacter sp.</i>	As
Reis et al. (2013)	<i>Devosia, Fusobacteria, Spirochaetes, Armatimonadete, Chloroflexi</i>	As, Cu, Pb, Zn
Pereira, Vicentini e Ottoboni (2015)	<i>Meiothermus, Sphingomonas, Rhodoplanes, Bradyrhizobium, Flavisolibacter</i>	Cu
Touceda-Gonzalez et al. (2015)	<i>Kaistobacter sp., Rhodoplanes, Sphingomonas sp., Mycoplana sp., Mycobacterium, Bacillus, Solibacillus, Bradyrhizobium sp., Burkholderia sp., Variovorax sp., Achromobacter, Acinetobacter sp., Erwinia sp., Staphylococcus sp., Aerococcus sp., Streptococcus sp., Deinococcus, Nitrososphaera</i>	Pb, Zn
Kasemodel et al. (2019)	<i>Proteobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria, Rhodoplanes, Kaistobacter, Sphingomonas, Flavisolibacter</i>	Pb, Zn, Cd

Fonte: Adaptado de Kasemodel et al. (2017)

Song et al. (2018), ao fazerem um experimento a longo e curto prazo, observaram que não houve diferença nos intervalos de concentração de elementos potencialmente tóxicos, além de diminuição da biomassa microbiana com o aumento das concentrações de Cu, Cd e Zn no solo. Além disso, observaram que a interação entre os fatores físico-químicos do solo com os elementos potencialmente tóxicos desempenharam um importante papel na mudança da comunidade bacteriana. O mesmo foi descrito por Sun et al. (2020), que compararam a atividade microbiana na presença de As e antimônio (Sb). Em geral, os impactos nas comunidades microbianas foram maiores na presença de As, embora a microbiota local para ambos os contaminantes, se mostraram adaptáveis mesmo em ambientes altamente contaminados.

É importante ressaltar que os exemplos citados anteriormente dependem das condições do local, dos contaminantes encontrados, da interação entre o solo com os elementos

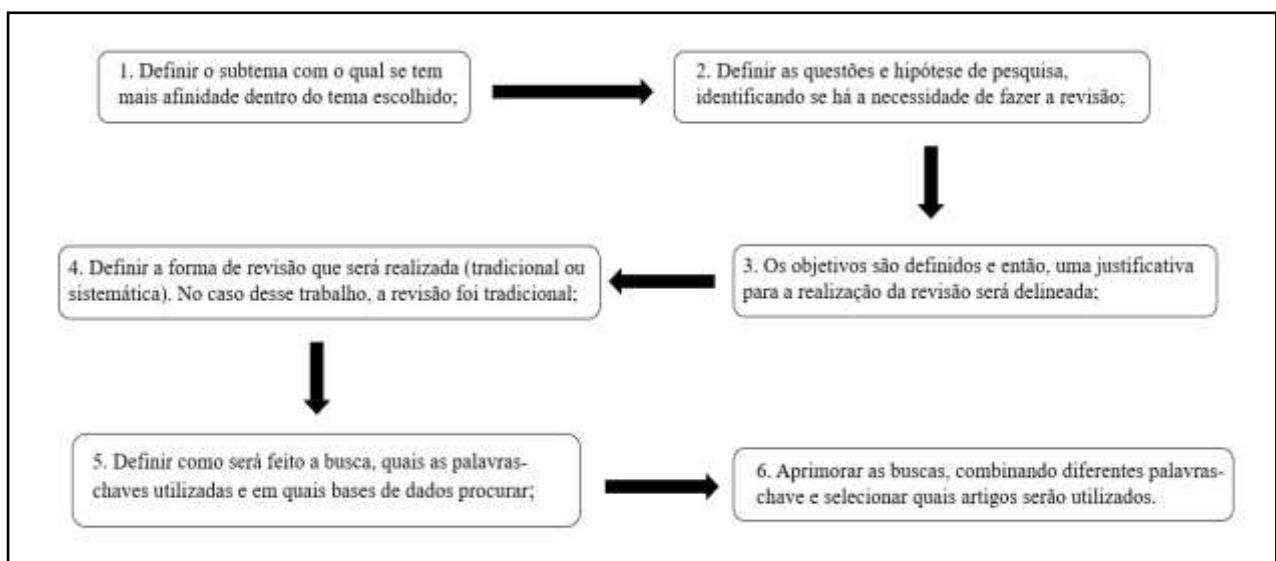
potencialmente tóxicos, da população nativa de microbiota que já reside no ambiente e da resposta da microbiota à exposição a estes elementos tóxicos. Todo esse processo é complexo e deve ser aprofundado em estudos futuros para melhor entendimento dos microorganismos mais encontrados em cada situação, e como eles são importantes bioindicadores quando se fala em atividades antropogênicas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa caracteriza-se como descritiva, retrospectiva e de revisão bibliográfica descritiva, tendo como objeto os estudos publicados sobre microorganismos como bioindicadores de locais contaminados por elementos potencialmente tóxicos relacionados com a mineração. Estes estudos foram pesquisados em periódicos nacionais e internacionais e revistas de alto impacto como Chemosphere, Science of the Total, Environmental Research, Journal of Hazardous Materials, entre outros.

As bases de dados Scopus, Web of Science, Science Direct e Scielo foram utilizadas com o objetivo de refinamento dos trabalhos que foram pesquisados primeiramente de forma mais geral no Google Acadêmico. Os critérios incluíram também trabalhos de Dissertação/Tese e livros abordando o tema pesquisado. Foram priorizados trabalhos publicados no período de 2010 a 2021. Para coleta de dados foram definidas as seguintes palavras-chave: “microorganismos”, “área de mineração”, “Pb, Zn, Cd, As”, entre outras que surgiram ao longo da pesquisa. Foi levado em consideração também o título, fonte e autores do trabalho, o ano de publicação, tipo de delineamento da pesquisa, caracterização dos resultados, ambiente de estudo, a metodologia empregada e os contaminantes utilizados em cada pesquisa. Além disso, combinações entre as palavras-chave também foram usadas conforme a necessidade. De mais de 150 artigos encontrados, após leitura e aprofundamento no tema, foram escolhidos em torno de 47 artigos para serem utilizados como base na escrita deste trabalho. Abaixo na Figura 1, um fluxograma explicativo de como foi feita a revisão bibliográfica:

Figura 1 – Fluxograma com as seis etapas na elaboração da revisão bibliográfica tradicional.



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Microrganismos no solo

O solo é um recurso natural essencial formado por fatores ecológicos, biológicos, químicos e físicos. Ele é considerado um habitat naturalmente diversificado, com comunidades biológicas complexas, onde pode-se encontrar diferentes formas de microorganismos, que interagem de inúmeras formas, tendo como objetivo manter o equilíbrio dinâmico no ambiente (Carrer Filho, 2002; Melo et al., 2017).

Por sua vez, os microorganismos são organismos de tamanho muito pequeno que podem ser observados apenas com o auxílio de microscópio. Muitas vezes no solo, eles constituem populações muito numerosas, com bilhões de indivíduos, o que possibilita visualizar essas colônias a olho nu. Os microorganismos possuem papel extremamente importante na transformação e decomposição da matéria orgânica, no fluxo de energia do solo e na ciclagem de nutrientes. São exemplos de microorganismos as bactérias, leveduras, fungos, protozoários, algas e actinomicetos (De Nobili et al., 2001).

As comunidades microbianas no solo podem apresentar diferentes estágios fisiológicos. Os três primeiros são considerados vivos: o estado ativo, potencialmente ativo e o estado dormente. No estado ativo os microorganismos estão envolvidos na utilização contínua de substratos e estão associados a transformações bioquímicas. Quando o microorganismo se encontra potencialmente ativo, ele pode ser considerado continuamente em estágio de alerta fisiológico e pode mudar para utilização de substratos dentro de minutos e até algumas horas, dependendo da situação em que o solo é submetido. O mesmo pode ser caracterizado para microorganismos em estado dormente, em que ele apenas contribui para os processos bioquímicos quando algumas propriedades do solo são alteradas. Já o último estado que é de microorganismos mortos no solo, podem incluir células lisadas e resíduos microbianos. É importante ressaltar que estes microorganismos mortos não contribuem para a maioria dos processos no solo. No entanto, as metodologias utilizadas na quantificação de microorganismos quantificam também os que estão em estágio de morte. Dessa forma, é importante conhecer o solo avaliado, as alterações observadas nele e principalmente relacionar os processos prioritariamente aos microorganismos descritos nos três primeiros estágios (Johnsen et al., 2001.; De Nobili et al., 2001.; Rousk et al., 2009.; Raubuch et al., 2010.; Blagodatskaya, Yakov Kuzyakov., 2013).

Segundo Kabata-Pendias (2011) a abundância dos microorganismos podem chegar em até 20% do total da biota no solo. Esta porcentagem pode variar com relação às características naturais e condições climáticas do solo. Além disso, os microorganismos podem ocupar até 0,5% do espaço poroso do solo, aumentando sua ocupação apenas no solo rizosférico, como consequência de maior disponibilidade de substrato (Moreira e Siqueira, 2006).

Quando se fala em alteração no solo e consequentemente em mudanças na comunidade de microorganismos residentes no ambiente, pode-se citar a contaminação desses solos com substâncias orgânicas e inorgânicas, fruto de atividades antropogênicas. Para substâncias orgânicas, o primeiro estudo registrado sobre a ação dos microorganismos em locais contaminados foi com *Pseudomonas putida* em 1974 (Prescott et al. 2002). A degradação dos poluentes orgânicos por microorganismos ocorre na presença de oxigênio pela respiração ou sob condições anóxicas por desnitrificação, sulfidogênese e metanogênese (Chatterjee et al., 2008).

Exemplos de trabalhos publicados relacionando microorganismos com diferentes substâncias orgânicas no solo pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Trabalhos publicados com os respectivos poluentes e organismos encontrados.

Poluentes	Organismos	Referências
Benzeno, antraceno, hidrocarbonetos e PCBs	<i>Pseudomonas spp</i>	Kapley et al. (1999) e Cybulski et al. (2003)
Hidrocarbonetos halogenados, aromáticos policíclicos, PCBs	<i>Alcaligenes spp</i>	Lal and Khanna (1996)
Benzeno, hidrocarbonetos, pentaclorofenol, e aromáticos policíclicos	<i>Arthrobacter spp</i>	Jogdand (1995)
Aromáticos, alcanos de cadeia longa, fenol, cresol	<i>Bacillus spp</i>	Cybulski et al. (2003)
Hidrocarbonetos halogenados	<i>Corynebacterium spp</i>	Jogdand (1995)
Aromáticos	<i>Flavobacterium spp</i>	Jogdand (1995)
Aromáticos	<i>Azotobacter spp</i>	Jogdand (1995)
Naftaleno e bifenil	<i>Rhodococcus spp</i>	Dean-Ross et al. (2002)
Aromáticos, hidrocarbonetos de benzeno ramificados	<i>Mycobacterium spp</i>	Sunggyu (1995)
Hidrocarbonetos	<i>Nocardia spp</i>	Park et al. (1998)
Aromáticos	<i>Methosinus sp</i>	Jogdand (1995)
Aromáticos	<i>Methanogens</i>	Jogdand (1995)
Hidrocarbonetos policíclicos	<i>Xanthomonas spp</i>	Jogdand (1995) e Ijah (1998)
Fenoxyacetato, hidrocarboneto halogenado	<i>Streptomyces spp</i>	Jogdand (1995)
PCBs, formaldeído	<i>Candida tropicalis</i>	Ijah (1998)
PCBs, aromáticos policíclicos	<i>Cunniughamella elegans</i>	Jogdand (1995)
PCBs	<i>P. chrysosporium</i>	Borazjani et al. (2005)

Fonte: Adaptado de (Chatterjee et al., 2008)

A contaminação no solo por substâncias inorgânicas ocorre preferencialmente quando as concentrações de elementos potencialmente tóxicos excede a concentração normalmente encontrada no solo (Tabela 3).

