



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



ADRIANA FIDELIS COUTO SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DE
RESISTÊNCIA A CHUMBO E CÁDMIO EM BACTÉRIAS
ISOLADAS DE RIZOSFERAS DE PLANTAS COLETADAS EM
SANTO AMARO (BA)**

Feira de Santana, BA

2013

ADRIANA FIDELIS COUTO SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DE
RESISTÊNCIA A CHUMBO E CÁDMIO EM BACTÉRIAS
ISOLADAS DE RIZOSFERAS DE PLANTAS COLETADAS EM
SANTO AMARO (BA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Esposito

Feira de Santana, BA

2013

AGRADECIMENTOS

À CAPES e ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Feira de Santana pela bolsa concedida durante os 2 anos de mestrado.

À Elisa Esposito pela paciência e pela orientação.

À Cissa e aos professores Hélio e Aristóteles por toda a estrutura disponibilizada e condições adequadas ao desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Adriana Accioly por ceder os dados referentes a análise do solo.

Ao professor Cássio van den Berg por sua contribuição para a construção deste trabalho.

Ao amigo Ray pelas suas contribuições.

Aos meus pais e irmão pelo apoio dado nestes 6 anos de UEFS.

Ao Helton, secretário da pós-graduação, pela atenção e presteza

À Gorete, funcionária do Lapem, pela sua disponibilidade e cotidiana alegria.

Aos estagiários do Lapem, a Uilma, Aline, Carol, Paloma, Mona, Priscilla, João Ronaldo pelos momentos de descontração e disponibilidade.

Ao técnico Ricardo Vilas-Boas (Rick) do Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas (LAMOL) e aos funcionários do Herbário da UEFS (HUEFS), em especial a Téo Nunes e a Silvia, pela gentileza em me atender, competência e simpatia.

Aos meus amigos lamonianos Ana Luisa Lima, Ana Luisa Cortês, Marla, Tarciso, Rick, Paulinho, Catarina pelas animadas companhias.

Ao José Floriano pelas piadas ruins nas horas mais inconvenientes, além da interminável ajuda nestes dois anos.

Dedico esta dissertação aos olhos daquele que a cada passo dado desta caminhada vi brilhar.

Purificar o Subaé
Mandar os malditos embora.
Dona d'água doce quem é?
Dourada rainha senhora.
Amparo do Sergimirim
Rosário dos filtros da aquária,
Dos rios que deságuam em mim
Nascente primária.
Os riscos que corre essa gente morena,
O horror de um progresso vazio
Matando os mariscos e os peixes do rio,
Enchendo o meu canto
De raiva e de pena.

(Caetano Veloso)

RESUMO

Na década de 60, a empresa de mineração Plumbum Mineradora foi instalada no Estado da Bahia, Brasil. Esta empresa, a qual produziu lingotes de chumbo por 33 anos, deixou mais de 400.000 toneladas de escória, a qual continha, dentre outros poluentes, cádmio e chumbo. Estes metais são, atualmente, encontrados no solo do entorno das antigas instalações da fábrica, em concentrações consideradas altamente tóxicas. Este estudo começou a investigar a biorremediação da área com o isolamento de bactérias das rizosferas de plantas locais, seguido por testar a tolerância das bactérias a esses metais. Finalmente, a identificação de bactérias foi feita baseada no marcador molecular 16S rRNA. O protocolo de isolamento foi realizado em meio de Agar Nutriente e após a obtenção de cultura pura, os isolados foram submetidos a testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Cada isolado serviu de fonte para extrações de DNA para análise molecular com a região 16S rRNA. Dentre as rizosferas coletadas, as que mais se destacaram em relação a quantidade de espécies isoladas foram as plantas de hábito perene, dentre elas, a mamona (*Ricinus comunis* L.) e a embaúba (*Cecropia pachystachya* Trécul), que abrigaram juntas aproximadamente 38% de todas as espécies de bactérias obtidas. Interessante notar que da mamona (uma planta exótica no Brasil), 2/3 das bactérias foram Gram negativas, enquanto que da embaúba (uma planta nativa do Brasil), 3/4 das bactérias isoladas foram Gram positivas. Independentemente da classificação do Gram, as bactérias apresentaram maior resistência ao chumbo; 70% das Gram negativas apresentaram mudanças morfológicas acentuadas, enquanto que estas, nas Gram positivas, manifestaram-se em apenas 13%. Além disso, estas bactérias foram identificadas por meio de análise molecular, com o uso do marcador 16S rRNA. A metodologia usada foi baseada em análise de árvores de parcimônia e distância. Como resultado, a região 16S foi capaz de identificar 22% das espécies, enquanto que para o restante mostrou-se eficiente para classificação até gênero ou para agrupamentos infragenéricos. Portanto, os dados sugerem que as bactérias Gram negativas e Gram positivas possuem mecanismos de adaptações distintos em ambientes poluídos por chumbo e cádmio e que a região 16S não é eficiente como marcador universal tipo ‘código de barras’, o qual deve ser utilizado apenas como a primeira ferramenta de identificação de bactérias isoladas. Apesar deste estudo não servir como parâmetro definitivo para considerações ecológicas, ele fornece conhecimento sobre a influência do hábito da planta sobre a comunidade bacteriana e o papel da estrutura morfológica das bactérias (Gram) nos mecanismos de tolerância. Espera-se que estes dados possam ser explorados em estudos posteriores.

Palavras-chave: Santo Amaro. Rizobactérias. Resistência a metais. Contaminação por chumbo e cádmio. Análise molecular com 16S.

ABSTRACT

In the 1960's the mining company Plumbum Mineradora was installed in the State of Bahia, Brazil. This company, which produced lead ingots for 33 years, left over 400,000 tons of slag, which contained, among other pollutants, cadmium and lead. These metals are currently found in the soil surrounding the old factory, in concentrations considered highly toxic. A study was started to investigate possible bioremediation in the area with the isolation of bacteria from the rhizosphere of local plants, followed by the test in their performance in metals contaminant tolerance. Finally, identification of the bacteria was made based on molecular marker 16S rRNA. The isolation protocol was carried out using Nutrient Agar and after obtaining a pure culture. The isolates were then subjected to tests of Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Each isolate served as a source for extraction of DNA for molecular analysis with 16S rRNA region. Among the rhizospheres collected, those from which the greatest number of species were isolated from plants with a perennial habit, among them the castor bean (*Ricinus communis* L.) and embaúba (*Cecropia pachystachya* Trécul) which together comprised approximately 38% of all species of bacteria obtained. Interestingly, from the castor bean (an exotic plant in Brazil), 2/3 of the bacteria were Gram negative, while from the embaúba (a native plant of Brazil), 3/4 of the bacteria isolated were of Gram positive. Regardless of the classification of Gram, the bacteria studied showed higher tolerance to lead; 70% of Gram negative bacteria showed conspicuous morphological changes, whereas of those that were Gram positive, only 13% demonstrated. In addition, these bacteria have been identified by molecular analysis using the 16S rRNA marker. The used methodology based on analysis of parsimony and distance trees. As a result, the region 16S was able to identify only 22% of species while the remain species could only be identified to genus or to infra-generic groups. Therefore, the data suggest that the Gram negative and Gram positive bacteria have distinct mechanisms of adaptation in environments polluted by lead and cadmium and that the 16S region is not an efficient universal barcode marker, which should be used only as the first step on the identification of bacteria. Although this study does not provide a final parameter for ecological factors under consideration here, it provides an insight into the influence of the plant habitat on bacterial communities, and the role of Gram in the mechanisms of tolerance. It is hoped to explore these aspects in the further studies.

Keywords: Santo Amaro. Rhizobacteria. Metal resistance. Contamination by lead and cadmium. Molecular analysis with 16S.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 01:** Caracterização do solo de Santo Amaro por microcópico eletrônico de varredura.
- Figura 02:** Principais mecanismos de tolerância a metais pesados nas bactérias.
- Figura 03:** Interação planta-microrganismos em solo contaminado por metal pesado.
- Figura 04:** Localização do município de Santo Amaro-BA.
- Figura 05:** Entorno das antigas instalações da Plumbum Mineradora e pontos de coleta.
- Figura 06:** Fitas de DNA com primers universais anelados.
- Figura 07:** Simulação de uma Associação Direta Monofilética.
- Figura 08:** Simulação de uma Associação Indireta Monofilética.
- Figura 09:** Simulação de uma Associação Direta de Grupo.
- Figura 10:** Simulação de uma Associação Direta Parafilética.
- Figura 11:** Simulação de uma Posição Isolada.
- Figura A:** Caracterização física do solo.
- Figura B:** Resultado analítico quanto a fertilidade do solo.
- Figura 12:** Quantidade de espécies Gram positivas e Gram negativas isoladas do solo de Santo Amaro.
- Figura 13:** Árvore de Distância do gênero *Aeromonas* com base na região 16S rRNA, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei.
- Figura 14:** Consenso estrito das 100 árvores mais parcimoniosas do gênero *Aeromonas* obtidas pela busca heurística.
- Figura 15:** Árvore de distância do gênero *Bacillus*.
- Figura 16:** Consenso estrito das 50 árvores mais parcimoniosas do gênero *Bacillus* obtidas pela busca heurística.
- Figura 17:** Árvore de Distância do gênero *Exiguobacterium*.
- Figura 18:** Consenso estrito das 29 árvores mais parcimoniosas do gênero *Exiguobacterium* obtidas pela busca heurística.
- Figura 19:** Árvore de distância do gênero *Lysinibacillus*.
- Figura 20:** Consenso estrito das 80 árvores mais parcimoniosas do gênero *Lysinibacillus* obtidas pela busca heurística.
- Figura 21:** Árvore de distância do gênero *Pseudochrobactrum*.
- Figura 22:** Consenso estrito das 80 árvores mais parcimoniosas do gênero *Pseudochrobactrum* obtidas pela busca heurística.
- Figura 23:** Árvore de distância do gênero *Comamonas*.

Figura 24: Consenso estrito das 70 árvores mais parcimoniosas do gênero *Comamonas* obtidas pela busca heurística.

Figura 25: Árvore de distância do gênero *Citrobacter*.

Figura 26: Consenso estrito das 10 árvores mais parcimoniosas do gênero *Citrobacter* obtidas pela busca heurística.

Figura 27: Árvore de Distância do gênero *Enterobacter*.

Figura 28: Consenso estrito das 10 árvores mais parcimoniosas do gênero *Enterobacter* obtidas pela busca heurística.

Figura 29: Árvore de distância do gênero *Escherichia*.

Figura 30: Consenso estrito das 28 árvores mais parcimoniosas do gênero *Escherichia* obtidas pela busca heurística.

Figura 31: Árvore de distância do gênero *Klebsiella*.

Figura 32: Consenso estrito das 2 árvores mais parcimoniosas do gênero *Klebsiella* obtidas pela busca heurística.

Figura 33: Árvore de distância do gênero *Pantoea*.

Figura 34: Consenso estrito das 30 árvores mais parcimoniosas do gênero *Pantoea* obtidas pela busca heurística.

Figura 35: Árvore de distância do gênero *Providencia*.

Figura 36: Consenso estrito das 60 árvores mais parcimoniosas do gênero *Providencia* obtidas pela busca heurística.

Figura 37: Árvore de distância do gênero *Serratia*.

Figura 38: Consenso estrito das 10 árvores mais parcimoniosas do gênero *Serratia* obtidas pela busca heurística.

Figura 39: Árvore de distância do gênero *Enterococcus*.

Figura 40: Consenso estrito das 2 árvores mais parcimoniosas do gênero *Enterococcus* obtidas pela busca heurística.

Figura 41: Árvore de distância do gênero *Leucobacter*.

Figura 42: Consenso estrito das 3 árvores mais parcimoniosas do gênero *Leucobacter* obtidas pela busca heurística.

Figura 43: Árvore de distância do gênero *Microbacterium*.

Figura 44: Consenso estrito das árvores mais parcimoniosas do gênero *Microbacterium* obtidas pela busca heurística.

Figura 45: Árvore de distância do gênero *Arthrobacter*.

Figura 46: Consenso estrito das 21 árvores mais parcimoniosas do gênero *Arthrobacter* obtidas pela busca heurística.

Figura 47: Árvore de distância do gênero *Acinetobacter*.

Figura 48: Consenso estrito das 20 árvores mais parcimoniosas do gênero *Acinetobacter* obtidas pela busca heurística.

Figura 49: Árvore de distância do gênero *Kurthia*.

Figura 50: Consenso estrito das 3 árvores mais parcimoniosas do gênero *Kurthia* obtidas pela busca heurística.

Figura 51: Árvore de distância do gênero *Pseudomonas*.

Figura 52: Consenso estrito das 40 árvores mais parcimoniosas do gênero *Pseudomonas* obtidas pela busca heurística.

Figura 53: Árvore de distância do gênero *Staphylococcus*.

Figura 54: Consenso estrito das 52 árvores mais parcimoniosas do gênero *Staphylococcus* obtidas pela busca heurística.

Figura 55: Árvore de distância do gênero *Lactococcus*.

Figura 56: Consenso estrito das 80 árvores mais parcimoniosas do gênero *Lactococcus* obtidas pela busca heurística.

Figura 57: Árvore de distância do gênero *Stenotrophomonas*.

Figura 58: Consenso estrito das 40 árvores mais parcimoniosas do gênero *Stenotrophomonas* obtidas pela busca heurística.

Figura 59: Bactérias em controle negativo.

Figura 60: Bactérias em controle negativo.

Figura 61: Bactérias em controle negativo.

Figura 62: Bactérias em controle negativo.

Figura 63: Bactérias em controle negativo.

Figura 64: Bactérias em meio com concentração de 3,2 de chumbo.

Figura 65: Bactérias em meio com concentração de 3,2 de cádmio.

Figura 66: Bactérias em meio com concentração de 6 de cádmio.

Figura 67: Bactérias em meio com concentração de 12 de cádmio.

Figura 68: Bactérias em meio com concentração de 25 de cádmio.

Figura 69: Bactérias em meio com concentração de 50 de cádmio.

Figura 70: Bactérias em meio com concentração de 50 de cádmio.

Figura 71: Bactérias em meio com concentração de 100 de cádmio.

Figura 72: Bactérias em meio com concentração de 100 de cádmio.

- Figura 73:** Bactérias em meio com concentração de 100 de cádmio.
- Figura 74:** Bactérias em meio com concentração de 400 de cádmio.
- Figura 75:** Bactérias em meio com concentração de 800 de chumbo.
- Figura 76:** Bactérias em meio com concentração de 800 de chumbo.
- Figura 77:** Bactérias em meio com concentração de 800 de chumbo.
- Figura 78:** Bactérias em meio com concentração de 1050 de chumbo.
- Figura 79:** Bactérias em meio com concentração de 1050 de chumbo.
- Figura 80:** Bactérias em meio com concentração de 1050 de chumbo.
- Figura 81:** Bactérias em meio com concentração de 1050 de chumbo.
- Figura 82:** Bactérias em meio com concentração de 1400 de chumbo.
- Figura 83:** Bactérias em meio com concentração de 1400 de chumbo.
- Figura 84:** Bactérias em meio com concentração de 1400 de chumbo.
- Figura 85:** Bactérias em meio com concentração de 1600 de chumbo.
- Figura 86:** Bactérias em meio com concentração de 1600 de chumbo.
- Figura 87:** Crescimento de bactérias da família Bacillaceae em meios contendo diferentes concentrações de chumbo (gráfico azul) e cádmio (gráfico vermelho).
- Figura 88:** Crescimento de Microrganismos da família Enterobacteriaceae em meios contendo diferentes concentrações de chumbo (gráfico azul) e cádmio (gráfico vermelho).
- Figura 89:** Gráficos representando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio com chumbo e a quantidade de espécies de bactérias para cada uma das concentrações.
- Figura 90:** Gráfico representando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio com cádmio e a quantidade de espécies de bactérias em cada uma das concentrações.
- Figura 91:** Distribuição de bactérias gram positivas e gram negativas em mamona e embaúba.
- Figura 92:** Alterações morfológicas visíveis em gram positivas e gram negativas: a, em chumbo; b, em cádmio.
- Figura 93:** Cópias parálogas em espécie do gênero *Citrobacter*.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01: Plantas coletadas no entorno das antigas instalações da fábrica Plumbum.

Tabela 02: Famílias e gêneros de bactérias identificados por meio do 16S rRNA e a quantidade isolada.

Tabela 03: Nome proposto para as bactérias isoladas com base no 16S rRNA e o tipo de associação que elas formam com as espécies obtidas do GB: Associação Direta Monofilética (A.D.M.); Associação Direta de Grupo (A.D.G.); Posição Isolada (P.I.) e Associação Direta Parafilética (A.D.P.).

Tabela 04: Concentração Inibitória Mínima das espécies de *Aeromonas* em chumbo e cádmio.

Tabela 05: CIM das espécies de *Bacillus*, *Exiguobacterium* e *Lysinibacillus* em chumbo e cádmio.

Tabela 06: CIM da espécie de *Pseudochrobactrum* em chumbo e cádmio.

Tabela 07: *Não houve crescimento da espécie *Comamonas testosteroni* 2117.16 em cádmio e chumbo durante os testes.

Tabela 08: CIM das espécies de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *serratia* e *Providencia* em chumbo e cádmio

Tabela 09: CIM das espécies de *Enterococcus* em chumbo e cádmio

Tabela 10: CIM das espécies de *Leucobacter* e *Microbacterium* em chumbo e cádmio.

Tabela 11: CIM das espécies de *Arthrobacter* em chumbo e cádmio.

Tabela 12: CIM das espécies de *Acinetobacter* em chumbo e cádmio.

Tabela 13: CIM das espécies de *Kurthia* em chumbo e cádmio.

Tabela 14: CIM das espécies de *Pseudomonas* em chumbo e cádmio.

Tabela 15: CIM das espécies de *Staphylococcus* em chumbo e cádmio.

Tabela 16: CIM das espécies de *Lactococcus* em chumbo e cádmio.

Tabela 17: CIM das espécies de *Stenotrophomonas* em chumbo e cádmio.

SUMÁRIO

Agradecimentos	III
Dedicatória	IV
Epígrafe	V
Resumo	VI
Abstract	VIII
Índice de Figuras	X
Índice de tabelas	XIV
1 Introdução	19
2 Objetivos	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 Revisão da literatura	23
3.1 O caso Santo Amaro	23
3.2 Características do solo de Santo Amaro	23
3.3 Concentração Inibitória Mínima	24
3.4 Tolerância das bactérias a metais pesados de chumbo e cádmio	25
3.4.1 Potenciais usos de bactérias tolerantes a metais pesados	26
3.5 Bactérias Gram positivas X Gram negativas em solos contaminados	28
3.6 Identificação molecular de bactérias	29
4 Materiais e métodos	31
4.1 Área de coleta de solo rizosférico	31
4.2 Análise química e física do solo	32
4.3 Coleta de plantas	32
4.4 Coleta, isolamento e preservação de rizobactérias	34
4.5 Identificação de microrganismos	35
4.5.1 Extração e purificação de DNA	35
4.5.2 Amplificação e sequenciamento	36
4.5.3 Métodos computacionais	37
4.5.3.1 Análise comparativa de sequências (BLAST)	37

4.5.3.2 Análise de Distância	37
4.5.3.3 Análise de Parcimônia	37
4.5.4 Método de identificação das bactérias a partir do 16S	37
4.5.4.1 Associação Direta Monofilética	37
4.5.4.2 Associação Indireta Monofilética	38
4.5.4.3 Associação Direta de Grupo	39
4.5.4.4 Associação Direta Parafilética	39
4.5.4.5 Posição isolada	40
4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima em metais pesados	41
5 Resultados	42
5.1 Caracterização física e química do solo de Santo Amaro	42
5.2 Visão geral de famílias e gêneros assinaladas	44
5.3 Bactérias Gram positivas X Gram negativas	45
5.4 Identificação das amostras obtidas com base na análise do 16S rRNA	46
5.5 Análise molecular	53
5.5.1 Aeromonadaceae	53
5.5.2 Bacillaceae	56
5.5.2.1 <i>Bacillus</i>	56
5.5.2.2 <i>Exiguobacterium</i>	59
5.5.2.3 <i>Lysinibacillus</i>	62
5.5.3 Brucellaceae	65
5.5.4 Comamonadaceae	68
5.5.5 Enterobacteriaceae	71
5.5.5.1 <i>Citrobacter</i>	71
5.5.5.2 <i>Enterobacter</i>	74
5.5.5.3 <i>Escherichia</i>	77
5.5.5.4 <i>Klebsiella</i>	80
5.5.5.5 <i>Pantoea</i>	83
5.5.5.6 <i>Providencia</i>	86
5.5.5.7 <i>Serratia</i>	89

5.5.6 Enterococcaceae	92
5.5.7 Microbacteriaceae	95
5.5.7.1 <i>Leucobacter</i>	95
5.5.7.2 <i>Microbacterium</i>	98
5.5.8 Micrococcaceae	101
5.5.9 Moraxellaceae	104
5.5.10 Planococcaceae	107
5.5.11 Pseudomonadaceae	110
5.5.12 Staphylococcaceae	113
5.5.13 Streptococcaceae	116
5.5.14 Xanthomonadaceae	119
5.6 Crescimento Inibitório Mínimo em chumbo e cádmio	122
5.6.1 Aeromonadaceae	122
5.6.2 Bacillaceae (<i>Bacillus</i> , <i>Exiguobacterium</i> e <i>Lysinibacillus</i>)	123
5.6.3 Brucellaceae	126
5.6.4 Comamonadaceae	127
5.6.5 Enterobacteriaceae (<i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Providencia</i> e <i>Serratia</i>)	127
5.6.6 Enterococcaceae	133
5.6.7 Microbacteriaceae	134
5.6.8 Micrococcaceae	135
5.6.9 Moraxellaceae	136
5.6.10 Planococcaceae	137
5.6.11 Pseudomonadaceae	138
5.6.12 Staphylococcaceae	139
5.6.13 Streptococcaceae	140
5.6.14 Xanthomonadaceae	141
5.7 Concentração Inibitória Mínima	142
5.8 Distribuição de bactérias Gram positivas e Gram negativas em mamona (<i>Ricinus communis</i> L.) e embaúba (<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul)	143
5.9 Alterações fenotípicas em Gram positivas e Gram negativas em chumbo e	144

cádmio	
6 Discussão	146
6.1 Caracterização do solo	146
6.2 Análise Molecular com 16S rRNA	146
6.3 Relação das bactérias Gram positivas e negativas com as plantas de Santo Amaro e suas tolerâncias aos metais de chumbo e cádmio	148
7 Considerações Finais	150
8 Referência	151
9 Anexo	163
9.1 Orientação para as fotos	163
9.2 Resumo da Dissertação	203

1 INTRODUÇÃO

Os metais são componentes naturais do solo. Alguns deles são essenciais para plantas e bactérias, enquanto outros não tem funções biológicas até então conhecidas (Leyval *et al.*, 1997). O termo metal pesado inclui um grupo de metais e semi-metais associados à toxicidade e com potencial poluidor, mesmo que alguns, em baixas concentrações, sejam essenciais para organismos vivos (Biondi, 2010). Os metais não podem ser degradados e se não forem retirados, ocorre a acumulação progressiva e persistente do metal no solo (Biondi, 2010).

Biondi (2010) estima que a permanência destes metais em solo seja de 380 anos para Cd e 3000 anos para Pb. Nas últimas décadas, certas atividades industriais e agropecuárias tem aumentado significativamente a concentração desses elementos químicos em algumas áreas, tornando a poluição por metal um dos mais graves problemas ambientais atuais (Yan-de *et al.*, 2006).

O município de Santo Amaro (BA) é um exemplo de área contaminada por metais resultante do processo industrial de fabricação de lingotes de chumbo. Na década de 50 foi instalado nesta região a Companhia Brasileira de Chumbo (COBRAC), um complexo metalúrgico cuja atividade resultou em forte contaminação do solo e da população desta região com cádmio e, em maior quantidade, chumbo (Anjos, 2003).

Segundo Machado *et al.* (2004), este processo de contaminação se intensificou na cidade baiana principalmente porque o chumbo, sendo um material granular e com capacidade elevada de suporte, foi usado para pavimentação de ruas, além de ser usado na construção de casas e escolas. Quando não aproveitada, a escória proveniente do chumbo era disposta a céu aberto, próximo à margem do rio Subaé, fato que agravou a contaminação do ambiente e da população local (Anjos, 2003). Em 1994, a então chamada Plubum Mineradora (antiga COBRAC) foi obrigada a reunir e soterrar seus dejetos em um vale, o que fez sem as devidas medidas de proteção, causando enorme impacto na saúde pública, na economia local e no meio ambiente, percebidos até os dias atuais (Anjos, 2003; Carvalho *et al.*, 2003; Portella *et al.*, 2009).

Segundo a Assessoria de Comunicação Social da Secretaria da Saúde do Estado da Bahia, em abril de 2010 Santo Amaro contava 619 ex-trabalhadores da fábrica mortos em decorrência da contaminação por metais pesados e vários outros que sofreram sequelas. Além disso, diversas pessoas que moravam no entorno da empresa também morreram ou sofreram devido a contaminação. Segundo Pelegrini, da revista Carta Capital (2012), muitos moradores apresentam saturnismo, além de problemas respiratórios, motores e neurológicos.

Essa contaminação por metais pesados, principalmente chumbo, em Santo Amaro consiste em um problema grave e de difícil solução. Instituições relevantes como a Organização Panamericana da Saúde e a *Alliance to End Childhood Lead Poisoning / Environmental Defense Fund* classificaram Santo Amaro como uma das regiões mais poluídas do planeta (Carvalho *et al.*, 2001). Tais poluentes não são facilmente retirados da natureza, persistindo nesta indefinidamente, nem do corpo de indivíduos afetados (Carvalho *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2003; Rajkumar e Freitas, 2008). De acordo com o médico Rodrigo Muniz, em entrevista a Pelegrini (2012), a desintoxicação é feita ou naturalmente, esperando o organismo se livrar do metal (o que dura entre 20 a 30 anos) ou com aplicação de quelantes, cujo uso possui elevado índice de mortalidade.

Contudo, a desintoxicação dos moradores não será bem sucedida enquanto houver poluentes no ar, água, frutas, animais e solo. Neste último, o nível de metal pesado é elevado e age diretamente sobre a microbiota local. Microrganismos desempenham importantes funções no solo como decompor substâncias complexas, proteger plantas de organismos patogênicos, solubilizar fosfato e outros nutrientes, tendo destacada relevância nos ciclos biogeoquímicos (Abdelatey *et al.*, 2011). Logo, sua existência no solo é relevante tanto para outros organismos quanto para a própria manutenção da estrutura do solo. Porém, a contaminação altera esse integrado sistema já que diminui a biomassa e diversidade da microbiota, pois modifica moléculas e estruturas essenciais a sua sobrevivência como membrana celular, enzimas e DNA (Rathnayake *et al.*, 2009; Abd-Elnaby *et al.*, 2011; Chovanová *et al.*, 2004).

Logo, para sobreviver a esta pressão imposta, os microrganismos desenvolveram mecanismos que auxiliaram a tolerar os contaminantes, além de retirá-los ou amenizar sua presença no ambiente por meio de bombas de efluxo, detoxificação enzimática, sequestro iônico intra e extra celular, dentre outros (Ron *et al.*, 1992; Castro-Silva *et al.*, 2003; Rathnayake *et al.*, 2009). Este processo de remoção ou atenuação da toxicidade do poluente no ambiente é conhecido como biorremediação, realizado por bactérias, plantas, algas e fungos (Head, 1998; Zeng *et al.*, 2010). Porém os organismos mais utilizados são as bactérias, as quais, além de retirar do solo ou amenizar a toxicidade do metal, promove a ligação do poluente com constituintes do próprio solo (Hernandez *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 2010).

Nos dias atuais, além da aplicação destes microrganismos, tolerantes a metais, em processo de biorremediação, vem sendo largamente difundido, a utilização destes também como biosensor. O biosensoriamento consiste no uso de bactérias como sensores capazes de detectar a biodisponibilidade de metais, além de distingui-los no ambiente (Kohler *et al.*,

2000; Tauriainen *et al.*, 2000; Magrisso *et al.*, 2008). Nesta técnica, há a ativação de genes por um metal ou por um grupo de metais os quais desencadeiam a emissão de um sinal proporcional à concentração dos metais no ambiente: quanto maior é o sinal emitido pelo gene, maior a biodisponibilidade do metal no ambiente (Magrisso *et al.*, 2008).