Tabela 3 - Elementos potencialmente tóxicos e suas respectivas concentrações normais e limites de concentrações aceitáveis no solo.

Elemento	Concentração normal no solo (mg/kg)	Limite de concentração aceitável (mg/kg)
Chumbo (Pb)	0,1–20	100
Cádmio (Cd)	0,1–1	3
Cromo (Cr)	10–50	100
Cobre (Cu)	5–20	50
Níquel (Ni)	10–50	50
Mercúrio (Hg)	0,1–1	2
Zinco (Zn)	10–50	300
Boro (B)	5–30	25
Cobalto (Co)	1–10	50
Molibdênio (Mo)	1–5	5
Selênio (Se)	0,1–5	3
Arsênio (As)	2–20	20
Titânio (Ti)	-	500
Vanádio (V)	10–100	50
Urânio (U)	-	5

Fonte: Adaptado de Khan et al. (2011).

O Pb, um dos metais mais resistentes, possui uma retenção no solo entre 150 e 5000 anos. Um estudo de 1995 (NandaKumar et al., 1995) reportou que mesmo após 150 anos de aplicação de Pb no solo, as concentrações deste metal se mantiveram muito altas. O Cd, por sua vez, possui meia-vida biológica de 18 anos (Forstner, 1995). Quando em altas concentrações, os íons metálicos podem inibir completamente a população microbiana, inibindo a maioria de suas atividades metabólicas, como desnaturação de proteínas, inibição da divisão celular, ruptura da membrana celular, entre outros (Shukla et al. 2010). A toxicidade de metais em microorganismos ocorre por meio do deslocamento de elementos essenciais de seus locais de ligação nativos ou por meio de interações de ligantes (Nies, 1999; Bruins et al., 2000).

Os microorganismos desenvolveram seis fatores de homeostase de íons metálicos e determinantes que auxiliam na resistência do metal: exclusão por barreira de permeabilidade;

sequestro intra e extracelular; bombas de efluxo ativo; redução enzimática; e redução na sensibilidade de alvos celulares a íons metálicos (Ji e Silver, 1995; Nies e Silver, 1995; Nies, 1999; Rensing et al., 1999; Bruins et al., 2000). Esses mecanismos funcionando de forma conjunta ou separada, permite que os microorganismos se estabeleçam em locais contaminados por elementos potencialmente tóxicos. A transformação microbiana pode ocorrer de duas formas para se adaptar ao ambiente estressante: conversões da forma inorgânica para a forma orgânica e vice-versa, tipicamente metilação e desmetilação e conversões redox de formas inorgânicas. A Tabela 4 exibe os grupos de microorganismos que conseguem sobreviver em locais contaminados com seus respectivos elementos potencialmente tóxicos.

Tabela 4 - Grupos de microorganismos relacionados aos elementos potencialmente tóxicos.

Elemento	Microorganismos
Cu	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Phormidium valderium</i> , <i>Volvariella volvacea</i> , <i>Daedalea quercina</i>
Ni	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Zooglea sp.</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Phormidium valderium</i>
Zn	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Daedalea quercina</i>
U	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Citrobacter sp.</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Aspergillus niger</i>
Co	<i>Zooglea sp.</i> , <i>Phormidium valderium</i>
Cd	<i>Ganoderma applanatum</i> , <i>Zooglea sp.</i> , <i>Citrobacter sp.</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Stereum hirsutum</i> , <i>Phormidium valderium</i>
Pb	<i>Stereum hirsutum</i> , <i>Citrobacter sp.</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Ganoderma applanatum</i> , <i>Volvariella volvacea</i> , <i>Daedalea quercina</i>
Hg	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Volvariella volvacea</i> , <i>G. metallireducens</i>
Au (Ouro)	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>G. metallireducens</i>
Ag (Prata)	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>G. metallireducens</i>
Cr	<i>D. vulgaris</i> , <i>D. Acetoxidans</i> , <i>D. Fructosovorans</i> , <i>D. norvegicum</i>

Fonte: Adaptado de Chatterjee et al. (2008)

Dentre os parâmetros do solo que estão relacionados ao comportamento dos elementos potencialmente tóxicos e ao comportamento dos microorganismos, pode-se citar o pH, potencial redox (Eh), CTC, a textura do solo, temperatura e umidade. De acordo com Vidali (2001), embora os microorganismos apresentem capacidade de crescer em ambientes extremos, a maioria deles cresce em uma estreita faixa de cada parâmetro, alcançando assim as condições

ideais. A temperatura pode afetar as taxas de reações bioquímicas, e dependendo do microorganismo as suas células podem até morrer. A água disponível também é essencial para manter a umidade, fazendo com que a irrigação constante seja necessária. Abaixo, algumas das condições ideais para um bom desempenho da atividade dos microorganismos no solo.

Tabela 5 - Relação entre alguns fatores ambientais e suas respectivas condições ótimas.

Fatores Ambientais	Condições Ótimas
pH	5,5 – 8,8
Temperatura	15° - 45°
Umidade	25 – 28% da capacidade de retenção de água
Tipo de solo	Baixo teor de argila ou silte
Oxigênio	Aeróbio, espaço mínimo de poros preenchido com 10% de ar
Nutriente	Nitrogênio (N) e Fósforo (P) para crescimento microbiano
Elementos potencialmente tóxicos	Concentração total até 2000 mg/kg
Contaminantes	Não tão tóxico, em baixas concentrações

Fonte: Adaptado de Vidali (2001)

De acordo com Alloway (1995), o pH é a propriedade que interfere de forma mais intensa na disponibilidade dos elementos potencialmente tóxicos, pois ele afeta a capacidade de complexação dos elementos em água determinando se o elemento está precipitado ou dissolvido. Na maioria dos casos, a retenção dos elementos potencialmente tóxicos no solo aumenta juntamente com o aumento de pH. As exceções são o molibdênio (Mo), selênio (Se), As e alguns estados de valência do Cr que geralmente são mais móveis em condições alcalinas.

Como todos os parâmetros do solo podem estar interligados, o Eh interfere na valência dos elementos e também no pH do solo. Em resumo, quando ocorrem condições redutoras no solo, queda no nível de oxigênio e de íons H⁺ livres, têm-se diminuição do potencial redox, aumentando assim o pH. Isso pode contribuir para maior redução da disponibilidade dos elementos potencialmente tóxicos, originando simultaneamente formas menos solúveis desses elementos (Alloway, 1995).

A CTC do solo pode ser definida como a densidade de cargas negativas nas superfícies de suas frações coloidais e a carga de espécies metálicas em solução e na superfície do solo. De acordo com essas características, pode ocorrer variação na capacidade do solo de adsorver

cátions (Alloway, 1995). Adriano (1986) destacou que a CTC do solo depende da quantidade e tipo de argila, matéria orgânica e presença de óxidos de Fe (Ferro), Mn e Al (Alumínio).

A capacidade de armazenamento de matéria orgânica do solo depende do clima, tipo de solo e paisagem, tipo de vegetação e manejo do solo. A influência do clima no armazenamento de matéria orgânica do solo pode ser expressa pela relação entre a temperatura média anual e a precipitação anual (Carter, 2020). A matéria orgânica, além de atuar na CTC, pode fornecer produtos químicos orgânicos à solução do solo que podem servir como quelatos e aumentar a disponibilidade de elementos potencialmente tóxicos para as plantas (McCauley et al., 2009). Foi relatado que a adsorção destes elementos nos constituintes do solo diminuiu com a diminuição do teor de matéria orgânica nos solos (Hettiarachchi et al., 2003; Antoniadis et al., 2008). Além disso, a matéria orgânica dissolvida nos solos pode aumentar a mobilidade e absorção de elementos potencialmente tóxicos para raízes de plantas (Impellitteri et al., 2002; Du Laing et al., 2009). Dai et al. (2004) estimaram que as concentrações de Cd, Pb e Zn em solos contaminados estavam positivamente correlacionados com os teores de matéria orgânica nos solos.

A textura do solo depende inteiramente de frações de argila, silte e areia. A alta afinidade dos elementos potencialmente tóxicos com a argila é devido à facilidade de adsorção nessa fração, apresentando a seguinte ordem: argila > silte > areia (Rieuwerts et al., 1998). De acordo com Farrah e Pickering (1977), a adsorção em argilas ocorre pela adsorção de íons hidroxila seguido da ligação entre o íon metálico na argila, que pode ser pela ligação no grupo hidroxila adsorvido ou no sítio criado pela remoção de próton.

Trabalhos recentes como o de Guo et al. (2021), estudaram profundamente as áreas de mineração de minérios não ferrosos e sua relação com a mobilidade de contaminantes como Cd, Pb e As e as comunidades microbianas presentes no local. O artigo correlacionou todos esses aspectos com às propriedades do solo, relacionando a mobilidade dos poluentes de acordo com o valor de Eh, teor de argila, CTC e a concentração de cada um dos elementos investigados. Além disso, encontraram três filos predominantes na área (*Proteobacteria*, *Acidobacteria* e *Firmicutes*) que estavam intimamente relacionados com o pH do solo, a CTC, Eh, matéria orgânica disponível e a biodisponibilidade de cada um dos poluentes tóxicos.

Estudos anteriores citam a presença de microorganismos no solo como resistentes à presença de elementos potencialmente tóxicos, sendo que estes se adaptam às condições nesses locais contaminados (Li et al., 2017). Dessa forma, comunidades microbianas que já habitam em locais de mineração estão começando a serem descritas e estudadas como potenciais

biorremediadoras desses ambientes contaminados no futuro. Outros pontos positivos da biorremediação pela microbiota local podem ser citados: possuem baixo custo e pouca intervenção ecológica com chance muito baixa de modificar o ambiente local (Dixit et al., 2015; Xu et al., 2020).

6.2. Elementos potencialmente tóxicos e microorganismos

Inúmeros trabalhos têm descrito de forma organizada a relação que ocorrências de microorganismos no solo tem com os elementos potencialmente tóxicos. Os elementos potencialmente tóxicos mais relatados são Pb, Cd, Zn e Cu. Haller et al. (2011) realizaram um estudo no Lago de Genebra na Suíça e compararam a composição de comunidades bacterianas e de arqueas em dois grupos de sedimentos: os sedimentos não contaminados e os sedimentos contaminados com Cu, Zn, Cd, Cr, Pb e Hg. Os autores encontraram pela análise filogenética que a grande proporção de bactérias estava relacionada ao grupo de *Dechloromonas sp.*

O Cu também foi encontrado ligado à ocorrência do grupo de microorganismos da *Sphingomonas*. Em um estudo publicado em 2012 realizado no Chile, a eletroforese em gel de gradiente desnaturante de genes 16s de RNA ribossômico foi utilizada para caracterizar os grupos de bactérias ligadas à sites contaminados com Cu. Além de *Sphingomonas*, foram encontrados os gêneros de *Stenotrophomonas* e *Arthrobacter* (Altimira et al., 2012).

Já o As, que é um metaloide, foi descrito no trabalho de Kudo et al. (2013). Os autores utilizaram uma bactéria redutora de arsenato, designada de cepa PSR-1, e a isolaram de solo contaminado com As. Estes autores concluíram que esta cepa está intimamente relacionada com *Anaeromyxobacter sp.*, *Sedimentibacter sp.* e *Geobacter sp.* Um estudo feito em áreas de mineração com presença de As em grandes concentrações sugeriu que membros do grupo *Alphaproteobacteria* são potenciais indicadores biológicos de sedimentos contaminados com este metaloide (Reis et al. 2013).

Como descrito anteriormente, a metilação microbiana desempenha um papel importante no ciclo biogeoquímico dos elementos, porque os compostos metilados são frequentemente voláteis. Um exemplo disso, é o Hg que pode ser biometilado por diferentes espécies microbianas (*Pseudomonas sp.*, *Escherichia sp.*, *Bacillus sp.* e *Clostridium sp.*) para metilmercúrio gasoso, que é a forma mais tóxica do mercúrio (Pan-Hou e Imura 1982; Compeau e Bartha 1985; Pongratz e Heumann 1999). O mesmo pode ser observado para a biometilação de As em arsinas gasosas (Gao e Burau 1997) e Se em dimetil seleneto volátil (Flury et al. 1997;

Guo et al. 1999; Martens e Suarez 1999; Zhang e Frankenberger 1999; Dungan e Frankenberger 2000).

Em um ambiente contaminado com rejeitos de mineração os microorganismos podem acelerar a dissolução oxidativa do sulfeto mineral, levando a formação de drenagens ácidas de minas (DAM). Por outro lado, os microrganismos podem favorecer a precipitação de elementos potencialmente tóxicos em solução, contribuindo para a atenuação natural de águas poluídas. Especificamente na África do Sul, para o processo de biorremediação em drenagem ácida de mina foram correlacionadas bactérias dos gêneros *Desulfovibrio* e *Geobacter* (Van Hille et al., 2016).

Um estudo realizado na China indicou que bactérias do solo podem cooperar entre si para se adaptar à perda de nutrientes no habitat desfavorável causada pela atividade de mineração. No entanto, o estudo indicou o enfraquecimento da resistência das comunidades bacterianas a mudanças externas causadas pela contaminação (Luo et al., 2020). Além disso, foi relatado que as comunidades de bactérias podem mudar de acordo com a localização geográfica, condições meteorológicas, estações, intensidade da atividade de mineração, temperatura, entre outros fatores. Habekost et al. (2008) fizeram uma pesquisa na Alemanha com o objetivo de comparar comunidades microbianas ao longo das quatro estações. Foram encontradas variações sazonais juntamente com as comunidades, devido às diferentes disponibilidades e qualidade de recursos orgânicos ao longo de um ano. A ocorrência de nutrientes também pode ser um fator limitante para o desenvolvimento de microorganismos (Hicks et al., 2021).

Quando a exploração do ouro (Au) ocorre, o solo ao redor do rejeito pode se contaminar com As. Li et al. (2021) exploraram o comportamento do As nesse caso e as modificações na microbiota local. Foi encontrado genes de redução de As como os mais abundantes, seguidos pelos genes de oxidação de As, em seguida, genes de respiração e por último genes de metilação. Os genes do metabolismo de As, arsBCR, aioE, arsPH, arrAB aumentaram com o maior concentração do metaloide. Além disso, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria* e *Chloroflexi* foram os microorganismos dominantes e relacionados ao metabolismo do As.

Foi demonstrado também que o tipo de uso do solo pode impactar diretamente na microbiota local. Como exemplo, Xiao et al. (2021) caracterizaram as comunidades microbianas em três usos do solo, em uma área de mineração: floresta, grama e solo agrícola. *Acidobacteria* foi mais encontrada em solos agrícolas e gramas, enquanto o filo de maior abundância na floresta foi *Proteobacteria*. Esses dois filos foram reportados também

anteriormente em solos impactos por mineração, de uso agrícola (Zhang et al., 2020), solos de floresta (Shi et al., 2015) e solos de rejeito (Xiao et al., 2019).

Para Pb e Cd demonstrou-se que na China, as altas concentrações destes elementos têm impacto significativo na atividade microbiana e enzimática do solo. Conforme foi adicionado Pb e o Cd, as atividades enzimáticas e da microbiota local diminuíram significativamente (Xiao et al., 2020). Por outro lado, Li et al. (2020) relataram aumento na atividade de microorganismos na presença de Pb e Zn. A análise da microbiota relacionada à profundidade indicou alta riqueza de microrganismos e diferenças significativas na estrutura microbiana vertical. *Proteobacteria* foi o filo dominante em todas as camadas profundas, seguido por *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Acidobacteria* como principais filos. Além disso, o pH e a presença de outros elementos potencialmente tóxicos (em menores concentrações) como Cu, As, Mn e Cd influenciaram significativamente na composição da microbiota. Dessa forma, dependendo de inúmeras variáveis do local, a comunidade microbiana pode responder de forma positiva ou negativa à contaminação.

Dentre os elementos potencialmente tóxicos, o Cr pode ocorrer em duas formas diferentes: Cr⁶⁺ e Cr³⁺. O Cr⁶⁺ hexavalente solúvel em água apresenta maiores ameaças ao ambiente do que o Cr³⁺, que por sua vez é considerado benigno e prontamente precipitado em pH ambiental. Foi demonstrado também que o uso sucessivo de microorganismos é a melhor estratégia para inibir com o Cr⁶⁺ do meio ambiente (Elahi et al., 2020). Os microorganismos relacionados a essa redução do Cr⁶⁺ são: *Bacillus*, *Deinococcus*, *Agrobacterium*, *Thermus*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, entre outros (Otake et al. 1987).

Além do estresse causado por elementos potencialmente tóxicos, ainda é possível que diferentes tipos de estresse ocorram de forma combinada ou separada em um mesmo local, deixando a compreensão dos grupos de microorganismos encontrados um pouco mais complexa. É preciso estudar a fundo cada tipo de estresse e principalmente entender como relacionar cada um deles com a microbiota que possivelmente será encontrada. Wang et al. (2019) estudaram as respostas das comunidades microbianas do solo e suas interações com o estresse salino-alcalino e o estresse da contaminação causada por Cd. O aumento da salinidade e alcalinidade do solo aumentaram a disponibilidade do Cd. A adição de sais neutros e alcalinos aumentou a concentração de comunidades bacterianas das famílias *Sphingobacteriaceae*, *Cellvibrionaceae* e *Caulobacteraceae*, mas diminuiu algumas *Acidobactérias*, que respondiam melhor apenas quando o estresse era apenas por Cd.

As técnicas mediadas por microrganismos geneticamente modificados (GEMs) para a remoção de metais e metaloides são consideradas uma estratégia ambientalmente segura e economicamente viável. Várias formas de GEMs, incluindo fungos, algas e bactérias, foram produzidas por tecnologias de DNA e RNA recombinantes, usadas para eliminar compostos de metal e metaloides das áreas contaminadas. Além disso, as GEMs têm potencial para produzir enzimas e outros metabólitos capazes de tolerar o estresse dos metais e desintoxicar os poluentes. Sharma et al. (2021) fizeram uma revisão detalhada sobre este tema. A biorremediação depende da interação dos microorganismos com os elementos potencialmente tóxicos.

Microorganismos geneticamente modificados é basicamente uma microbiota que teve seu código genético modificado por meio de técnicas da Engenharia Genética, e de transferências de genes evolutivos de um microorganismo para outro. Essa abordagem é conhecida atualmente como técnica de DNA recombinante (Janssen e Stucki, 2020). Segundo Ryan et al. (2000), o primeiro teste feito com microorganismos geneticamente modificados foi em 1996 para fins de biorremediação. O processo passou pela aprovação da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA). De acordo com a revisão, pode-se perceber que este tema é mais atual e está sendo muito explorado atualmente. Na Tabela 6 observa-se que a maioria dos trabalhos sobre esse tema são de 10 anos atrás (até o ano de 2021).

Tabela 6 - Microbiota geneticamente modificada, microorganismos correspondentes e respectivas referências.

Microorganismos	Microbiota geneticamente modificada	Referências
<i>E. coli</i>	<i>E. coli JM10</i>	Jin et al. (2009)
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	Zhu et al. (2020)
<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas desiccabilis</i>	Chen et al. (2013)
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	<i>Stenotrophomonas sp YC1</i>	Liu et al. (2014)
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas sp. BF1-3</i>	Barman et al. (2014)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis 168 YCMarsM</i>	Huang et al. (2015)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens HK44</i>	Trogl et al. (2012)
<i>Rhodococcus sp.</i>	<i>Rhodococcus sp.</i>	Jaiswal et al. (2019)
<i>Ralstonia eutropha</i>	<i>Ralstonia eutropha CH34</i>	Singh et al. (2011)
<i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter sp. AO22</i>	Ng et al. (2012)
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	<i>Mesorhizobium huakuii sub sp. Rengei B3</i>	Singh et al. (2011)
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida KT2440 Graf</i>	Graf, Altenbuchner, (2014)
<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas desiccabilis</i>	Chen et al. (2013)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae ML01</i>	Vaudano et al. (2016)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger phyA2</i>	Zhou et al. (2015)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger xlnR</i>	Jiang et al. (2016)
<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Trichoderma reesei Xyr1</i>	Jiang et al. (2016)
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae LDH 871</i>	Wakai et al. (2014)
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans gaaR</i>	Alazi et al. (2018)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>Pycnoporus sanguineus MUCL 41582</i>	Knop et al. (2015)
<i>Pseudochoricystis ellipsoidea</i>	<i>Pseudochoricystis ellipsoidea PUT2</i>	Kasai et al. (2015)
<i>Nannochloropsis salina</i>	<i>Nannochloropsis salina NsbHLH2</i>	Kang et al. (2015)
<i>Pseudochoricystis ellipsoide</i>	<i>Pseudochoricystis ellipsoide G418</i>	Imamura et al. (2012)
<i>Nannochloropsis salina</i>	<i>Nannochloropsis salina AtWR11</i>	Kang et al. (2017)
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	<i>Chlorella ellipsoidea GmDof4</i>	Zhang et al. (2014)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Zedler et al. (2016)

Fonte: Sharma et al. (2021)

Além da lista apresentada na Tabela 6, pode-se citar também combinações de microorganismos geneticamente modificados que já foram relatados na literatura e que auxiliaram na degradação de elementos potencialmente tóxicos:

- *Mesorhizobium huakuii* (microorganismo geneticamente modificado) com expressão gênica para transformar genes em fitoquelatinas. Nesse caso, ocorreu o acúmulo e degradação de Cd (Porter et al., 2017);
- *Ralstonia eutropha AUM-01*, rizobactéria recombinante capaz de remover metais (Cha e Chambliss., 2011);
- *Pseudomonas putida X3 strain*, que constitui uma incorporação aprimorada de proteína fluorescente verde e gene que degrada metil parathion e que consegue degradar o Cd (Zhang et al., 2016);
- *Shewanella putrefaciens* que auxilia na expressão de genes arrA. Esse padrão de expressão consegue realizar a desintoxicação de As (Shi et al., 2020);
- *Acidithiobacillus ferrooxidans* que contém gene transportador de íon mercúrio (mer C). Esse gene auxilia na degradação de Hg (Ouyang et al., 2013);
- *E.coli SE5000 strain* que contém a expressão do sistema de transporte de Ni (gene nixA) e consegue degradar o Ni (Farnham and Dube, 2015);
- *Mycobacterium*, que expressa o gene propano monooxigenase (prmA) e consegue detoxificar poluentes em geral (Miao et al., 2020).