Neste contexto, o isolamento e identificação de bactérias resistentes a metais pesados é importante, pois será a base de trabalhos futuros de detecção e descontaminação de ambientes poluídos. Este trabalho teve como objetivo isolar, identificar e avaliar a resistência de rizobactérias aos metais chumbo e cádmio coletados de plantas localizadas no entorno das antigas instalações da empresa Plumbum Mineradora em Santo Amaro, no estado da Bahia

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Isolar, identificar e avaliar tolerância aos metais, chumbo e cádmio, de rizobactérias de plantas representativas em uma área altamente impactada por metais pesados, Santo Amaro (BA).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar plantas (*voucher*) representativas na área de estudo, herborizar, identificar e depositar no Herbário da UEFS
- Isolar as rizobactérias das plantas (nativas ou exóticas) mais representativas na área;
- Identificar molecularmente as rizobactérias através da região 16S rRNA;
- Verificar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meios de cultura contendo cádmio ou chumbo em concentrações de 3,2 a 3200 µg/mL.
- Depositar as sequências identificadas no *GenBank* (GB) e depositar as linhagens na Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia – CCMB, da UEFS

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O CASO SANTO AMARO

Durante o processo produtivo da empresa Plumbum (antiga COBRAC), as escórias geradas eram compostas por metais pesados, como arsênio, cádmio, bismuto e, principalmente, chumbo, os quais eram depositados no meio ambiente onde ficavam sujeitos a intempéries químicas ou biológicas (Sobral). Além disso, era lançado pelas chaminés da fábrica material particulado constituído por PbO (litargírio), Pb₃O₄ (óxido salino de chumbo), PbSO₄ (sulfato de chumbo). Agravando a situação, era emitido também SO₂ (anidro sulfuroso), que quando em época de chuvas gerava chuva ácida, tornando os metais solúveis no meio ambiente (Sobral).

As atividades desta empresa duraram até 1993, ano de seu fechamento (Machado *et al.*, 2004.). Segundo Pelegrini (2012), durante os 33 anos de intensa produção, foram depositados, sem tratamento prévio, 490 mil toneladas destes resíduos tóxicos no entorno da fábrica, próximo ao rio Subaé, e parte foi doada à administração municipal, a qual pavimentou ruas e empregou em pátios e muros de escolas e casas. Devido a esta dispersão do contaminante, elevados níveis de chumbo foram encontrados no solo, ar, água desta região e no sangue de crianças e adultos santoamarenses (Carvalho *et al.* 1985, 1996 e 2003). Além da população, animais e vegetais da região também apresentam altos níveis deste metal, o que agrava a situação da população, uma vez que esta consome carne de pequenos criadouros e hortas locais (Carvalho *et al.*, 2003).

Em abril de 2010, a Assessoria de Comunicação Social da Secretaria da Saúde do Estado da Bahia, noticiou que 619 ex-trabalhadores da fábrica morreram e vários apresentam seqüelas, assim como seus parentes e pessoas que moravam no entorno da empresa. Quase 20 anos após o encerramento de suas atividades, escórias no entorno da fábrica e resíduos de chumbo no sangue da população ainda estão presentes.

O problema de Santo Amaro, desde 2003, já está na esfera federal e a população ainda sofre as consequências da poluição.

3.2 CARACTERÍSTICAS DO SOLO DE SANTO AMARO

O solo onde se encontra as antigas instalações da fábrica da Plumbum Mineradora é do tipo residual de folhelho, de alto potencial expansivo, denominado popularmente de Massapê,

rico em argila montmorilonita 2:1 e levemente ácido (pH em torno de 5 - 6) (Ribeiro *et al.*, 1991; Machado *et al.*, 2004), sendo encontrado em extensas áreas do Nordeste Brasileiro.

O solo argiloso tipo 2:1 tem as unidades celulares ligadas por forças de van der Waals compostas por camadas tetraédricas de sílica cercadas por camada octaédrica de alumínio (Dube *et al.*, 2001). Em sua superfície é constituído por grupos hidroxil os quais tem facilidade de trocar o hidrogênio por íons de Cd e Pb em pH acima de 6, apresentando, portanto, uma grande capacidade de retenção dos poluentes (Dube *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2004). Na fig. 01 é observado partículas de chumbo (em branco) aderidas a argila do solo de Santo Amaro (em cinza) (Lima e Bernardez, 2010).

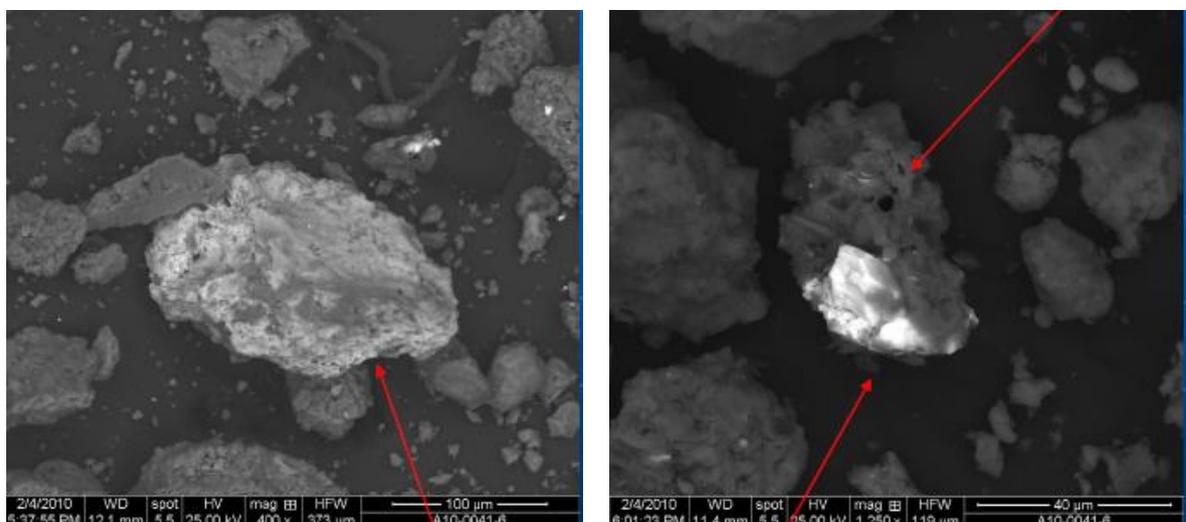


Figura 01: Caracterização do solo de Santo Amaro por microscópio eletrônico de varredura. Fonte: Lima e Barnadez, 2010.

3.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração de uma substância que inibe o crescimento de um microrganismo (Madigan *et al.*, 2010).

A determinação do CIM para metais é obtida em placas de Petri contendo meios de cultura com distintas concentrações de metal pesado aos quais microrganismos isolados são adicionados (CLSI, 2003). Após 24 horas de incubação, o crescimento do microrganismo é determinado por visualização direta, sendo este comparado ao seu crescimento em meio sem metal pesado (controle negativo) (Ostrosky *et al.*, 2008).

A aplicação deste teste permite a rápida avaliação (24 horas) da resistência de microrganismos aos metais de chumbo e cádmio, indicando a concentração máxima suportada pelo metabolismo das cepas sob avaliação.

3.4 TOLERÂNCIA DAS BACTÉRIAS A METAIS PESADOS DE CHUMBO E CÁDMIO

O chumbo e o cádmio são metais perigosos, muito estáveis, tóxicos e não se degradam na natureza (Kermani *et al.*, 2010). Ambos os metais tem a capacidade de entrar nas células de bactérias pelo sistema de regulação de íons, uma vez que as proteínas transmembranas não diferenciam os metais de outros íons divalentes (Charrier *et al.*, 2010).

No interior dos microrganismos, o cádmio e o chumbo causam danos irreversíveis às células, pois se ligam a proteínas respiratórias e produzem oxigênios reativos (Lee *et al.*, 2001). Além disso, ambos os metais provocam nas células bacterianas redução na taxa de crescimento, diminuição da densidade celular e causam a sua morte mesmo em níveis abaixo de 1 ppm (Abou-Shanab *et al.*, 2007; Abd-Elnaby *et al.*, 2011).

Porém, algumas bactérias se adaptam a presença desses metais em níveis superior a 1 ppm, proliferam e se tornam dominantes no ambiente (Kuiper *et al.*, 2004). Para isto, estes procariotos desenvolveram mecanismos de resistência que permitiram a sobrevivência nestas condições estressantes (fig.02). Estes mecanismos, codificados por genes cromossomais ou por loci plasmidiais, incluem: bombas de efluxo, acúmulo e complexação do metal dentro da célula, redução do contaminante a uma forma menos tóxica (Abdelatey *et al.*, 2011). Tais respostas adaptativas, que envolvem, algumas vezes, mudanças fenotípicas, além de tornar as bactérias resistentes aos metais, promovem a biorremediação de solos contaminados (Gummersheimer e Giblin, 2003; Abou-Shanab *et al.*, 2007; Kermani *et al.*, 2010; Ahemad e Malik, 2012).

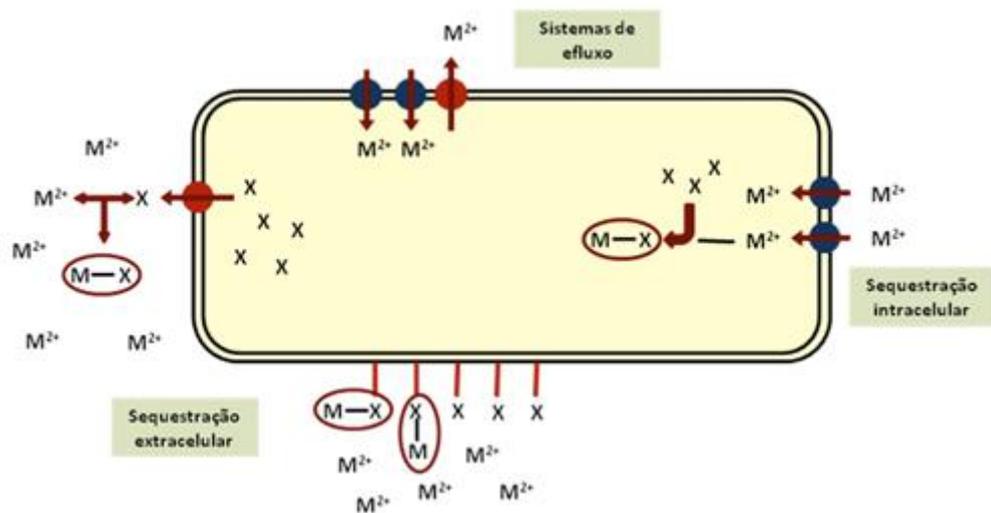


Figura 02: Principais mecanismos de tolerância a metais pesados nas bactérias. Fonte:

http://www.esb.ucp.pt/twt5/motor/display_texto_NoMargins.asp?pagina=Investigacao65824083&bd=ESB

3.4.1 POTENCIAIS USOS DE BACTÉRIAS TOLERANTES A METAIS PESADOS

Segundo Cruz-Vega *et al.*, bactérias tolerantes a metais pesados apresentam interessantes aplicações biotecnológicas. Dentre elas, a biorremediação é um processo biotecnológico que remove ou reduz poluentes do ambiente, alterando muito pouco a matriz do solo, ao contrário de processos físicos ou químicos, como escavação, incineração e extração com solventes que além de caros não garantem a remoção permanente do contaminante (Head, 1998; Garbisu e Alkorta, 2003; Rajkumar & Freitas, 2008). Logo, a biorremediação é uma técnica promissora para despoluir o ambiente sem agredi-lo e tem como uma das principais ferramentas a rizorremediação e a fitoremediação (Kuiper *et al.*, 2004).

A rizorremediação consiste na degradação de poluentes por microrganismos que se encontram nas raízes de plantas, as rizobactérias. Estas, segundo Hong *et al.* (2010) podem ser classificadas em deletérias e em rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria* – PGPR). Estas últimas utilizam os exsudatos de plantas como fontes de carbono os quais estimulam a sobrevivência e a ação das rizobactérias no solo (Kuiper *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2010). Algumas rizobactérias produzem hormônios (auxinas, citocinas, giberelinas) que promovem o desenvolvimento das plantas hospedeiras além de auxiliar na sobrevivência destas em ambientes contaminados por metais pesados (Huang *et al.*, 2005).

Além disso, estes procaríotos resistentes participam do processo de fitoremediação (Yan-de *et al.*, 2006). Este consiste na descontaminação do ambiente com o uso de plantas, as quais extraem, imobilizam, retêm e/ou degradam contaminantes (Gerhardt *et al.*, 2006). Quando se trata de metais pesados, estes não podem ser degradados por plantas, apenas extraídos ou estabilizados (Gerhardt *et al.*, 2006). E para isto, as rizobactérias produzem substâncias, como o sideróforos e o biosurfactantes, que além de proteger as plantas dos efeitos danosos dos metais, facilitam a bioremoção destes no ambiente (fig. 3) (Rajkumar *et al.*, 2010; Rajkumar *et al.*, 2012).

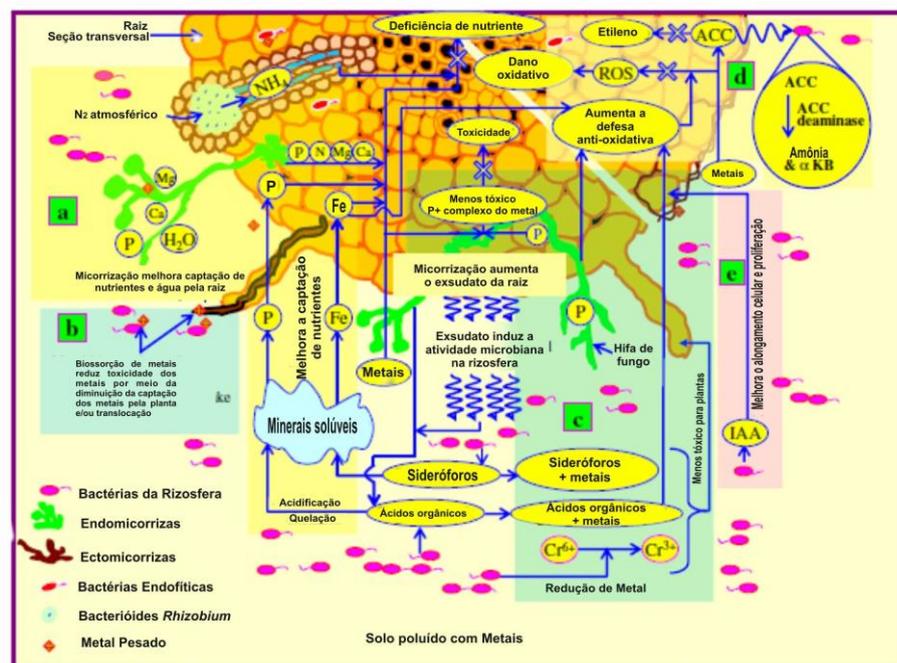


Figura 03: Interação planta-Microorganismos em solo contaminado por metal pesado. Fonte: Rajkumar *et al.*, 2012.

Vários estudos constataram que na presença de metais como chumbo e cádmio, rizobactérias são induzidas a produzirem sideróforos (Dimkpa *et al.*, 2008; Sinha e Mukherjee, 2008; Braud *et al.*, 2009). Estes compostos apresentam alta afinidade ao íon ferro (essencial a todas as formas de vida por participar de processos respiratórios e síntese de DNA) além de formar estruturas estáveis com metais como cádmio e chumbo, aumentando a solubilidade destes no ambiente e consequentemente facilitando a retirada destes do solo pelas plantas (Silva-Estencio *et al.*, 2005; Rajkumar *et al.*, 2010). Por sua vez, os biosurfactantes são moléculas anfipáticas que promovem a remoção dos metais do solo por meio de complexação. Este processo, quando realizado em solo argiloso (montimorilonita), é mais eficiente com biosurfactantes aniônicos os quais precipitam cádmio e chumbo, tornando-os

indisponíveis no ambiente e protegendo as plantas contra estes poluentes (Beveridge e Pickering, 1983; Miller, 1995).

Outra utilização promissora desses microrganismos resistentes é o biosensoriamento no qual bactérias são imobilizadas em um transdutor e estas quando em contato com o metal pesado produzem sinais bioquímicos que são convertidos em respostas elétricas, os quais determinam e quantificam os poluentes ali presentes (D'Souza, 2001; Charrier *et al.*, 2010). Segundo D'Souza, 2001, estes procaríotos funcionam como bons biosensores por serem amplamente encontrados na natureza, por se adaptarem a condições adversas além de serem sensíveis a baixas concentrações de poluentes no meio ambiente..

Portanto, a necessidade de se remediar locais poluídos proporcionou desenvolvimento de tecnologias como a rizorremediação, a fitoremediação e o biosensoriamento. Porém, estes ainda necessitam de estudos com abordagens multidisciplinares, envolvendo microbiologia, engenharia, ecologia, geologia e química (Boopathy, 2000).

3.5 BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS X GRAM NEGATIVAS EM SOLOS CONTAMINADOS

As bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos: Gram positivas e Gram negativas. Esta classificação se baseia em características da parede celular que, apesar de presente nos dois grupos, diferem quanto à estrutura química e física (Koneman *et al.*, 2008).

A parede celular de bactérias tanto Gram positivas quanto Gram negativas é formada, principalmente, por peptidoglicano, estrutura responsável, juntamente com o citoesqueleto, por dar forma e rigidez a célula bacteriana, além de constituir uma barreira física contra o ambiente externo (Koneman *et al.*, 2008). Porém, a parede celular das bactérias Gram positivas é formada por uma espessa camada de peptidoglicano a qual possui, em sua estrutura, ácidos tecóicos cujos monômeros se unem por ligação fosfodiéster, conferindo à parede uma carga negativa (Silhavy *et al.*, 2010). Por sua vez, a parede celular das bactérias Gram negativas é constituída por uma fina camada de peptidoglicano, além de uma membrana externa composta por fosfolipídeos e lipopolissacarídeos, sendo estes últimos os responsáveis por conferir carga negativa à este grupo de bactérias (Silhavy *et al.*, 2010).

Estas diferenças físicas e químicas entre estes dois grupos conferem a estes comportamentos distintos no meio ambiente, inclusive em ambientes poluídos com cádmio e chumbo (Silver, 1998). Nas Gram positivas, a resistência ao cádmio é conferida pelo sistema Cd^{2+} ATPase, responsável pelo efluxo do metal da célula, enquanto que chumbo é acumulado

no meio intracelular sob a forma $Pb_3(PO_4)_2$. Por sua vez, nas Gram negativas, o cádmio é bombeado por um complexo formado por três polipeptídeos localizado nas membranas plasmática (CzcA), externa (CzcC) e em ambas as membranas (CzcB), enquanto que ao chumbo a resistência é conferida por ATPase efluxo (Silver, 1998).

Estes mecanismos de resistência são regulados por genes que podem estar em cromossomos ou nos plasmídeos (Silver, 1998). Porém, independentemente dos mecanismos de resistência empregado por cada tipo de bactéria, estes proporcionam, além da sobrevivência em ambientes com elevada contaminação por metais, a retirada destes do ambiente (Belliveau *et al.*, 1987), promovendo a biorremediação do ambiente.

3.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS

A classificação de bactérias apresentou diversas abordagens ao longo dos anos, tendo seu início no século XIX, durante o qual estes procariotos eram separados em grupos com base em sua morfologia, tamanho e motilidade (Janda e Abbot, 2002). No início do século XX surgiu o ágar o que possibilitou a classificação por meio de testes bioquímicos. Em 1957, com a introdução dos computadores foi possível à aplicação da taxonomia numérica que consiste em classificar os organismos pela quantidade de características bioquímicas e morfológicas em comum (Janda e Abbot, 2002). Com esta técnica, houve um aprimoramento na identificação fenotípica de bactérias, porém não fornecia informações acerca das relações filogenéticas entre os procariotos (Schleifer, 2009).

Somente na década de 80 surgiu um padrão de identificação que estabelecia relação filogenética entre os seres vivos (Clarridge, 2004). Woese e seus colaboradores demonstraram que o uso de regiões conservadas do código genético poderia ser empregado para estabelecer relações filogenéticas entre os seres vivos, tanto de procariotos quanto eucariotos (Woese *et al.*, 1985; Woese, 1987; Clarridge, 2004).

Woese *et al.* (1985) foram os primeiros a relacionar filogeneticamente bactérias com base nas regiões de DNA ribossomal 5S, 16S e 23S. Em relação a estas regiões, a 16S é a mais utilizada atualmente, pois o gene 5S, por conter 120 nucleotídeos, não é considerado eficiente para inferências filogenéticas enquanto que o 23S, além de muito longo (2900 nucleotídeos), não possui iniciadores de amplo espectro bem estabelecido (universais) (Hunt *et al.* 2006; Pei *et al.*, 2009). Logo, a preferência pelo 16S se deve por este possuir tamanho longo suficiente para obter boa resolução filogenética (aproximadamente 1550 pares de base), estar presente em todas as bactérias e por possuir regiões conservadas, que permitiram o

desenho de iniciadores universais, e outras regiões variáveis, as quais permitem comparações taxonômicas (Clarridge, 2004; Janda e Abbot, 2007; Schleifer, 2009).

Além de estabelecer relações filogenéticas, o 16S rRNA é utilizado para discriminar procariotos em gênero e até mesmo espécie (Bavykin *et al.*, 2008). Porém, esta região não é sensível o bastante para distinguir entre sequências com similaridades acima de 97% e não diferencia sequências de bactérias que existem como genomovares. (Brenner *et al.*, 2005; Mignard e Flandrois, 2006; Janda e Abbot, 2007).

Para estas cepas com sequências muito próximas e genomovares é indicada a análise polifásica, a qual propõe a análise de dados fenotípicos (testes bioquímicos), quimiotaxonômicos (composição de ácidos graxos), genotípicos (DNA *fingerprint*) e filogenéticos (16S-23S rRNA), integrando os resultados e acordando seu dados em uma classificação com o mínimo de contradições (Vandamme *et al.*, 1996; Schleifer, 2009). Porém, segundo Gevers *et al.* (2006), esta técnica não é bem aceita pelos pesquisadores. Por ser muito laboriosa, levaria muito tempo para descrever, nomear e organizar a grande diversidade de microrganismos em um sistema de classificação satisfatório, além de possuir alto custo de execução e exigir equipamentos sofisticados (Gevers *et al.*, 2006; Djelouadji *et al.*, 2008; Harmsen e Karch).

Por isso, muitos pesquisadores optam por classificar os microrganismos somente utilizando o 16S rRNA por ser este método rápido e menos laborioso (Gevers *et al.*, 2006).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE COLETA DE SOLO RIZOSFÉRICO

As coletas de solo rizosférico foram realizadas no entorno das antigas instalações da empresa Plumbum Mineradora (antiga COBRAC), localizada no município de Santo Amaro, Bahia (Fig. 04 e 05), nos seguintes pontos de GPS: S1232.267 / W38 43.787, S1232.234 / W38 43.883, S1232.246 / W3843.972 e S1232.207 / W38 43.813.

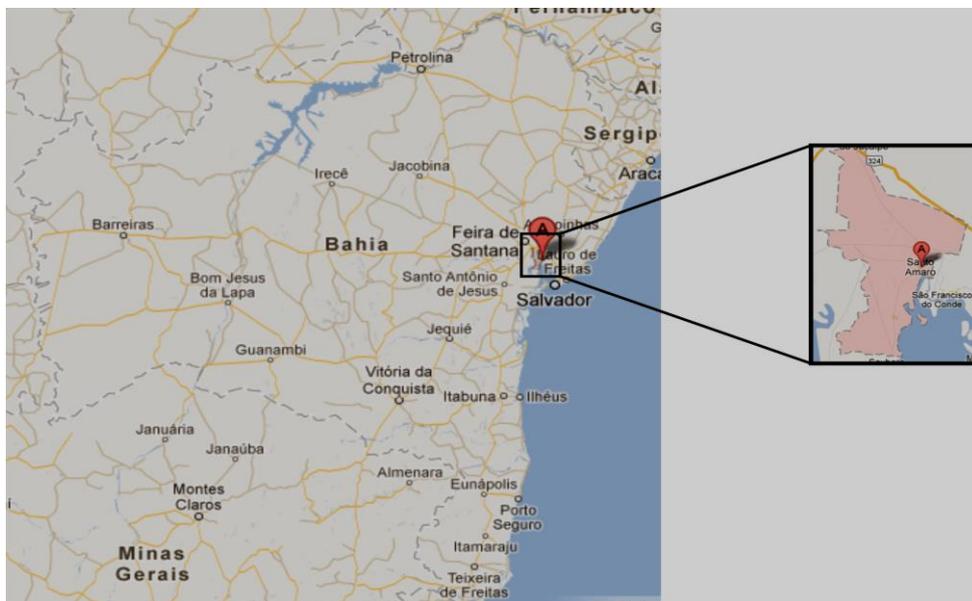


Figura 04: Localização do município de Santo Amaro - BA. Fonte: Google Map.



Figura 05: Entorno das antigas instalações da Plumbum Mineradora e pontos de coleta. **A.** Entorno das antigas instalações; **B.** Antiga linha de trem; **C e D.** Pontos de coleta. Fotos: Adriana Fidelis.

4.2 ANÁLISE QUÍMICA E FÍSICA DO SOLO DE SANTO AMARO

A coleta de solo para as análises física e química foram feitas de acordo com normas do CETESB, modificadas. A área em estudo foi subdividida de modo aleatório estratificado, tomando como referência a chaminé das antigas instalações da fábrica. Dez locais foram selecionados de modo aleatório e de cada um foi retirado 3Kg de solo, numa profundidade de 0–40cm.

Em laboratório, os 30Kg de solo foram homogeneizados e desta mistura retirou-se 500g de solo, o qual foi enviado ao Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas e ao Laboratório de Física do Solo, ambos localizados na Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA (EMBRAPA, 1999).

4.3 COLETA DE PLANTAS

As coletas de plantas foram realizadas pelo botânico Dr. José Floriano B. Pastore da Universidade Estadual de Feira de Santana. A coleta e herborização dos espécimes seguiram a metodologia e sugestões de Walter e Cavalcanti (2005). Quanto aos materiais testemunhos (*vouchers*), estes foram depositados no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), Bahia. As plantas coletadas foram identificadas por comparação com os espécimes previamente identificados pelos especialistas no herbário da HUEFS (Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana) e sempre que necessário uma duplicata foi enviada aos botânicos especialistas para confirmar a identificação prévia.

A lista de plantas coletadas se encontra na Tabela 01, seguidos do número de identificação no herbário da UEFS (acesso pelo site: http://herbario.uefs.br/index.php?option=com_content&view=article&id=16&Itemid=12&lang=pt), número do *voucher*, família da planta coletada, seu gênero ou espécie e autor que descreveu a planta.

Tabela 01: Plantas coletadas no entorno das antigas instalações da fábrica Plumbum. *Não identificada por especialista.