6.3. Índices de diversidade microbiana

Segundo Øvreås (2000), a caracterização da diversidade microbiana nos solos é importante para aumentar o conhecimento das fontes de diversidade genética em uma comunidade; entender os padrões de distribuição relativa dos microrganismos; aumentar o conhecimento do papel funcional dessa diversidade; identificar diferenças em diversidade associadas a distúrbios causados por práticas de manejo; entender a regulação da biodiversidade e o envolvimento da biodiversidade no funcionamento e na sustentabilidade de ecossistemas.

A diversidade microbiana nos solos é essencial tanto para a definição de estratégias para preservação de biomassa quanto para o desenvolvimento de sistemas indicadores de alterações ambientais associadas a distúrbios, como a presença de poluentes ou a utilização não sustentável de solos agrícolas. Além disso, o conhecimento dos recursos genéticos da microbiota dos solos pode contribuir para a descoberta de genes codificando novas enzimas, enzimas com atividade

ótima em condições ambientais extremas e peptídeos com atividades de interesse biotecnológico (Øvreås, 2000). Portanto, é essencial entender que a diversidade pode modificar de acordo com a quantidade de metais potencialmente tóxicos no solo.

Abaixo, tem-se um resumo dos principais índices de diversidade e sua descrição. A Riqueza (R), é considerada a mais simples para representação da diversidade (Whittaker, 1972). O índice mais simples relacionado à abundância proporcional foi proposto por Berger e Parker (1970), chamado de Dominância de Berger-Parker (BP).

Tabela 7 - Índices de diversidade microbiana, a equação utilizada e uma breve descrição.

Índice	Equação	Descrição
Riqueza (S ou Chao 1)	Número de espécies	Indica o número de espécies na população.
Diversidade de Shannon (H')	$-\ln \sum P_i \ln(P_i)$	Entropia da amostra. Para índice de Shannon próximo de zero, a amostra tem abundância concentrada em apenas uma espécie e as demais espécies são muito raras.
Diversidade de Simpson (D_1)	$1 - \frac{1}{\sum P_i^2}$	Probabilidade que duas espécies randômicas representem tipos diferentes; também conhecido como probabilidade de encontro interespécífico (PIE).
Dominância de Simpson (D_2)	$\frac{1}{\sum P_i^2}$	Probabilidade que duas entradas randômicas têm de fazerem parte da mesma espécie. Varia de zero a 1, sendo que valores próximos de 1 indicam baixa dominância e valores próximos de zero indicam elevada dominância.
Dominância de Berger-Parker (BP)	P_{\max}	Abundância proporcional da espécie mais abundante. Portanto, para valores próximos de zero a abundância proporcional da espécie mais abundante é baixa, ou seja, a amostra é diversa.
<i>Evenness</i> ou Equitatividade de Simpson	$\frac{D_2}{S}$	Uniformidade da amostra de interesse em relação à abundância de diferentes espécies. Caso não haja tipos altamente dominantes o <i>Evenness</i> será maior (próximo de um), caso contrário, ou seja, muitos tipos dominantes o <i>Evenness</i> será próximo de zero.

Fonte: Adaptado de Kasemodel (2017); Shannon (1948); Simpson (1949); Berger e Parker (1970)

6.4. Técnicas para determinar a comunidade microbiana no solo

De acordo com Kandeler (2007), antes de iniciar qualquer análise microbiológica no solo é importante fazer o delineamento experimental e planejar a estratégia de amostragem adequados para cada caso. Existem métodos bioquímicos e fisiológicos para analisar a comunidade microbiana no solo. Os métodos bioquímicos são usados para determinar a distribuição e a diversidade dos microrganismos do solo, enquanto os métodos fisiológicos nos auxiliam a entender a fisiologia das células individuais, a atividade das comunidades microbianas do solo e o ciclo biogeoquímico do ecossistema.

O primeiro passo é a amostragem, que deve ser representativa da avaliação-alvo. Por isso, recomenda-se coletar o maior número de amostras possíveis e fazer amostras compostas, representando todo o espaço a ser estudado (Moreira e Siqueira, 2006). De maneira geral, a amostragem do solo pode ser dividida da seguinte forma: para avaliar ocorrência, densidade e diversidade, utiliza-se avaliação direta, semi-direta e indireta. Para avaliar o processo e atividade outros métodos são utilizados que serão descritos posteriormente.

Nas avaliações diretas pretende-se observar os organismos como ocorrem em seu habitat, e avaliá-los após método de coleta simples. Um exemplo dessa avaliação pode ser por observações do número e forma das células, esporos, hifas ou outras estruturas microbianas em microscópios em amostras tratadas com corantes e fixadas (Bottomley, 1994).

Em avaliações semi-direta, as amostras do solo são submetidas a algum processo ou tratamento mais complexo que causa pouca ou nenhuma alteração na característica a ser estudada. Como exemplo, pode-se citar a microscopia de alta resolução associada ao uso de抗ígenos corantes, fluorescentes e sondas moleculares (Moreira e Siqueira, 2006).

As avaliações indiretas são bem mais complexas que as anteriores, baseando-se em premissas. Exemplos de avaliações indiretas: meios de cultivo com diferentes graus de seletividade para grupos fisiológicos que podem incluir fatores de estresse para seleção de espécies resistentes e tolerantes; análise de biomarcadores, incluindo DNA diretamente extraído do solo; caracterização morfológica, fisiológica, bioquímica e genética dos organismos isolados (Moreira e Siqueira, 2006).

Avaliações de processo e atividade podem ser análises de substratos e produtos das reações bioquímicas como exemplo: por técnicas isotópicas, diversos tipos de cromatografia (HPLC), titulometria, bioiluminescência, calorimetria e colorimetria. Além disso, microscopia de alta resolução também entra nessa classificação, caracterizando a influência de microorganismos na microestrutura do solo (Moreira e Siqueira, 2006).

Em geral, recomenda-se que os dados de microbiologia sejam complementados com propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. Dentre as análises físicas e químicas podemos citar: topografia, análises das rochas e solos, pH, infiltração de água, teor de umidade, granulometria, status de CO₂ e O₂, densidade dos sólidos, variações de temperatura e dados pluviométricos. A cobertura vegetal, o índice de produtividade, histórico de vegetação, abundância de animais no solo, biomassa microbiana, presença de raízes e matéria orgânica são alguns dos fatores importantíssimos que fazem parte das propriedades biológicas do solo (Kandeler, 2007).

Além disso, após a coleta do solo é de extrema importância guardar as amostras na geladeira a 4°C para posterior análise microbiológica. Quando as amostras de solo são secas ao ar livre, pode ocorrer uma redução na população microbiológica proporcional ao tempo em que a amostra fica descongelada. Além disso, é necessário armazenar a amostra em sacos plásticos com espessura de 0,025 mm, que juntamente com o ambiente refrigerado, proporcionam à amostra o desenvolvimento de condições anaeróbicas (Bottomley et al., 1994). É recomendado que as amostras não sejam congeladas, pois a estrutura da matéria orgânica pode sofrer danos. A duração que a amostra fica no refrigerador também pode interferir no resultado posterior. Como por exemplo, Gordon (1998) observou que após três meses de armazenamento de amostras de solo a 4°C, o número de organismos diminuiu em comparação com a avaliação no tempo zero, exceto para o grupo *Actinobacteria*. Portanto é recomendado fazer a coleta de forma correta e seu armazenamento também, até a realização das análises microbiológicas para que os resultados não sofram alterações devidas à erros experimentais.

6.4.1. Isolamento e identificação de DNA no solo

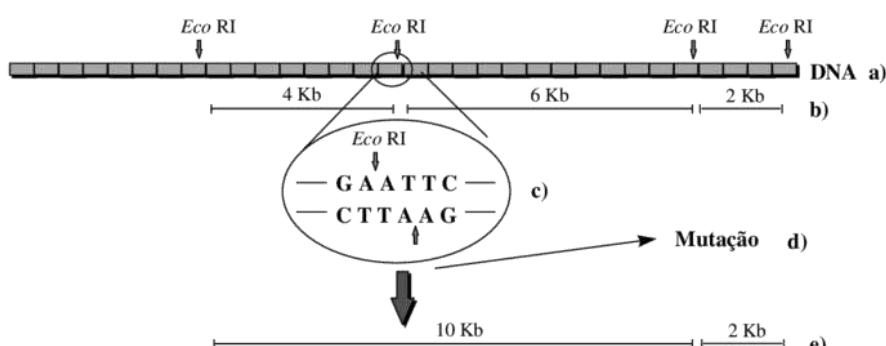
A primeira etapa para análise do DNA é sua extração em quantidade e pureza que permitem a identificação da origem genética. Existem duas técnicas para o isolamento: extração de células e lise direta. No primeiro a extração das células precede a extração de DNA e no segundo o DNA é diretamente do solo (Moreira e Siqueira, 2006). A extração direta do DNA envolve: lise das células, separação do DNA de outros componentes celulares (polissacarídeos e proteína), liberação do DNA das partículas do solo, purificação do DNA extraído e por último a precipitação do DNA.

Segundo Moreira e Siqueira (2006), a caracterização do DNA extraído pode ser realizada por diversas técnicas simples ou combinadas. A primeira delas é a hibridização DNA-

DNA. Essa técnica consiste em emparelhamento com sondas de DNA conhecido radioativo ou não para verificação do grau de homologia, ou seja, se há similaridade ou identidade de sequencias ou detecção de sequencias de DNA específicas. O desenvolvimento desse método foi primeiramente descrito no início da década de 70, trazendo novas contribuições para a sistemática bacteriana, permitindo o agrupamento dos organismos de acordo com sua semelhança genética (Rosselló-Mora e Amann, 2001).

A segunda técnica é polimorfismo em comprimento de fragmentos obtidos por restrição enzimática. Neste caso, o fragmento específico do DNA extraído é amplificado por PCR, cortado com enzima de restrição, e o que resultou é submetido a eletroforese para detecção da variabilidade de seu peso molecular. A Figura 2 exibe uma exemplificação esquemática de como funciona essa técnica:

Figura 2 - Técnica de polimorfismo em comprimento de fragmentos obtidos por restrição enzimática.



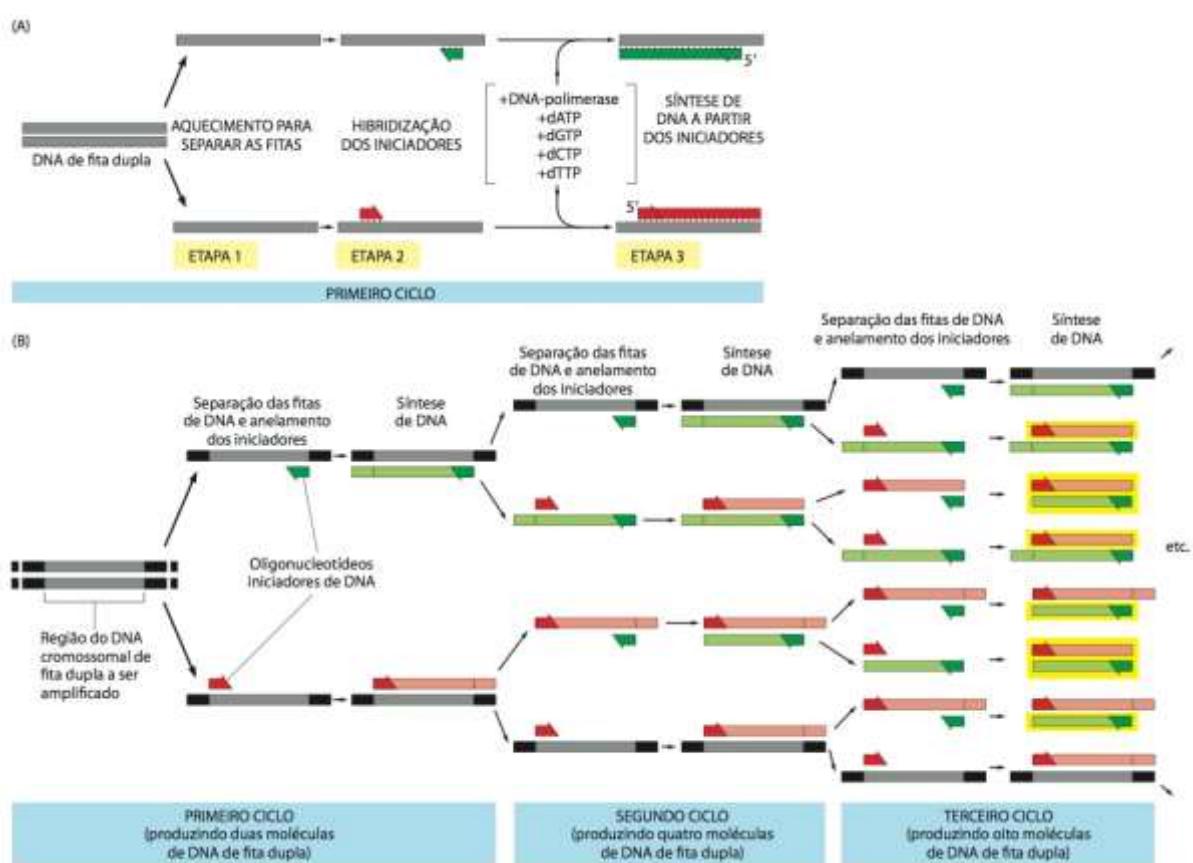
Fonte: Darini et al. (1998)

A letra (a) indica a sequência de bases de DNA, com 4 sítios de restrição para a enzima Eco RI; o (b) indica o número e o tamanho em Kb dos fragmentos de restrição obtidos após digestão com Eco RI; (c) mostra em detalhes o sítio de restrição da Eco RI; (d) é a indicação de mutação na sequência de bases que está em detalhe; (e) número e tamanho em Kb dos fragmentos de restrição após a mutação (Darini et al., 1998).

O DNA extraído do solo pode ser analisado por outras técnicas como o DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) e o TGGE (temperature gradient gel electrophoresis). Em ambas, o DNA é extraído de amostras do solo com comunidades mistas e fragmentos de DNA específicos (16s rDNA) e são amplificados por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (Muyzer, 1998).

A PCR que foi desenvolvida na década de 1980 e redescoberta por Kary Mullis e colaboradores em 1993, teve um grande impacto em biologia molecular, ciência forense, diagnóstico de doenças genéticas humanas, entre outros. A PCR encontra sua principal aplicação em situações onde a quantidade de DNA disponível é pequena. Resumidamente, a técnica amplifica uma única ou poucas cópias de um pedaço de DNA e baseia-se no processo de replicação do DNA que ocorre *in vivo*. Durante a PCR elevadas temperaturas separam as moléculas de DNA em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de oligonucleotídeos iniciadores (primers), também em cadeia simples e geralmente constituídos por 15 a 30 nucleotídeos, obtidos por síntese química. Então, os dois pares de primers são acrescentados na reação. Se a determinada sequência estiver presente na amostra, ela será multiplicada milhares de vezes, podendo configurar uma reação positiva (Alberts et al., 2011). A Figura 3 exibe um esquema representativo de como ocorre a PCR.

Figura 3 - Esquema com as etapas da PCR.



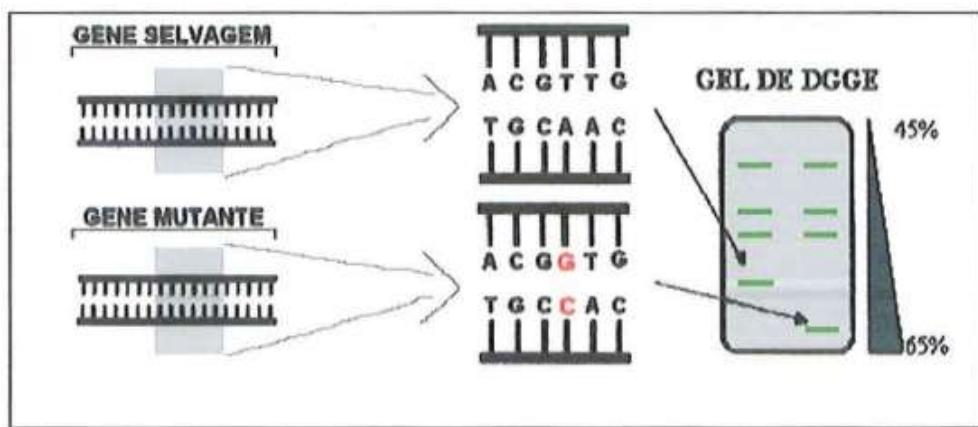
Adaptado: Brunes et al. (2011)

6.4.2. Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante

Técnicas de impressão digital genética providenciam um padrão ou perfil da diversidade genética em uma comunidade microbiana. A DGGE foi proposta por Muyzer, de Waal e Uitterlinden em 1993, e consiste em separar fragmentos de DNA de mesmo comprimento, mas com sequências diferentes. A separação é baseada na mobilidade descrecente eletroforética de uma molécula de DNA dupla fita, parcialmente dissociada em gel de poliacrilamida, contendo um gradiente linear de DNA desnaturante (uma mistura de ureia e formamida). Os fragmentos dissociados de DNA prosseguem em distintos domínios de dissociação: extensões de pares de bases com idênticas temperaturas de dissociação (Cattony, 2001). Uma vez que o domínio com a menor temperatura de dissociação alcança sua temperatura de dissociação em uma posição particular no gradiente do gel desnaturado, a migração da molécula irá praticamente parar. Variações de sequências dentro de tais domínios causam uma diferença nas temperaturas de dissociações e moléculas com sequências diferentes irão parar de migrar em posições diferentes no gel (Muyzer, 1998). Usando DGGE, 50% das variantes das sequências podem ser detectadas em fragmentos de DNA até 500 pb (pares de bases). Esta porcentagem pode aumentar para próximo de 100% se anexada sequência rica em GC (guanina e citosina), o chamado GC-Clamp, em um lado do fragmento de DNA.

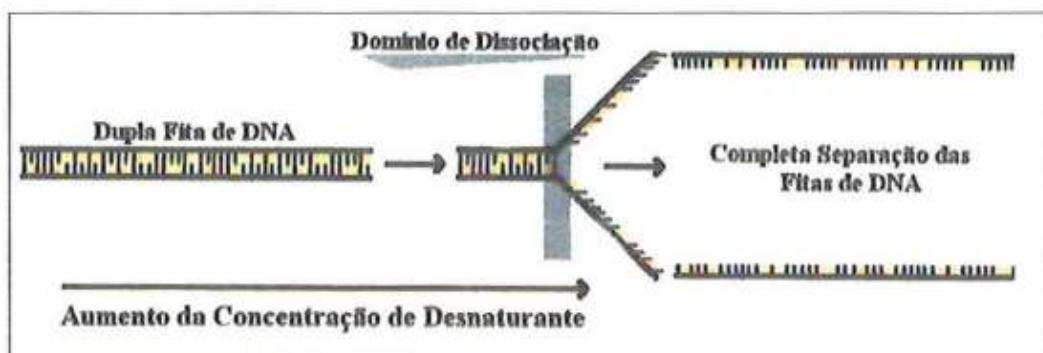
Esta técnica já foi utilizada por diversos autores para verificar os microorganismos e a diversidade microbiana em solos contaminados por elementos potencialmente tóxicos (Muller et al., 2001; Li et al., 2006; Wang et al., 2007; Dell'Amico et al., 2008; Sobolev e Begonia 2008; Martinez-Inigo et al., 2009).

Figura 4 - Amostras de mesmo comprimento, mas com diferentes sequências de pares de bases, detectadas pelo método de DGGE.



Fonte: Cattony (2001)

Figura 5 - Dissociação da molécula de DNA no gel desnaturante da forma helicoidal para a forma de um fragmento parcialmente dissociado.

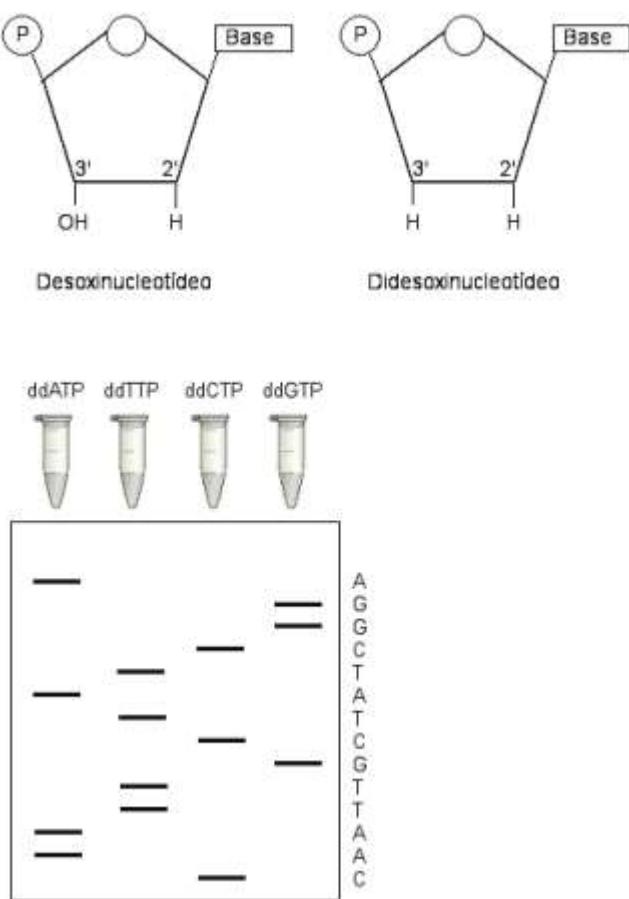


Fonte: Cattony (2001)

6.4.3. Sequenciamento de nova geração (SNG)

Duas técnicas foram as precursoras na corrida pelo entendimento da sequência do material genético, o método químico de degradação de bases (Maxam e Gilbert, 1977) e o método didesoxi ou terminação do fragmento (Sanger et al., 1978). Os dois métodos são baseados na produção de um conjunto de fitas simples de DNA que são separadas pelo princípio de eletroforese (Okubo et al., 1992). Quando comparadas as duas técnicas, o método de Sanger gera dados que são mais facilmente interpretados, por isso essa técnica tem sido utilizada até os dias atuais.