Nº HUEFS	Nº <i>voucher</i>	Família	Gênero / Espécie	Autor
184469	JFP3273	Lamiaceae	<i>Ocimum selloi</i>	Benth.
184471	JFP3275	Convolvulaceae	<i>Ipomoea asarifolia</i>	Roem. & Schult.
184472	JFP3276	Leguminosae	<i>Mimosa pigra</i>	L.
184473	JFP3277	Leguminosae	<i>Indigofera spicata</i>	Forssk.
184478	JFP3282	Acanthaceae	<i>Justicia</i> sp.	-
184641	JFP3707	Rubiaceae	<i>Borreria</i> sp.	-
184648	JFP3714	Lythraceae	<i>Cuphea</i> sp.	-
184652	JFP3718	Asteraceae	*	-
184656	JFP3722	Acanthaceae	<i>Ruellia</i> sp.	-
184660	JFP3726	Malvaceae	<i>Sida</i> sp.	-
184661	JFP3727	Scrophulariaceae	*	-
184664	JFP3730	Campanulaceae	<i>Lobelia</i> sp.	-

184665	JFP3731	Onagraceae	<i>Ludwigia</i> sp.	-
184667	JFP3733	Lamiaceae	<i>Mesosphaerum pectinata</i>	(L.) Kuntze
184668	JFP3734	Piperaceae	<i>Peperomia pellucida</i>	(L.) Kunth
184669	JFP3735	Scrophulariaceae	*	-
184670	JFP3736	Asteraceae	*	-
184670	JFP3736	Asteraceae	*	-
184671	JFP3737	Euphorbiaceae	<i>Croton</i> sp.	-
184672	JFP3738	Lamiaceae	<i>Hyptis</i> sp.	-
184673	JFP3739	Boraginaceae	<i>Heliotropium</i> sp.	-
184674	JFP3740	Campanulaceae	*	-
184675	JFP3741	Asteraceae	*	-
-	Sem voucher	Convolvulaceae	*	-
-	Sem voucher	Euphorbiaceae	<i>Ricinus comunis</i>	L.
-	Sem voucher	Leguminosae	<i>Erythrina velutina</i>	Willd.
-	Sem voucher	Lamiaceae	<i>Leonotis nepetifolia</i>	(L.) R.Br.
-	Sem voucher	Moraceae	<i>Cecropia pachystachya</i>	Trécul
-	Sem voucher	Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	L.
-	Sem voucher	Poaceae	-	-
-	Sem voucher	Rubiaceae	-	-
-	Sem voucher	Verbenaceae	<i>Stachytarpheta</i> sp.	-

4.4 COLETA, ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS

As amostras de solo rizosférico foram coletadas, segundo Roque e Melo (2000), modificado. Com auxílio de um trado manual, as raízes das plantas da Tabela 01 foram

acondicionadas em frascos de vidro previamente esterilizados, os quais foram mantidos em isopor a temperatura entre 10^o–15^oC para serem transportados ao laboratório.

Quando em laboratório, o solo aderido às raízes das plantas coletadas foi fragmentado manualmente de maneira asséptica. Em seguida, foi retirado 5g de cada ponto amostral e adicionados em Erlenmeyer contendo 45mL de solução salina a concentração de 0,45% (Roque e Melo, 2000). As amostras foram incubadas em agitador orbital a 150rpm a 28^oC durante 48h. Após este procedimento, foram realizadas diluições seriadas com água estéril de 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵, retirando-se alíquotas de 1mL das duas últimas diluições, as quais foram semeadas, em triplicata, em placas de Petri contendo ágar BHI (*Brain Heart Infusion* ágar). As diversas colônias que cresceram nesse meio de cultura após 24–72 horas foram inoculadas, separadamente, em placas contendo o mesmo meio, até obtenção de colônias puras.

As linhagens, então, isoladas foram preservadas em *ultra-freezers* a -80^oC em solução contendo 800 μ L de BHI e 200 μ L de glicerol 100% (Moriwaki *et al.*, 2009).

4.5 IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

4.5.1 Extração e purificação de DNA

A extração e obtenção do DNA foram feitas de acordo com a metodologia Doyle e Doyle (1990), com modificações.

Colônias puras, crescidas em meio BHI agar (*Brain Heart Infusion* agar) por 24h/48h, foram inoculadas em microtubos contendo 1mL de BHI caldo. Após 48h a 28^oC, as colônias foram centrifugadas a 13rpm por 15 minutos. Retirado o sobrenadante, adicionou-se ao precipitado 200 μ L de Tampão cloreto de sódio – Tris – EDTA (*STE buffer*), centrifugando novamente a 13rpm por 15 minutos.

Retirado o sobrenadante, foi acrescentado ao precipitado 150 μ L de detergente brometo de cetiltrimetilamônia (CTAB) e deixado em banho-maria a 60^oC por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se ao microtubo 150 μ L de solução clorofórmio-alcool isoamílico (1:24), deixando-o no agitador (*shaker*) a 60rpm. Passados 15 minutos, centrifugou-se a solução a 13rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi passado para microtubo estéril e foi acrescido a este 400 μ L de isopropanol gelado de concentração 100% a fim de precipitar o DNA.

A seguir, as amostras foram colocadas no *freezer* por 24 horas. Retiradas do *freezer* foram, então, centrifugadas por 15 minutos para precipitação e formação do *pellet*. Retirado

sobrenadante, o *pellet* foi lavado duas vezes com 150 μ L de etanol 70% não gelado e centrifugado por 5 minutos a 13rpm.

Depois de retirado sobrenadante, o *pellet* foi secado em estufa por 10 minutos e o DNA foi suspenso em 20 μ L de Tampão TE.

4.5.2 Amplificação e sequenciamento

A região 16S do DNA bacteriano foi amplificado por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando os pares dos iniciadores (*primers*) universais, segundo Youssef *et al.* (2009), F27 (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') e R1492 (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT - 3'); F27 (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') e R805 (5' - GACTACCAGFFTATCTAATC - 3') e F785 (5' - GGATTAGATACCCTGGTA - 3') e R1492 (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT - 3') e kit Master Mix Top Taq (QIAGEN) (Fig. 06).

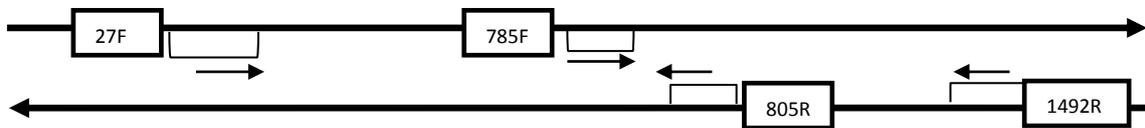


Figura 06: Fitas de DNA com primers universais anelados.

A reação de amplificação foi realizada usando 5 μ L de Top Taq (QIAGEN), 5-10 μ g de DNA total, 2.25 μ mol de iniciador (primer), sendo o volume da reação ajustado para 10 μ L com H₂O ultrapura. A amplificação foi feita usando *hot-start* e os parâmetros para amplificar os fragmentos de DNAr nas comunidades bacterianas deste trabalho foram: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min, e extensão a 72 °C por 2 min. A extensão final ocorreu a 72°C por 7 min.

O produto do PCR foi quantificado, precipitado com solução Polietileno Glicol (PEG) – 6000 macrogol e ao final o DNA foi suspenso em água ultrapura para concentração estimada de 100 μ g/mL. Quantificado o DNA, este foi submetido à reação de sequenciamento em um volume final de 9,3 μ L. Ao final desta reação, o DNA foi precipitado com isopropanol em concentração de 80%, limpo com etanol concentrado a 70% e colocado em estufa para secar.

Depois de secas, as amostras foram suspensas em formamida e sequenciadas. A reação de sequenciamento foi feita usando o conjunto de reagentes do BigDye Terminator (v.3.1; Applied Biosystems), ajustados para um volume final de 10 µL. Os produtos da reação de sequenciamento foram, então, analisados em um sequenciador modelo ABI3730XL (Applied Biosystem/Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, U.S.A.) seguindo as instruções do fabricante. As sequências originais foram emparelhadas, para formar sequências únicas, e editadas na plataforma Geneious (Drummond *et al.*, 2012).

4.5.3 Métodos computacionais

4.5.3.1 ANÁLISE COMPARATIVA DE SEQUÊNCIAS (BLAST)

As sequências ajustadas no Geneious foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov>) através do algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997), a fim de comparar as sequências das amostras deste trabalho com as depositadas no GenBank (GB).

4.5.3.2 Análise de distância

A análise de distância foi feita com base na região 16S rRNA, utilizando o programa Geneious. Cada sequência obtida neste trabalho foi alinhada às sequências semelhantes do GB (selecionadas pela busca no BLAST), em um alinhamento múltiplo, o qual foi gerado automaticamente pelo Geneious e ajustado manualmente quando necessário. Em seguida, foi gerada a árvore pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei.

4.5.3.3 Análise de parcimônia

A análise de parcimônia foi conduzida pelo programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2000) no qual foram feitas buscas heurísticas gerando árvores mais parcimoniosas. As buscas heurísticas foram feitas com 10 replicações e em cada uma dessas foram salvas 10 árvores e é apresentado o consenso estrito de todas as árvores encontradas em cada uma dessas análises.

4.5.4 Método de identificação das bactérias a partir do 16S

Foi necessário padronizar uma metodologia a fim de identificar bactérias pelo 16S. Desta forma tem-se:

4.5.4.1 Associação Direta Monofilética

Neste tipo de Associação a amostra se agrupa com uma única espécie obtida do GB, a qual é monofilética, ou seja, seus indivíduos não ocorrem em nenhum outro lugar da árvore (fig. 07). Desta forma, é assumido que a amostra pertence à espécie com a qual ela se relaciona na análise.

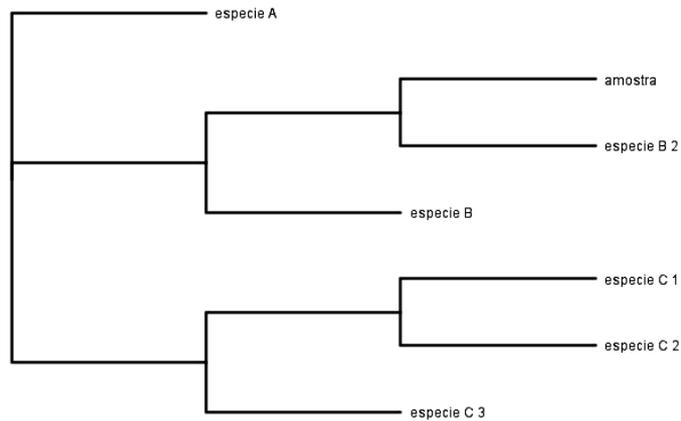


Figura 07: Simulação de uma Associação Direta Monofilética. A amostra se agrupa com uma única espécie obtida do GB, espécie B, a qual é monofilética.

4.5.4.2 Associação Indireta Monofilética

Na Associação Indireta Monofilética (fig. 08), a amostra é grupo-irmão do clado que inclui apenas uma espécie. Desta forma assume-se que ou a amostra pertence à espécie com a qual é grupo-irmão ou é uma espécie próxima ainda não descrita. Por isso optamos por usar o termo em latim “aff.” (= similar a), já consagrado na taxonomia.

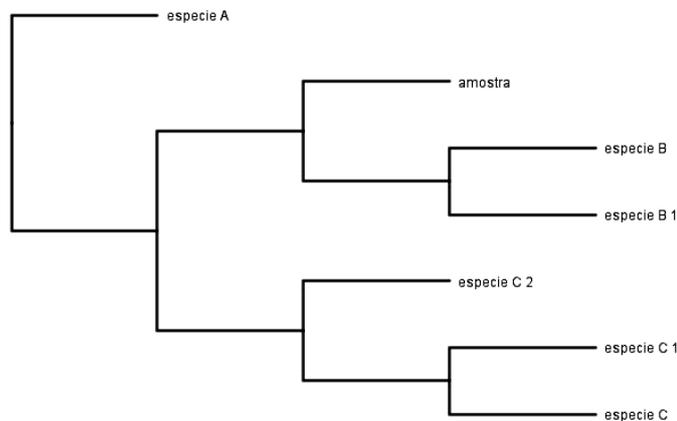


Figura 08: Simulação de uma Associação Indireta Monofilética. A amostra é grupo-irmão do clado que inclui apenas uma espécie (B).

4.5.4.3 Associação Direta de Grupo

Na Associação Direta de Grupo (fig. 09), a amostra se agrupa a espécies distintas obtidas do GB as quais são monofiléticas, não ocorrendo em outro lugar da árvore. Essa Associação é caracterizada pela resolução insuficiente do 16S para separar as espécies. Desta forma é dado um nome ao grupo, o qual é atribuído também à amostra.

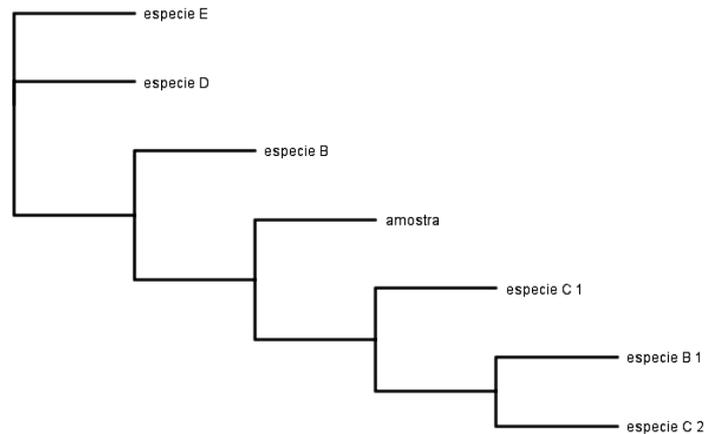


Figura 09: Simulação de uma Associação Direta de Grupo. A amostra se agrupa a espécies distintas (B e C) obtidas do GB as quais são monofiléticas.

4.5.4.4 Associação Direta Parafilética

Na Associação Direta Parafilética (fig. 10), a amostra se agrupa a uma única espécie obtida do GB em um clado monofilético. Entretanto, na análise feita com a região 16S, esta espécie surge como parafilética, associando-se a um outro grupo de espécie obtidas do GB (fig. 10).

Apesar da amostra estar associada diretamente ao clado, as espécies com que ela se associa não é recuperada como monofilética. Desta forma assume-se que ou a delimitação da espécie não é monofilética ou há problemas de identificação das amostras que foram depositadas no GB. Desta forma, para se denominar a amostra, optou-se pelo termo em latim “cf.” (= comparado a), já consagrado na taxonomia.

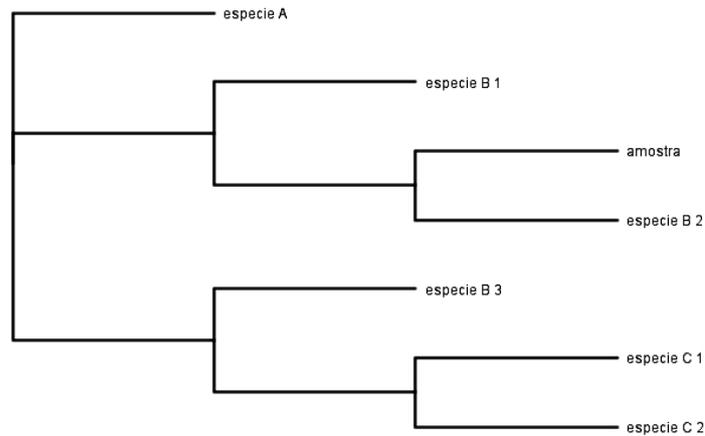


Fig. 10: Simulação de uma Associação Direta Parafilética. A amostra se agrupa a uma única espécie (B) obtida do GB em um clado monofilético. Entretanto, na análise feita com a região 16S esta espécie do GB surge como parafilética, associando-se a um outro grupo de espécie (C) também obtidas do GB.