Figura 6 - Esquema representando desoxinucleotídeo e didesoxinucleotídeos, que se diferenciam pela ausência da hidroxila (OH) no carbono 3' do didesoxinucleotídeo; Representação do sequenciamento pelo método de Sanger, no qual em cada tubo é adicionado um tipo de didesoxinucleotídeo marcado junto com os demais desoxinucleotídeos. Após vários ciclos de reação de amplificação, os produtos dos tubos são submetidos à eletroforese, permitindo a leitura das sequências.



Fonte: Giusti et al. (2016).

Em 2005, as novas tecnologias de sequenciamento, denominadas de sequenciamento de nova geração (SNG) começaram a ser comercializadas. Foi lançado o sequenciador 454 (Life Sciences) que anunciou a técnica de sequenciamento por síntese, onde cada base era lida à medida que fosse adicionada ao fragmento de DNA recém-formado (Schuster, 2008), diferentemente do método de Sanger, onde a base lida era verificada pela marcação fluorescente e pelo peso molecular da molécula contendo a sequência parcial do DNA através de uma análise eletroforética. O 454 era capaz de produzir 25 milhões de pares de bases com precisão de 99%

ou mais em apenas uma análise de quatro horas na máquina. Desde então, novas tecnologias com relação ao sequenciamento foram desenvolvidas.

A tecnologia SNG da Illumina ocorre da seguinte forma: o processo identifica as bases de DNA, enquanto as incorpora na cadeia de ácido nucleico. Cada base emite um sinal fluorescente único a medida que é adicionada a cadeia de crescimento. Esta cadeia de crescimento, por sua vez, é utilizada para determinar a ordem da sequência de DNA.

Como os dados gerados pelo SNG revelam a diversidade e o potencial da comunidade microbiana, esse tipo de estudo tem sido aplicado com fins biotecnológicos, principalmente na área de biorremediação de ambientes contaminados por diversos poluentes, incluindo os orgânicos (como hidrocarbonetos e pesticidas) e/ou inorgânicos (elementos potencialmente tóxicos) (Videira e Cunha, 2018). Inúmeros trabalhos já foram publicados utilizando esta técnica como forma de detecção da comunidade de microbiota (Morais et al., 2016; Mesa et al., 2017; Jing et al., 2017; Kasemodel et al., 2019) contando também com muitos trabalhos que já foram citados anteriormente ao longo do texto.

Além disso, nos últimos anos houve a popularização do uso do sequenciamento de alto rendimento para a caracterização da diversidade de organismos presentes em comunidades biológicas de ambientes sob impacto de atividades antropogênicas. A genômica ambiental além de ampliar as possibilidades de acesso à diversidade e composição da microbiota do solo, tem a vantagem de seguir algumas estratégias baseadas em taxonomia, métricas estruturais da comunidade e métricas funcionais da comunidade (Cordier et al., 2020).

Assim como descrito em Silva et al. (2021), a maioria dos trabalhos atuais estão utilizando o sequenciamento de alto rendimento com uma abordagem chamada de metabarcoding 16S rDNA para realizar a caracterização taxonômica das comunidades procarióticas do solo. Os estudos com o gene 16S rRNA foram iniciados por Carl Woese que argumentou que esta molécula era um excelente marcador molecular (Atlas e Bartha, 1998). A utilização desse gene revolucionou os estudos da ecologia microbiana, possibilitando assim a investigação e determinação de posições filogenéticas de comunidades bacterianas no meio ambiente (Ludwig et al., 1997; Hentschel et al., 2002).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A introdução e o avanço de técnicas cada vez mais elaboradas que auxiliam na detecção e caracterização da microbiota do solo são importantes ferramentas para que se aprimore ainda mais e que os resultados sejam mais acurados e precisos.

É importante seguir passo a passo do que é recomendado para cada análise, desde os procedimentos para a coleta do solo, armazenamento dessas amostras, até a realização da caracterização microbiológica.

De uns anos para cá, o assunto ganhou mais notoriedade e a maioria dos trabalhos encontrados foram de 2005 até 2021. Por todos os trabalhos encontrados e citados nesta monografia, fica claro que a comunidade microbiológica depende muito do elemento potencialmente tóxico envolvido e sua concentração, do local de ocorrência da contaminação, dos parâmetros do solo que estão diretamente ligados à essa resposta ao contaminante (pH, Eh, CTC, matéria orgânica, entre outros), da atividade antropogênica que interfere nesse ambiente, do tempo que esta atividade ocorreu, do clima do local, e do tempo que a área ficou abandonada. Todos esses fatores mostram que a lacuna existente no âmbito de caracterização microbiológica é justamente comparar em um mesmo ambiente com as mesmas condições, e com todos os elementos tóxicos, fazer a descrição da microbiota existente e suas relações intraespecíficas. Além disso, estudos microbiológicos são um complemento de estudos físicos e químicos das áreas contaminadas, pois a caracterização biológica também é uma importante ferramenta que pode auxiliar na recuperação e biorremediação dessas áreas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, Domy C. **Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals**. New York: Springer, 2001.

ALAZI, Ebru et al. Inducer-independent production of pectinases in *Aspergillus niger* by overexpression of the D-galacturonic acid-responsive transcription factor gaaR. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 6, p. 2723-2736, 2018.

ALBERTS, Bruce et al. Biologia Molecular da Célula. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 1725 p., 2011.

ALLOWAY, Brian J. (Ed.). **Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability**. Springer Science & Business Media, 2012.

ALTIMIRA, Fabiola et al. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2012.

ANTONIADIS, V.; ROBINSON, J. S.; ALLOWAY, B. J. Effects of short-term pH fluctuations on cadmium, nickel, lead, and zinc availability to ryegrass in a sewage sludge-amended field. **Chemosphere**, v. 71, n. 4, p. 759-764, 2008.

ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial ecology: Historical development. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. **Microbial ecology**. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, p. 2- 26. 1998

AVIDANO, Lorena et al. Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. **Applied Soil Ecology**, v. 30, n. 1, p. 21-33, 2005.

BARMAN, Dhirendra Nath et al. Cloning and expression of ophB gene encoding organophosphorus hydrolase from endophytic *Pseudomonas* sp. BF1-3 degrades organophosphorus pesticide chlorpyrifos. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 108, p. 135-141, 2014.

BERGER, Wolfgang H.; PARKER, Frances L. Diversity of planktonic foraminifera in deep-sea sediments. **Science**, v. 168, n. 3937, p. 1345-1347, 1970.

BLAGODATSKAYA, Evgenia; KUZYAKOV, Yakov. Active microorganisms in soil: critical review of estimation criteria and approaches. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 67, p. 192-211, 2013.

BLAYLOCK, Michael J. Phytoextraction of metals. **Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment**, p. 53-70, 2000.

BORAZJANI, Hamid; WILTCHER, Don; DIEHL, Susan. Bioremediation of polychlorinated biphenyl and petroleum contaminated soil. **Proceedings of Environmental Science and Technology**, v. 2, p. 502-507, 2005.

BOTTOMLEY, Peter J. Light microscopic methods for studying soil microorganisms. **Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical Properties**, v. 5, p. 81-105, 1994.

BRUINS, Mark R.; KAPIL, Sanjay; OEHME, Frederick W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 45, n. 3, p. 198-207, 2000.

CARRER FILHO, Renato. Actinomicetos como agentes de biocontrole de doenças e como promotores de crescimento do tomateiro. 2002.

CARTER, M. R. Analysis of soil organic matter storage in agroecosystems. In: **Structure and organic matter storage in agricultural soils**. CRC press, p. 3-11, 2020.

Cattony, E. B.M. (2001) Avaliação da diversidade microbiana e das características físico-químicas de solo submetido ao cultivo de cana-de-açúcar. São Carlos. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – CRHEA – Universidade de São Paulo.

CHA, Minseok; CHAMBLISS, Glenn H. Characterization of acrylamidase isolated from a newly isolated acrylamide-utilizing bacterium, Ralstonia eutropha AUM-01. **Current microbiology**, v. 62, n. 2, p. 671-678, 2011.

CHATTERJEE, Sandipan et al. Bioremediation: a tool for cleaning polluted environments. **Journal of Applied Biosciences**, v. 11, n. 1, p. 594, 2008.

CHEN, Jian et al. Engineering the soil bacterium *Pseudomonas putida* for arsenic methylation. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 14, p. 4493-4495, 2013.

CHEN, Kai et al. Effect of lead pollution control on environmental and childhood blood lead level in Nantong, China: an interventional study. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 21, p. 12930-12936, 2014.

COMPEAU, G. C.; BARTHA, R. Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. **Applied and environmental microbiology**, v. 50, n. 2, p. 498-502, 1985.

CORDIER, Tristan et al. Ecosystems monitoring powered by environmental genomics: a review of current strategies with an implementation roadmap. **Molecular ecology**, v. 30, n. 13, p. 2937-2958, 2021.

CYBULSKI, Zefiryn et al. The influence of emulsifiers on hydrocarbon biodegradation by Pseudomonadaceae and Bacillacea strains. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 8, n. 5-6, p. 503-507, 2003.

DA COSTA SILVA, Thiago Augusto et al. Can moderate heavy metal soil contaminations due to cement production influence the surrounding soil bacterial communities?. **Ecotoxicology**, p. 1-15, 2021.

DAI, Jun et al. Influence of heavy metals on C and N mineralisation and microbial biomass in Zn-, Pb-, Cu-, and Cd-contaminated soils. **Applied soil ecology**, v. 25, n. 2, p. 99-109, 2004.

DARINI, Ana Lúcia C.; MAGALHÃES, Vanda D.; CROTT, Luciana SP. Aplicações da ribotipagem na epidemiologia molecular de infecções bacterianas. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 31, n. 1, p. 73-80, 1998.

DE NOBILI, M. et al. Soil microbial biomass is triggered into activity by trace amounts of substrate. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 9, p. 1163-1170, 2001.

DEAN-ROSS, Deborah; MOODY, Joanna; CERNIGLIA, C. E. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. **FEMS microbiology ecology**, v. 41, n. 1, p. 1-7, 2002.

DELL'AMICO, Elena et al. Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil. **Microbiological research**, v. 163, n. 6, p. 671-683, 2008.

DIXIT, Ruchita et al. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. **Sustainability**, v. 7, n. 2, p. 2189-2212, 2015.

DU LAING, Gijs et al. Trace metal behaviour in estuarine and riverine floodplain soils and sediments: a review. **Science of the total environment**, v. 407, n. 13, p. 3972-3985, 2009.

DUNGAN, Robert S.; FRANKENBERGER JR, William T. Factors affecting the volatilization of dimethylselenide by Enterobacter cloacae SLD1a-1. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 10, p. 1353-1358, 2000.

ELAHI, Amina et al. Successive use of microorganisms to remove chromium from wastewater. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, n. 9, p. 3729-3743, 2020.

FARNHAM, Kate R.; DUBE, Danielle H. A semester-long project-oriented biochemistry laboratory based on *H. elicitobacter pylori* urease. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 43, n. 5, p. 333-340, 2015.

FARRAH, Helen; PICKERING, W. F. Influence of clay-solute interactions on aqueous heavy metal ion levels. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 8, n. 2, p. 189-197, 1977.

FLURY, Markus; FRANKENBERGER JR, William T.; JURY, William A. Long-term depletion of selenium from Kesterson dewatered sediments. **Science of the total environment**, v. 198, n. 3, p. 259-270, 1997.

FÖRSTNER, U. Non-linear release of metals from aquatic sediments. In: **Biogeodynamics of pollutants in soils and sediments**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1995. p. 247-307.

GADD, Geoffrey M. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. **Experientia**, v. 46, n. 8, p. 834-840, 1990.

GADD, Geoffrey M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, v. 122, n. 2-4, p. 109-119, 2004.

GAO, Suduan; BURAU, Richard G. **Environmental factors affecting rates of arsine evolution from and mineralization of arsenicals in soil**. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 1997.

GIUSTI, Juliana; KETTENER, Karine; FUCHS-FERRAZ, Maria Cecília Perantoni. 13) Influência do sequenciamento de nova geração no futuro da genética da conservação. **Revista RG News**, v. 2, p. 2, 2016.

GORDON, Andrew M. Use of polyethylene bags and films in soil incubation studies. **Soil Science Society of America Journal**, v. 52, n. 5, p. 1519-1520, 1988.

GRAF, Nadja; ALTENBUCHNER, Josef. Genetic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for rapid and high-yield production of vanillin from ferulic acid. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 137-149, 2014.

GUO, Lei; FRANKENBERGER, William T.; JURY, William A. Adsorption and degradation of dimethyl selenide in soil. **Environmental science & technology**, v. 33, n. 17, p. 2934-2938, 1999.

GUO, Ziwen et al. Vertical distribution of the toxic metal (loid) s chemical fraction and microbial community in waste heap at a nonferrous metal mining site. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 228, p. 113037, 2021.

HABEKOST, Maike et al. Seasonal changes in the soil microbial community in a grassland plant diversity gradient four years after establishment. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 2588-2595, 2008.

HALLER, Laurence et al. Composition of bacterial and archaeal communities in freshwater sediments with different contamination levels (Lake Geneva, Switzerland). **Water research**, v. 45, n. 3, p. 1213-1228, 2011.

HENTSCHEL, Ute et al. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4431-4440, 2002.

HETTIARACHCHI, Ganga M. et al. Sorption and desorption of cadmium by different fractions of biosolids-amended soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, n. 5, p. 1684-1693, 2003.

HICKS, Lettice C.; LAJTHA, Kate; ROUSK, Johannes. Nutrient limitation may induce microbial mining for resources from persistent soil organic matter. **Ecology**, v. 102, n. 6, p. e03328, 2021.

HUANG, Ke et al. Genetically engineering *Bacillus subtilis* with a heat-resistant arsenite methyltransferase for bioremediation of arsenic-contaminated organic waste. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6718-6724, 2015.

IJAH, U. J. J. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. **Waste Management**, v. 18, n. 5, p. 293-299, 1998.

IMAMURA, Sosuke et al. Genetic transformation of *Pseudochoricystis ellipsoidea*, an aliphatic hydrocarbon-producing green alga. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 58, n. 1, p. 1-10, 2012.

IMPELLITTERI, Christopher A. et al. Correlation of the partitioning of dissolved organic matter fractions with the desorption of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from 18 Dutch soils. **Environment International**, v. 28, n. 5, p. 401-410, 2002.

JACOB, Jaya Mary et al. Biological approaches to tackle heavy metal pollution: a survey of literature. **Journal of environmental management**, v. 217, p. 56-70, 2018.

JAISWAL, Shweta; SINGH, Dileep Kumar; SHUKLA, Pratyoosh. Gene editing and systems biology tools for pesticide bioremediation: a review. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 87, 2019.

JANSSEN, Dick B.; STUCKI, Gerhard. Perspectives of genetically engineered microbes for groundwater bioremediation. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 22, n. 3, p. 487-499, 2020.

JI, Guangyong; SILVER, Simon. Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. **Journal of industrial microbiology**, v. 14, n. 2, p. 61-75, 1995.

JIANG, Yanping et al. Enhancing saccharification of wheat straw by mixing enzymes from genetically-modified *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. **Biotechnology letters**, v. 38, n. 1, p. 65-70, 2016.

JIN, Ruofei et al. Bioaugmentation on decolorization of CI Direct Blue 71 by using genetically engineered strain *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR). **Journal of hazardous materials**, v. 163, n. 2-3, p. 1123-1128, 2009.

JING, Qiankun et al. Bench-scale microbial remediation of the model acid mine drainage: Effects of nutrients and microbes on the source bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 128, p. 117-121, 2018.

JOGDAND, SN. Environmental biotechnology, **1st Edition**, Himalaya Publishing House, Bombay, India. 104-120 pp, 1995.

JOHNSEN, Kaare et al. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils—a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, n. 6, p. 443-453, 2001.

GOUPIL, Kassandre; NKONGOLO, Kabwe K.; NASSERULLA, Sabah. Characterization of fungal communities in limed and unlimed lands contaminated with metals: phospholipid fatty acid (PLFA) analysis and soil respiration. **American Journal of Biochemistry & Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 45, 2015.

KABATA-PENDIAS, A. Trace elements in soil and plants. (4^a edição). **Boca Raton**, Florida: Taylor & Francis Group, 505 p. Boca Raton, 2011.

KANDELER, Ellen. Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their function. In: **Soil microbiology, ecology and biochemistry**. Academic Press, 2007. p. 53-83.

KANG, Nam Kyu et al. Effects of overexpression of a bHLH transcription factor on biomass and lipid production in *Nannochloropsis salina*. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2015.

KANG, Nam Kyu et al. Increased lipid production by heterologous expression of AtWRI1 transcription factor in *Nannochloropsis salina*. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2017.

KAPLEY, Atya et al. Osmotolerance and hydrocarbon degradation by a genetically engineered microbial consortium. **Bioresource Technology**, v. 67, n. 3, p. 241-245, 1999.

KASAI, Yuki et al. Construction of a self-cloning system in the unicellular green alga *Pseudochlorocystis ellipsoidea*. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2015.

KASEMODEL, M.C., 2017. Integrated Assessment of Contamination by Potentially Toxic Metals in a Waste Disposal Area of Lead Mining - Adrianópolis. Thesis. University of São Paulo.

KASEMODEL, M. C. et al. Potentially toxic metal contamination and microbial community analysis in an abandoned Pb and Zn mining waste deposit. **Science of the Total Environment**, v. 675, p. 367-379, 2019.

KHAN, M. Nasiruddin et al. Assessment of heavy metal toxicants in the roadside soil along the N-5, National Highway, Pakistan. **Environmental monitoring and assessment**, v. 182, n. 1, p. 587-595, 2011.

KNOP, Doriv; YARDEN, Oded; HADAR, Yitzhak. The ligninolytic peroxidases in the genus Pleurotus: divergence in activities, expression, and potential applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1025-1038, 2015.

KUDO, Keitaro et al. Release of arsenic from soil by a novel dissimilatory arsenate-reducing bacterium, Anaeromyxobacter sp. strain PSR-1. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 15, p. 4635-4642, 2013.

KUMAR, PBA Nanda et al. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. **Environmental science & technology**, v. 29, n. 5, p. 1232-1238, 1995.

LAL, B.; KHANNA, S. Degradation of crude oil by Acinetobacter calcoaceticus and Alcaligenes odorans. **Journal of applied bacteriology**, v. 81, n. 4, p. 355-362, 1996.

LEWIN, Anna; WENTZEL, Alexander; VALLA, Svein. Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 516-525, 2013.

LI, Shuzhen et al. A comprehensive survey on the horizontal and vertical distribution of heavy metals and microorganisms in soils of a Pb/Zn smelter. **Journal of Hazardous Materials**, v. 400, p. 123255, 2020.

LI, Xianhong et al. Adaptation mechanisms of arsenic metabolism genes and their host microorganisms in soils with different arsenic contamination levels around abandoned gold tailings. **Environmental Pollution**, v. 291, p. 117994, 2021.

LI, Xiaoqi et al. Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 908-917, 2017.

LI, Zhaojun et al. Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. **Chemosphere**, v. 62, n. 8, p. 1374-1380, 2006.

LIU, Ruihua et al. Engineering chlorpyrifos-degrading Stenotrophomonas sp. YC-1 for heavy metal accumulation and enhanced chlorpyrifos degradation. **Biodegradation**, v. 25, n. 6, p. 903-910, 2014.

LIU, Wen-hua et al. Impacts of sewage irrigation on heavy metal distribution and contamination in Beijing, China. **Environment international**, v. 31, n. 6, p. 805-812, 2005.

LUDWIG, Wolfgang et al. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, n. 1, p. 181-190, 1997.

LUO, Chen et al. Distribution and mobilization of heavy metals at an acid mine drainage affected region in South China, a post-remediation study. **Science of The Total Environment**, v. 724, p. 138122, 2020.

MA, Ying et al. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. **Journal of environmental management**, v. 174, p. 14-25, 2016.

MARTENS, Dean A.; SUAREZ, Donald L. Transformations of volatile methylated selenium in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 10, p. 1355-1361, 1999.

MARTÍNEZ-IÑIGO, M. J. et al. Bulk soil and rhizosphere bacterial community PCR-DGGE profiles and β -galactosidase activity as indicators of biological quality in soils contaminated by heavy metals and cultivated with *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. **Chemosphere**, v. 75, n. 10, p. 1376-1381, 2009.

MAXAM, Allan M.; GILBERT, Walter. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 2, p. 560-564, 1977.

MCBRIDE, M. B. Attenuation of metal toxicity in soils by biological processes. **Natural attenuation of trace element availability in soils**, p. 113-131, 2007.

MCCAULEY, Ann; JONES, Clain; JACOBSEN, Jeff. Soil pH and organic matter. **Nutrient management module**, v. 8, n. 2, p. 1-12, 2009.

MELO, V. F. et al. Chemical and biological quality of the soil in different systems of use in the savanna environment. **Agroambiente On-line**, v. 11, n. 2, p. 101-110, 2017.

MESA, Victoria et al. Bacterial, archaeal, and eukaryotic diversity across distinct microhabitats in an acid mine drainage. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1756, 2017.

MIAO, Yu et al. Profiling microbial community structures and functions in bioremediation strategies for treating 1, 4-dioxane-contaminated groundwater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 408, p. 124457, 2021.