4.5.4.5 Posição Isolada

A Posição Isolada (fig. 11) é caracterizada quando a amostra aparece como grupo-irmão de espécies que surgem como monofiléticas e com boa resolução na análise. Desta forma, a amostra não está associada claramente a nenhuma espécie incluída na análise. As amostras encontradas em Posição Isolada são consideradas potencialmente espécies ainda não descritas.

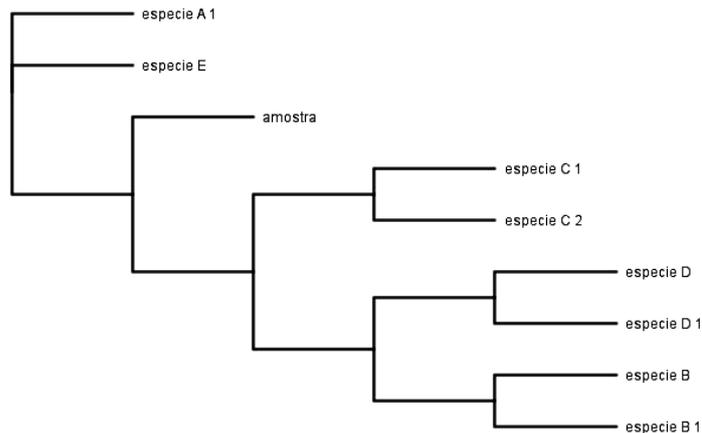


Figura 11: Simulação de uma Posição Isolada. A amostra aparece como grupo-irmão de espécies que surgem como monofiléticas (C, D e B)

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE METAIS PESADOS

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cada isolado foi determinado de acordo com a metodologia Malik e Jaiswal (2000).

Para este teste foi utilizado os sais $PbCl_2$ e $CdSO_4$, diluídos em ágar nutriente para se obter concentrações de 3.2, 6, 12, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1050, 1400, 1600 e 3200 $\mu\text{g/mL}$. Este, após solidificado, foi inoculado com isolados de bactérias obtidos em ágar nutriente sem metal (controle negativo). Em seguida, as placas foram incubadas a 28°C por 24 ou 120 horas.

A concentração mínima do metal que inibiu a multiplicação do isolado bacteriano em 24h foi considerada o CIM do experimento. Isolados bacterianos que não cresceram nas primeiras 24 horas foram acompanhados por mais 120 horas como dados adicionais deste experimento.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO SOLO DE SANTO AMARO

O solo da área amostrada de Santo Amaro é classificado quanto a sua textura como ‘muito argiloso’, como pode ser verificado na figura A, na qual observa-se que 67% do solo é constituído por argila. Além disso, tem um pH levemente alcalino (pH 7,7) e apresenta elevada quantidade de matéria orgânica (fig. B)

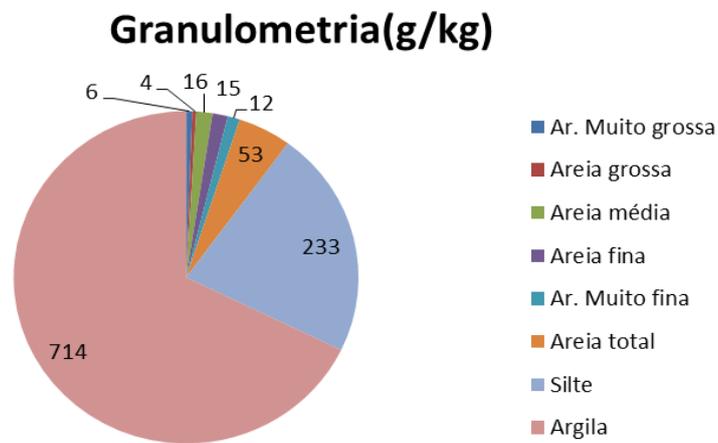


Figura A: Caracterização física do solo.

Características	Valor
pH em água	7,7
pH em CaCl₂	7,2
P	19
K (cmolc/dm³)	0,62
Ca (cmolc/dm³)	25,50
Mg (cmolc/dm³)	16,80
Ca+Mg (cmolc/dm³)	42,10
Al (cmolc/dm³)	0,0
Na (cmolc/dm³)	0,61
H+Al (cmolc/dm³)	0,00
SB (cmolc/dm³)	43,32
CTC (cmolc/dm³)	43,32
Cu (mg/dm³)	3,79
Fe (mg/dm³)	136,17
Zn (mg/dm³)	9,82
Mn (mg/dm³)	128,92
MO (g/Kg)	39,01

Figura B: Resultado analítico quanto a fertilidade do solo.

5.2 VISÃO GERAL DE FAMÍLIAS E GÊNEROS ASSINALADOS

Neste trabalho foram isolados 154 microrganismos os quais se distribuíram entre as famílias e gêneros conforme a tabela 2, abaixo:

Tabela 02: Famílias e gêneros de bactérias identificados por meio do 16S rRNA e a quantidade isolada.
*Espécies distinguíveis pela análise do 16S rRNA.

Família	Gênero	Quantidade amostral	Quantidade de espécies*
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	3	2
	<i>Bacillus</i>	24	3
Bacillaceae	<i>Exiguobacterium</i>	1	1
	<i>Lysinibacillus</i>	13	4
Brucellaceae	<i>Pseudochrobactrum</i>	1	1
Comamonadaceae	<i>Comamonas</i>	1	1
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	10	5
	<i>Enterobacter</i>	27	17
	<i>Escherichia</i>	1	1
	<i>Klebsiella</i>	2	1
	<i>Pantoea</i>	4	2
	<i>Providencia</i>	5	3
	<i>Serratia</i>	28	8
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	2	1
Microbacteriaceae	<i>Leucobacter</i>	1	1
	<i>Microbacterium</i>	2	2
Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>	4	2

Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	7	2
Planococcaceae	<i>Kurthia</i>	2	1
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	7	5
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	1	1
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>	6	2
Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	2	1

5.3 BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS X GRAM NEGATIVAS

Os gráficos da fig. 12 representam as quantidades de espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas isoladas do solo de Santo Amaro. Observa-se que a quantidade de espécies Gram negativas é maior que as Gram positivas.

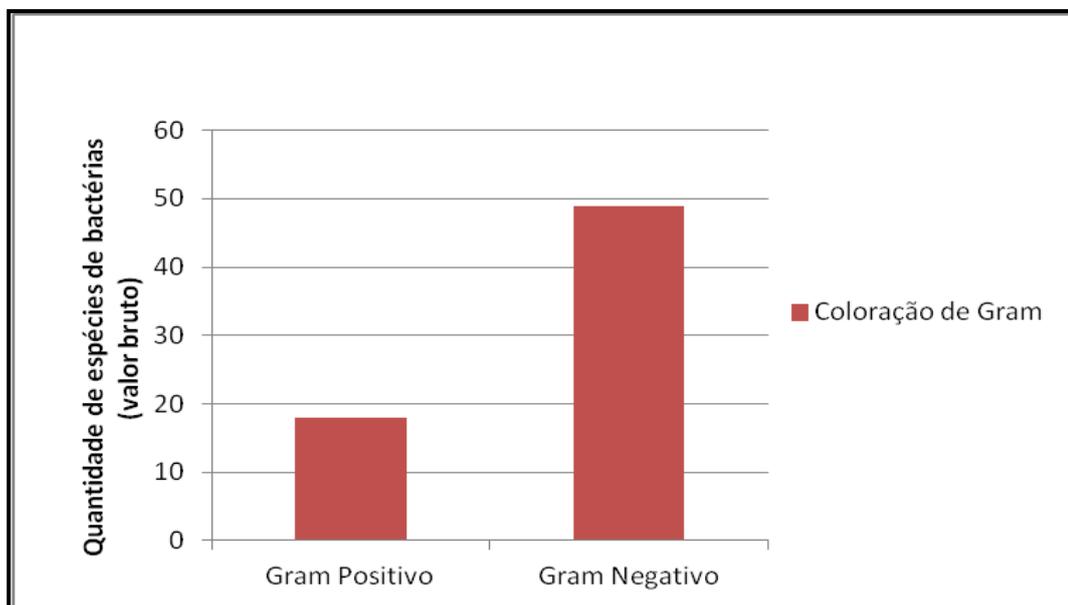


Figura 12: Quantidade de espécies Gram positivas e Gram negativas isoladas do solo de Santo Amaro.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS COM BASE NA ANÁLISE DO 16S rRNA

Os microrganismos isolados foram primeiramente identificados com o número de extração e após análises das árvores de distância e parcimônia, com base na região 16S rRNA, foi possível identificar até espécie ou somente em gênero (tabela 03).

Tabela 03: Nomes propostos para as bactérias isoladas com base no 16S rRNA e o tipo de associação que elas formam com as espécies obtidas do GB: Associação Direta Monofilética (A.D.M.); Associação Direta de Grupo (A.D.G.); Posição Isolada (P.I.) e Associação Direta Parafilética (A.D.P.). *Espécies cujo tipo de Associação não foi possível definir.

Família	Amostras (n. de extração)	Nome proposto	Figura	Tipo de Associação
Moraxellaceae	2086.09	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2086.09)	47 e 48	A.D.P.
Moraxellaceae	2070.05	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2070.05)	47 e 48	A.D.P.
Moraxellaceae	2070.02	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2070.02)	47 e 48	A.D.P.
Moraxellaceae	2118.01	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2118.01)	47 e 48	A.D.P.
Moraxellaceae	2114.11	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2114.11)	47 e 48	A.D.P.
Moraxellaceae	2246.01	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2246.01)	47 e 48	A.D.P.
Moraxellaceae	2114.15	<i>Acinetobacter</i> sp.1 (2114.15)	47 e 48	*
Bacillaceae	2086.10	<i>Bacillus nealsonii</i> (2086.10)	15 e 16	A.D.M.
Bacillaceae	2114.06	<i>Bacillus nealsonii</i> (2114.06)	15 e 16	A.D.M.
Bacillaceae	2070.10	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2070.10)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2070.20	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2070.20)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2085.02	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2085.02)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2070.01	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2070.01)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2070.08	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2070.08)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2085.06	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2085.06)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2086.04	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2086.04)	15 e 16	A.D.G.

Bacillaceae	2086.25	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2086.25)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2114.01	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2114.01)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2117.22	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2117.22)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2103.32	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2103.32)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2086.19	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2086.19)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2070.06	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2070.06)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2070.15	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2070.15)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2114.21	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2114.21)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2103.30	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2103.30)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2086.13	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2086.13)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2086.22	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2086.22)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2085.10	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2085.10)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2086.21	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2086.21)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2118.08	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2118.08)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2118.09	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2118.09)	15 e 16	A.D.G.
Bacillaceae	2085.01	<i>Exiguobacterium</i> <i>acetylicum-indicum</i> (2085.01)	17 e 18	A.D.G.
Bacillaceae	2117.13	<i>Lysinibacillus</i> <i>xylanilyticus</i> (2117.13)	19 e 20	A.D.M.
Bacillaceae	2117.24	<i>Lysinibacillus</i> <i>sphaericus</i> (2117.24)	19 e 20	A.D.M.
Bacillaceae	2117.20	<i>Lysinibacillus</i> <i>sphaericus</i> (2117.20)	19 e 20	A.D.M.
Bacillaceae	2117.21	<i>Lysinibacillus</i> <i>sphaericus</i> (2117.21)	19 e 20	A.D.M.
Bacillaceae	2085.12	<i>Lysinibacillus</i> <i>sphaericus</i> (2085.12)	19 e 20	A.D.M.
Bacillaceae	2118.12	<i>Lysinibacillus</i> <i>sphaericus</i> (2118.12)	19 e 20	A.D.M.
Bacillaceae	2118.10	<i>Lysinibacillus</i> <i>fusiformis</i> (2118.10)	19 e 20	A.D.M.
Bacillaceae	2085.11	<i>Lysinibacillus</i> <i>fusiformis</i> (2085.11)	19 e 20	A.D.M.
Bacillaceae	2086.18	<i>Lysinibacillus</i> <i>fusiformis</i> (2086.18)	19 e 20	A.D.M.
Bacillaceae	2114.09	<i>Lysinibacillus</i> <i>fusiformis</i> (2114.09)	19 e 20	A.D.M.
Bacillaceae	2120.02	<i>Lysinibacillus</i>	19 e 20	A.D.M.