MORAIS, Daniel et al. Responses of microbial community from tropical pristine coastal soil to crude oil contamination. **PeerJ**, v. 4, p. e1733, 2016.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. **Editora UFLA**, 2^a edição. Lavras, MG. 729 p. Lavras, 2006.

MÜLLER, Anne Kirstine et al. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. **FEMS microbiology ecology**, v. 36, n. 1, p. 11-19, 2001.

MUYZER, Gerard; SMALLA, Kornelia. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 1, p. 127-141, 1998.

NG, Shee Ping; PALOMBO, Enzo A.; BHAVE, Mrinal. Identification of a copper-responsive promoter and development of a copper biosensor in the soil bacterium *Achromobacter* sp. AO22. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2221-2228, 2012.

NIES, Dietrich H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 51, n. 6, p. 730-750, 1999.

NIES, Dietrich H.; SILVER, Simon. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. **Journal of industrial microbiology**, v. 14, n. 2, p. 186-199, 1995.

OHTAKE, H.; CERVANTES, C.; SILVER, S. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 8, p. 3853-3856, 1987.

OKUBO, Kousaku et al. Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. **Nature genetics**, v. 2, n. 3, p. 173-179, 1992.

OUYANG, Jianping et al. Proteomic analysis of differential protein expression in *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultivated in high potassium concentration. **Microbiological research**, v. 168, n. 7, p. 455-460, 2013.

ØVREÅS, L. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters**, v. 3, n. 3, p. 236-251, 2000.

PAN-HOU, Hidemitsu S.; IMURA, Nobumasa. Involvement of mercury methylation in microbial mercury detoxication. **Archives of microbiology**, v. 131, n. 2, p. 176-177, 1982.

PARK, Andrew J.; CHA, Daniel K.; HOLSEN, Thomas M. Enhancing solubilization of sparingly soluble organic compounds by biosurfactants produced by *Nocardia erythropolis*. **Water environment research**, v. 70, n. 3, p. 351-355, 1998.

PARMAR, Trishala K.; RAWTANI, Deepak; AGRAWAL, Y. K. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. **Frontiers in life science**, v. 9, n. 2, p. 110-118, 2016.

PEREIRA, Letícia Bianca; VICENTINI, Renato; OTTOBONI, Laura MM. Characterization of the core microbiota of the drainage and surrounding soil of a Brazilian copper mine. **Genetics and molecular biology**, v. 38, p. 484-489, 2015.

PIOTROWSKA-SEGET, Zofia; CYCOŃ, M.; KOZDROJ, J. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. **Applied Soil Ecology**, v. 28, n. 3, p. 237-246, 2005.

PONGRATZ, Richard; HEUMANN, Klaus G. Production of methylated mercury, lead, and cadmium by marine bacteria as a significant natural source for atmospheric heavy metals in polar regions. **Chemosphere**, v. 39, n. 1, p. 89-102, 1999.

PORTER, Stephanie S. et al. Association mapping reveals novel serpentine adaptation gene clusters in a population of symbiotic Mesorhizobium. **The ISME journal**, v. 11, n. 1, p. 248-262, 2017.

PRESCOTT LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology, 5th Edition, McGraw-Hill, New York. 1014 p. 2002

RASTOGI, Gurdeep et al. Investigation of microbial populations in the extremely metal-contaminated Coeur d'Alene River sediments. **Microbial ecology**, v. 62, n. 1, p. 1-13, 2011.

RAUBUCH, Markus et al. Specific respiration rates, adenylates, and energy budgets of soil microorganisms after addition of transgenic Bt-maize straw. **Pedobiologia**, v. 53, n. 3, p. 191-196, 2010.

REIS, Mariana P. et al. The prokaryotic community of a historically mining-impacted tropical stream sediment is as diverse as that from a pristine stream sediment. **Extremophiles**, v. 17, n. 2, p. 301-309, 2013.

RENSING, Christopher; GHOSH, Mallika; ROSEN, Barry P. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 19, p. 5891-5897, 1999.

RIEUWERTS, John S. et al. Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. **Chemical Speciation & Bioavailability**, v. 10, n. 2, p. 61-75, 1998.

ROSSELLÓ-MORA, Ramon; AMANN, Rudolf. The species concept for prokaryotes. **FEMS microbiology reviews**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

ROUSK, Johannes; BROOKES, Philip C.; BAATH, Erland. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1589-1596, 2009.

SANGER, Frederick et al. The nucleotide sequence of bacteriophage φX174. **Journal of molecular biology**, v. 125, n. 2, p. 225-246, 1978.

SCHUSTER, Stephan C. Next-generation sequencing transforms today's biology. **Nature methods**, v. 5, n. 1, p. 16-18, 2008.

SHANNON, Claude Elwood. A mathematical theory of communication. **The Bell system technical journal**, v. 27, n. 3, p. 379-423, 1948.

SHARMA, Pooja et al. Metal and metal (loids) removal efficiency using genetically engineered microbes: Applications and challenges. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, p. 125855, 2021.

SHI, Cuie et al. Comparison of bacterial communities in soil between nematode-infected and nematode-uninfected Pinus massoniana pinewood forest. **Applied Soil Ecology**, v. 85, p. 11-20, 2015.

SHI, Zhenqing et al. Quantifying microbially mediated kinetics of ferrihydrite transformation and arsenic reduction: role of the arsenate-reducing gene expression pattern. **Environmental science & technology**, v. 54, n. 11, p. 6621-6631, 2020.

SHUKLA, Keshav Prasad; SINGH, Nand Kumar; SHARMA, Shivesh. Bioremediation: developments, current practices and perspectives. **Genet Eng Biotechnol J**, v. 3, p. 1-20, 2010.

SIMPSON, Edward H. Measurement of diversity. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 688-688, 1949.

SINGH, Jay Shankar et al. Genetically engineered bacteria: an emerging tool for environmental remediation and future research perspectives. **Gene**, v. 480, n. 1-2, p. 1-9, 2011.

SOBOLEV, Dmitri; BEGONIA, Maria. Effects of heavy metal contamination upon soil microbes: lead-induced changes in general and denitrifying microbial communities as evidenced by molecular markers. **International journal of environmental research and public health**, v. 5, n. 5, p. 450-456, 2008.

SONG, Jiuwei et al. Effects of Cd, Cu, Zn and their combined action on microbial biomass and bacterial community structure. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 510-518, 2018.

SUMAMPOUW, Oksfriani Jufri; RISJANI, Yenny. Bacteria as indicators of environmental pollution. **Environment**, v. 51, p. 52, 2014.

SUN, Xiaoxu et al. Comparative characterization of microbial communities that inhabit arsenic-rich and antimony-rich contaminated sites: Responses to two different contamination conditions. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 114052, 2020.

SUNGGYUL. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. **Journal of Cleaner Production** 3: 255, 1995.

TOUCEDA-GONZÁLEZ, María et al. Combined amendment of immobilizers and the plant growth-promoting strain Burkholderia phytofirmans PsJN favours plant growth and reduces heavy metal uptake. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 91, p. 140-150, 2015.

TRÖGL, Josef et al. Pseudomonas fluorescens HK44: lessons learned from a model whole-cell bioreporter with a broad application history. **Sensors**, v. 12, n. 2, p. 1544-1571, 2012.

VAN HILLE, Rob et al. Development of a pilot-scale semi-passive system for the bioremediation of ARD. **Proceedings IMWA**, p. 957-964, 2016.

VAUDANO, Enrico; COSTANTINI, Antonella; GARCIA-MORUNO, Emilia. An event-specific method for the detection and quantification of ML01, a genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* wine strain, using quantitative PCR. **International journal of food microbiology**, v. 234, p. 15-23, 2016.

VIDALI, Mn. Bioremediation. an overview. **Pure and applied chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

VIDEIRA, Sandy Sampaio; CUNHA, Claudia Duarte da. Biorremediação de solos multicontaminados e de áreas impactadas pela mineração; acessando a diversidade microbiana através do sequenciamento de nova geração. 2018.

WAKAI, Satoshi et al. L-lactic acid production from starch by simultaneous saccharification and fermentation in a genetically engineered *Aspergillus oryzae* pure culture. **Bioresouce technology**, v. 173, p. 376-383, 2014.

WANG, Meng et al. Responses of soil microbial communities and their network interactions to saline-alkaline stress in Cd-contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 1609-1621, 2019.

WANG, YuanPeng et al. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 67, n. 1, p. 75-81, 2007.

WHITTAKER, Robert H. Evolution and measurement of species diversity. **TAXON**, v. 21, n. 2-3, p. 213-251, 1972.

XIAO, Enzong et al. Variation in rhizosphere microbiota correlates with edaphic factor in an abandoned antimony tailing dump. **Environmental Pollution**, v. 253, p. 141-151, 2019.

XIAO, Enzong et al. Microbial community responses to land-use types and its ecological roles in mining area. **Science of The Total Environment**, v. 775, p. 145753, 2021.

XIAO, Lei et al. Effects of Cd and Pb on diversity of microbial community and enzyme activity in soil. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 5, p. 551-558, 2020.

XU, Menglong et al. Bioremediation of cadmium-contaminated paddy soil using an autotrophic and heterotrophic mixture. **Rsc Advances**, v. 10, n. 44, p. 26090-26101, 2020.

YUANYUAN, LI et al. 454 Pyrosequencing analysis of bacterial diversity revealed by a comparative study of soils from mining subsidence and reclamation areas. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 313-323, 2014.

ZAKARIA, Zainul Akmar; JAAPAR, Jefri; AHMAD, Wan Azlina. Bacteria as bioindicators for metal contamination. **Biomonitoring in Tropical Coastal Ecosystems. Phang & Brown**, p. 131-135, 2004.

ZEDLER, Julie AZ et al. Pilot-scale cultivation of wall-deficient transgenic *Chlamydomonas reinhardtii* strains expressing recombinant proteins in the chloroplast. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 16, p. 7061-7070, 2016.

ZHANG, Dan et al. Shallow groundwater table fluctuations affect bacterial communities and nitrogen functional genes along the soil profile in a vegetable field. **Applied Soil Ecology**, v. 146, p. 103368, 2020.

ZHANG, Jianhui et al. Overexpression of the soybean transcription factor GmDof4 significantly enhances the lipid content of *Chlorella ellipsoidea*. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2014.

ZHANG, Rong et al. Genetically engineered *Pseudomonas putida* X3 strain and its potential ability to bioremediate soil microcosms contaminated with methyl parathion and cadmium. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1987-1997, 2016.

ZHANG, Xiuying et al. Impact of soil heavy metal pollution on food safety in China. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135182, 2015.

ZHANG, YiQiang; FRANKENBERGER JR, William T. **Effects of soil moisture, depth, and organic amendments on selenium volatilization**. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 1999.

ZHOU, Xiaojin et al. Development of a rapid immunochromatographic lateral flow device capable of differentiating phytase expressed from recombinant *Aspergillus niger* phy A2 and genetically modified corn. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 17, p. 4320-4326, 2015.

ZHU, Nali; ZHANG, Bing; YU, Qilin. Genetic engineering-facilitated coassembly of synthetic bacterial cells and magnetic nanoparticles for efficient heavy metal removal. **ACS applied materials & interfaces**, v. 12, n. 20, p. 22948-22957, 2020.