		<i>fusiformis</i> (2120.02)		
Bacillaceae	2114.12	<i>Lysinibacillus macroides-boronitolerans</i> (2114.12)	19 e 20	A.D.G.
Bacillaceae	2114.13	<i>Lysinibacillus macroides-boronitolerans</i> (2114.13)	19 e 20	A.D.G.
Comamonadaceae	2117.16	<i>Comamonas testosteroni</i> (2117.16)	23 e 24	A.D.M.
Enterococcaceae	2085.05	<i>Enterococcus gallinarum-casseliflavus</i> (2085.05)	39 e 40	A.D.G.
Enterococcaceae	2085.09	<i>Enterococcus gallinarum-casseliflavus</i> (2085.09)	39 e 40	A.D.G.
Aeromonadaceae	2103.16	<i>Aeromonas</i> sp.1 (2103.16)	13 e 14	*
Aeromonadaceae	2086.31	<i>Aeromonas</i> sp.2 (2086.31)	13 e 14	*
Aeromonadaceae	2086.33	<i>Aeromonas</i> sp.2 (2086.33)	13 e 14	
Brucellaceae	2117.15	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum-asaccharolyticum</i> (2117.15)	21 e 22	A.D.G.
Enterobacteriaceae	2103.20	<i>Escherichia coli</i> (2103.20)	29 e 30	A.D.M.
Enterobacteriaceae	2085.15	<i>Klebsiella</i> cf. <i>variicola</i> (2085.15)	31 e 32	A.D.P.
Enterobacteriaceae	2086.20	<i>Klebsiella</i> cf. <i>variicola</i> (2086.20)	31 e 32	A.D.P.
Enterobacteriaceae	2086.27	<i>Citrobacter amalonaticus-farmeri</i> (2086.27)	25 e 26	A.D.G.
Enterobacteriaceae	2103.28	<i>Citrobacter</i> sp.2 (2103.28)	25 e 26	*
Enterobacteriaceae	2086.36	<i>Citrobacter</i> sp.3 (2086.36)	25 e 26	*
Enterobacteriaceae	2118.11	<i>Citrobacter</i> sp.3 (2118.11)	25 e 26	*
Enterobacteriaceae	2118.04	<i>Citrobacter</i> sp.3 (2118.04)	25 e 26	*
Enterobacteriaceae	2246.04	<i>Citrobacter</i> sp.4 (2246.04)	25 e 26	*
Enterobacteriaceae	2117.02	<i>Citrobacter</i> sp.4 (2117.02)	25 e 26	*
Enterobacteriaceae	2117.18	<i>Citrobacter</i> sp.4 (2117.18)	25 e 26	*
Enterobacteriaceae	2114.16	<i>Citrobacter</i> sp.4 (2114.16)	25 e 26	*
Enterobacteriaceae	2103.17	<i>Citrobacter</i> cf. <i>werkmanii</i> (2103.17)	25 e 26	A.D.P.
Enterobacteriaceae	2114.04	<i>Enterobacter</i> sp.1 (2114.04)	27 e 28	*

Enterobacteriaceae	2246.08	<i>Enterobacter</i> sp.2 (2246.08)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2246.02	<i>Enterobacter</i> sp.3 (2246.02)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2086.23	<i>Enterobacter</i> sp.3 (2086.23)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2114.14	<i>Enterobacter</i> sp.4 (2114.14)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2070.07	<i>Enterobacter</i> sp.5 (2070.07)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2085.08	<i>Enterobacter</i> sp.6 (2085.08)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2070.09	<i>Enterobacter</i> sp.7 (2070.09)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2086.01	<i>Enterobacter</i> sp.8 (2086.01)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2118.13	<i>Enterobacter</i> sp.9 (2118.13)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2246.07	<i>Enterobacter</i> sp.10 (2246.07)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2086.14	<i>Enterobacter</i> sp.10 (2086.14)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2103.23	<i>Enterobacter</i> sp.11 (2103.23)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2114.10	<i>Enterobacter</i> sp.12 (2114.10)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2114.08	<i>Enterobacter</i> cf. <i>cloacae</i> (2114.08)	27 e 28	A.D.P.
Enterobacteriaceae	2086.05	<i>Enterobacter</i> cf. <i>cloacae</i> (2086.05)	27 e 28	A.D.P.
Enterobacteriaceae	2114.05	<i>Enterobacter</i> cf. <i>cloacae</i> (2114.05)	27 e 28	A.D.P.
Enterobacteriaceae	2085.07	<i>Enterobacter</i> cf. <i>cloacae</i> (2085.07)	27 e 28	A.D.P.
Enterobacteriaceae	2086.28	<i>Enterobacter</i> cf. <i>cloacae</i> (2086.28)	27 e 28	A.D.P.
Enterobacteriaceae	2086.16	<i>Enterobacter</i> <i>cancerogenus</i> (2086.16)	27 e 28	A.D.M.
Enterobacteriaceae	2117.23	<i>Enterobacter</i> <i>hormaechi</i> (2117.23)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2086.11	<i>Enterobacter</i> <i>hormaechi</i> (2086.11)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2086.15	<i>Enterobacter</i> <i>hormaechi</i> (2086.15)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2086.26	<i>Enterobacter</i> <i>hormaechi</i> (2086.26)	27 e 28	*
Enterobacteriaceae	2120.04	<i>Enterobacter kobei</i> (2120.04)	27 e 28	A.D.M.
Enterobacteriaceae	2117.14	<i>Enterobacter</i> sp. nov.1 (2117.14)	27 e 28	P.I.
Enterobacteriaceae	2117.04	<i>Enterobacter</i> sp. nov.1 (2117.04)	27 e 28	P.I.
Enterobacteriaceae	2086.02	<i>Pantoea eucrina</i> (2086.02)	33 e 34	A.D.M.
Enterobacteriaceae	2086.08	<i>Pantoea eucrina</i>	33 e 34	A.D.M.

(2086.08)				
Enterobacteriaceae	2086.06	<i>Pantoea eucrina</i> (2086.06)	33 e 34	A.D.M.
Enterobacteriaceae	2086.03	<i>Pantoea cf.</i> <i>anthophila/agglomerans</i> (2086.03)	33 e 34	A.D.P.
Enterobacteriaceae	2117.03	<i>Providencia sp.1</i> (2117.03)	35 e 36	*
Enterobacteriaceae	2118.03	<i>Providencia sp.2</i> (2118.03)	35 e 36	*
Enterobacteriaceae	2103.29	<i>Providencia sp.2</i> (2103.29)	35 e 36	*
Enterobacteriaceae	2103.27	<i>Providencia sp.2</i> (2103.27)	35 e 36	*
Enterobacteriaceae	2118.07	<i>Providencia alcalifaciens-rustigianii</i> (2118.07)	35 e 36	*
Enterobacteriaceae	2086.30	<i>Serratia sp.1</i> (2086.30)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2103.15	<i>Serratia sp.1</i> (2103.15)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2246.05	<i>Serratia sp.1</i> (2246.05)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2117.07	<i>Serratia sp.2</i> (2117.07)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2114.24	<i>Serratia sp.2</i> (2114.24)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2103.19	<i>Serratia sp.3</i> (2103.19)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2117.11	<i>Serratia sp.3</i> 2117.11	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2114.22	<i>Serratia sp.4</i> (2114.22)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2117.09	<i>Serratia sp.5</i> (2117.09)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2070.03	<i>Serratia sp.6</i> (2070.03)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2070.16	<i>Serratia sp.6</i> (2070.16)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2070.19	<i>Serratia sp.6</i> (2070.19)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2086.07	<i>Serratia sp.6</i> (2086.07)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2117.12	<i>Serratia sp.7</i> (2117.12)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2085.13	<i>Serratia sp.7</i> (2085.13)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2103.24	<i>Serratia sp.7</i> (2103.24)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2086.34	<i>Serratia sp.7</i> (2086.34)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2086.29	<i>Serratia sp.7</i> (2086.29)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2114.19	<i>Serratia sp.7</i> (2114.19)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2103.22	<i>Serratia sp.7</i> (2103.22)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2086.35	<i>Serratia sp.7</i>	37 e 38	*

		(2086.35)		
Enterobacteriaceae	2086.32	<i>Serratia</i> sp.7 (2086.32)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2085.16	<i>Serratia</i> sp.7 (2085.16)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2103.21	<i>Serratia</i> sp.7 (2103.21)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2114.23	<i>Serratia</i> sp.7 (2114.23)	37 e 38	*
Enterobacteriaceae	2114.20	<i>Serratia</i> <i>nematodiphila</i> (2114.20)	37 e 38	A.D.M.
Enterobacteriaceae	2118.14	<i>Serratia</i> <i>nematodiphila</i> (2118.14)	37 e 38	A.D.M.
Enterobacteriaceae	2246.03	<i>Serratia</i> <i>nematodiphila</i> (2246.03)	37 e 38	A.D.M.
Microbacteriaceae	2114.07	<i>Leucobacter</i> aff. <i>Chromiireducens</i> (2117.04)	41 e 42	A.I.M.
Microbacteriaceae	2085.03	<i>Microbacterium</i> sp.1 (2085.03)	43 e 44	*
Microbacteriaceae	2086.17	<i>Microbacterium</i> sp.2 (2086.17)	43 e 44	*
Micrococcaceae	2070.11	<i>Arthrobacter</i> sp.1 (2070.11)	45 e 46	*
Micrococcaceae	2070.12	<i>Arthrobacter</i> sp.1 (2070.12)	45 e 46	*
Micrococcaceae	2070.04	<i>Arthrobacter</i> sp.1 (2070.04)	45 e 46	*
Micrococcaceae	2085.04	<i>Arthrobacter</i> sp.2 (2085.04)	45 e 46	*
Planococcaceae	2103.25	<i>Kurthia</i> sp. nov.1 (2103.25)	49 e 50	P.I.
Planococcaceae	2103.26	<i>Kurthia</i> sp. nov.1 2103.26	49 e 50	P.I.
Pseudomonadaceae	2114.03	<i>Pseudomonas</i> sp.1 (2114.03)	51 e 52	*
Pseudomonadaceae	2117.06	<i>Pseudomonas</i> sp.2 (2117.06)	51 e 52	*
Pseudomonadaceae	2114.18	<i>Pseudomonas</i> sp.2 (2114.18)	51 e 52	*
Pseudomonadaceae	2117.01	<i>Pseudomonas</i> sp.3 (2117.01)	51 e 52	*
Pseudomonadaceae	2117.10	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> (2117.10)	51 e 52	A.D.M.
Pseudomonadaceae	2114.17	<i>Pseudomonas</i> cf. <i>mosselii</i> (2114.17)	51 e 52	A.D.P.
Pseudomonadaceae	2117.19	<i>Pseudomonas</i> cf. <i>mosselii</i> (2117.19)	51 e 52	A.D.P.
Staphylococcaceae	2086.12	<i>Staphylococcus</i> <i>warnerii</i> (2086.12)	53 e 54	A.D.M.
Streptococcaceae	2086.43	<i>Lactococcus lactis</i> (2086.43)	55 e 56	A.D.M.**
Streptococcaceae	2086.41	<i>Lactococcus lactis</i> (2086.41)	55 e 56	A.D.M.**
Streptococcaceae	2086.38	<i>Lactococcus</i> <i>garvieae</i> (2086.38)	55 e 56	A.D.M.

Streptococcaceae	2086.39	<i>Lactococcus garvieae</i> (2086.39)	55 e 56	A.D.M.
Streptococcaceae	2086.37	<i>Lactococcus garvieae</i> (2086.37)	55 e 56	A.D.M.
Streptococcaceae	2086.42	<i>Lactococcus garvieae</i> (2086.42)	55 e 56	A.D.M.
Xanthomonadaceae	2117.08	<i>Stenotrophomonas</i> cf. <i>pavaniimaltophilia</i> (2117.08)	57 e 58	A.D.P.
Xanthomonadaceae	2103.18	<i>Stenotrophomonas</i> cf. <i>pavaniimaltophilia</i> (2103.18)	57 e 58	A.D.P.

Como pode ser visto na tabela 03, a maioria das bactérias obtidas neste trabalho, aproximadamente 20%, apresentaram-se em Associação Direta Monofilética com espécies do GB, sendo, portanto, classificadas especificamente. Dentre as amostras associadas a grupos infragenéricos, temos aquelas que foram posicionadas como ‘Associação Direta de Grupo’, as quais representaram 12% do total de amostras. Esse tipo de Associação indica uma resolução insuficiente da região 16S para espécies que possuem sequências muito próximas.

Por outro lado, 3% das amostras se apresentaram como grupo irmão de clados bem definidos, ou seja, em Posição Isolada na qual a região 16S somente define até gênero, já que para estes microrganismos, que consistem em espécies novas, é necessária realização de testes segundo o Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias para uma classificação específica. Quase 1% do total de bactérias cultivadas se integrou a espécies do GB em Associação Indireta Monofilética, na qual optamos pelo uso do termo *latim aff.* (= similar a), pois devido a sua posição nas árvores ele pode ser uma espécie nova, uma variação infraespecífica ou o 16S não fornece todos os dados necessários para a construção das relações filogenéticas entre as bactérias do gênero em questão. O último tipo de Associação, a Direta Parafilética reuniu 5% das bactérias. Neste presumimos que ou houve erro no GB, uma vez que pode ocorrer incoerências durante a edição das sequências por parte dos autores, ou a espécie é mal definida, necessitando, pois, de outros métodos além do 16S.

Por fim, a maioria das espécies identificadas neste trabalho, 53%, não se apresentaram em nenhum tipo de Associação, indicando que o marcador 16S não representa ferramenta suficiente na discriminação específica para bactérias destes grupos.

5.5 ANÁLISE MOLECULAR

5.5.1 *Aeromonadaceae* (Colwell *et al.* 1986)

A família *Aeromonadaceae* tem como gênero típico *Aeromonas* (Stanier 1943) (*List of Bacterial names with Standing in Nomenclature* – LBSN) e é composta por bacilos Gram negativos capazes de viver sob condições anaeróbias (Koneman *et al.*, 2008).

Neste trabalho foram encontradas bactérias do gênero *Aeromonas*, o qual é formado por 30 espécies e 12 subespécies, sendo *Aeromonas hydrophila* (Chester 1901) Stanier 1943 a sua espécie típica (LBSN). Seu hábitat natural mais comum é a água doce ou ambientes marinhos, porém também ocorre em solos e até em alimentos como carnes e leite (Koneman *et al.*, 2008).

Por meio das análises comparativas por métodos de distância (fig. 13) e parcimônia (fig. 14), observa-se que as amostras 2086.31, 2086.33 e 2103.16 pertencem ao gênero *Aeromonas* uma vez que constituem o clado formado exclusivamente por espécies de *Aeromonas* obtidas do GB. Contudo, os clados de ambas as árvores se apresentam colapsados e com baixa resolução, não sendo possível uma classificação específica das amostras apenas com base na sequência do 16S. Parte desta falta de resolução pode estar relacionada à paralogia presente ao longo do genoma do gênero *Aeromonas*.



Figura 13: Árvore de Distância do gênero *Aeromonas* com base na região 16S rRNA, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. As setas em vermelho indicam a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

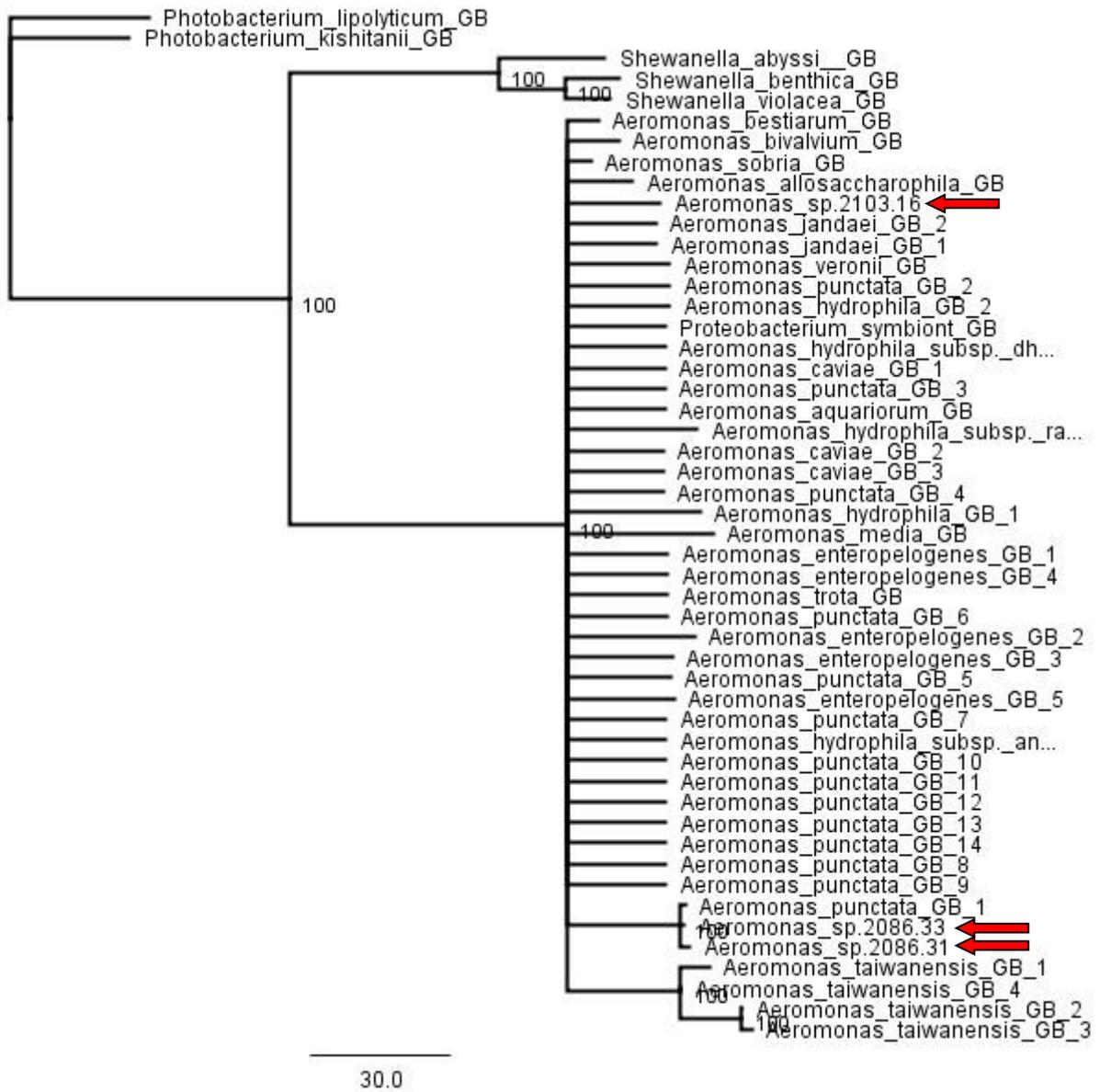


Figura 14: Consenso estrito das 100 árvores mais parcimoniosas do gênero *Aeromonas* obtidas pela busca heurística. A seta em vermelho indica a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.2 Bacillaceae (Fischer 1895)

A família Bacillaceae possui ca. 40 gêneros (LBSN), constituída por bactérias Gram positivas, aeróbias facultativas, capazes de formar esporos (Koneman *et al.*, 2008). O gênero típico *Bacillus* (Cohn 1872) é o mais representativo da família com ca. 263 espécies, sendo *B. subtilis* (Ehrenberg 1835) convencionado a espécie típica do gênero (LBSN). Neste trabalho, além de *Bacillus*, foram encontrados os gêneros *Exiguobacterium* (Collins *et al.* 1984) e *Lysinibacillus* (Ahmed *et al.* 2007).

5.5.2.1 *Bacillus*

Por meio das análises de distância (fig. 15) e parcimônia (fig. 16), as espécies *B. nealsonii* (Venkateswaran *et al.* 2003) obtidas no GB se agruparam às amostras 2086.10 e 2114.06 em Associação Direta Monofilética, formando um clado com elevado suporte.

Já nos cladogramas ‘grupo *Bacillus subtilis*’ e ‘grupo *Bacillus cereus*’ não é possível uma identificação específica baseada unicamente na análise da região 16S, uma vez que os Microrganismos se encontram em uma Associação Direta de Grupo (A.D.G.). No ‘grupo *Bacillus subtilis*’, por exemplo, aglomeram-se amostras 2070.01, 2070.08, 2070.10, 2070.20, 2085.02, 2085.06 e 2086.04 juntamente com diferentes espécies de *Bacillus*: *B. megaterium* (Bary 1884), *B. aryabattai* (Shivaji *et al.* 2009), *B. subtilis* (Cohn 1872) e *B. horikoshii* (Nielsen *et al.* 1995). Enquanto que o ‘grupo *Bacillus cereus*’ é formado pelas amostras 2070.06, 2070.15, 2085.10, 2086.13, 2086.19, 2086.21, 2086.22, 2086.25, 2103.30, 2103.32, 2114.01, 2114.21, 2117.22, 2118.08 e 2118.09 juntamente com as espécies (baixadas do GB): *B. weihenstephanensis* (Lechner *et al.* 1998), *B. mycoides* (Flügge 1886), *B. anthracis* (Cohn 1872), *B. cereus* (Frankland & Frankland 1887) e *B. thuringiensis* (Berliner 1915) (Fig. 15 e 16).

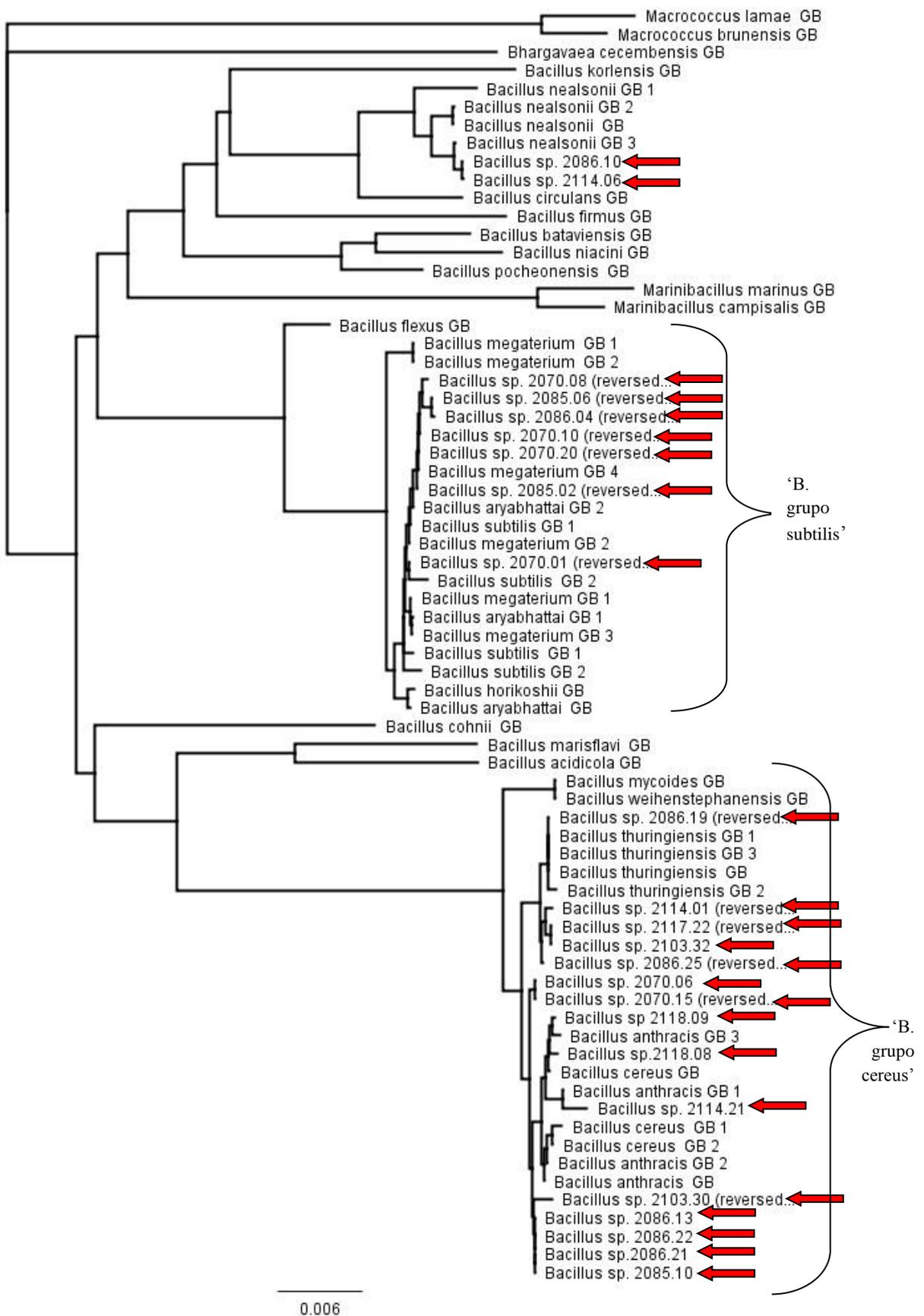


Figura 15: Árvore de distância do gênero *Bacillus*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. As setas em vermelho indicam a localização das amostras deste trabalho inseridas entre as baixadas do NCBI.

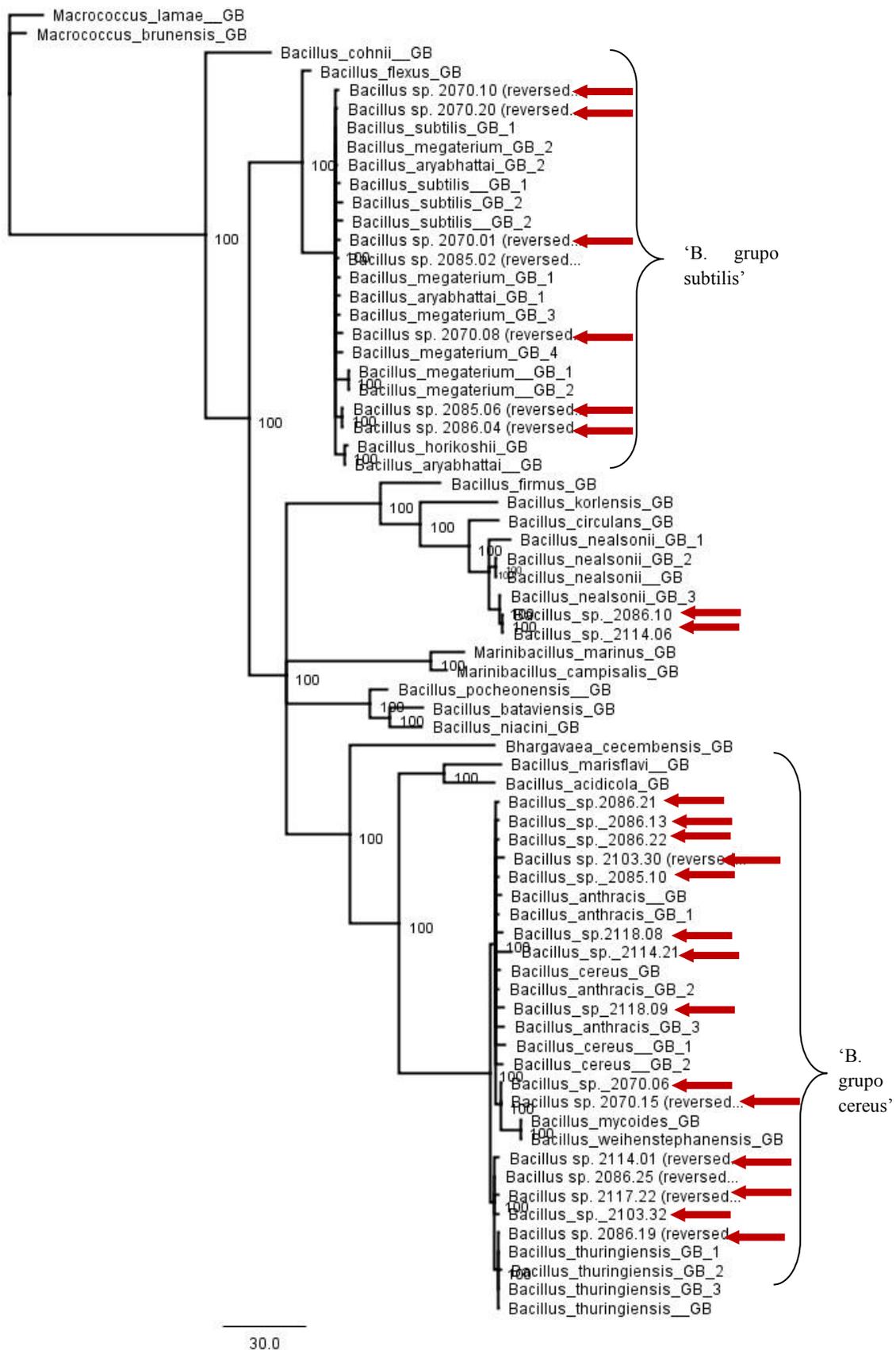


Figura 16: Consenso estrito das 50 árvores mais parcimoniosas do gênero *Bacillus* obtidas pela busca heurística. A seta em vermelho indica a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.2.2 *Exiguobacterium* (Collins *et al.* 1984)

O gênero *Exiguobacterium* possui ca. 14 espécies sendo *Exiguobacterium aurantiacum* (Collins *et al.* 1984) a espécie típica (LBSN). Suas espécies são caracterizadas por apresentarem bacilos curtos e irregulares, não formadores de esporos e anaeróbios facultativos (Chaturvedi e Shivaji, 2006).

Nas análises de distância (fig. 17) e parcimônia (fig. 18), a amostra 2085.01 pertence ao clado em que se encontram os organismos do GB *E. indicum* (Chaturvedi and Shivaji 2006) e *E. acetylicum* (Levine and Soppeland 1926), em uma Associação Direta de Grupo.

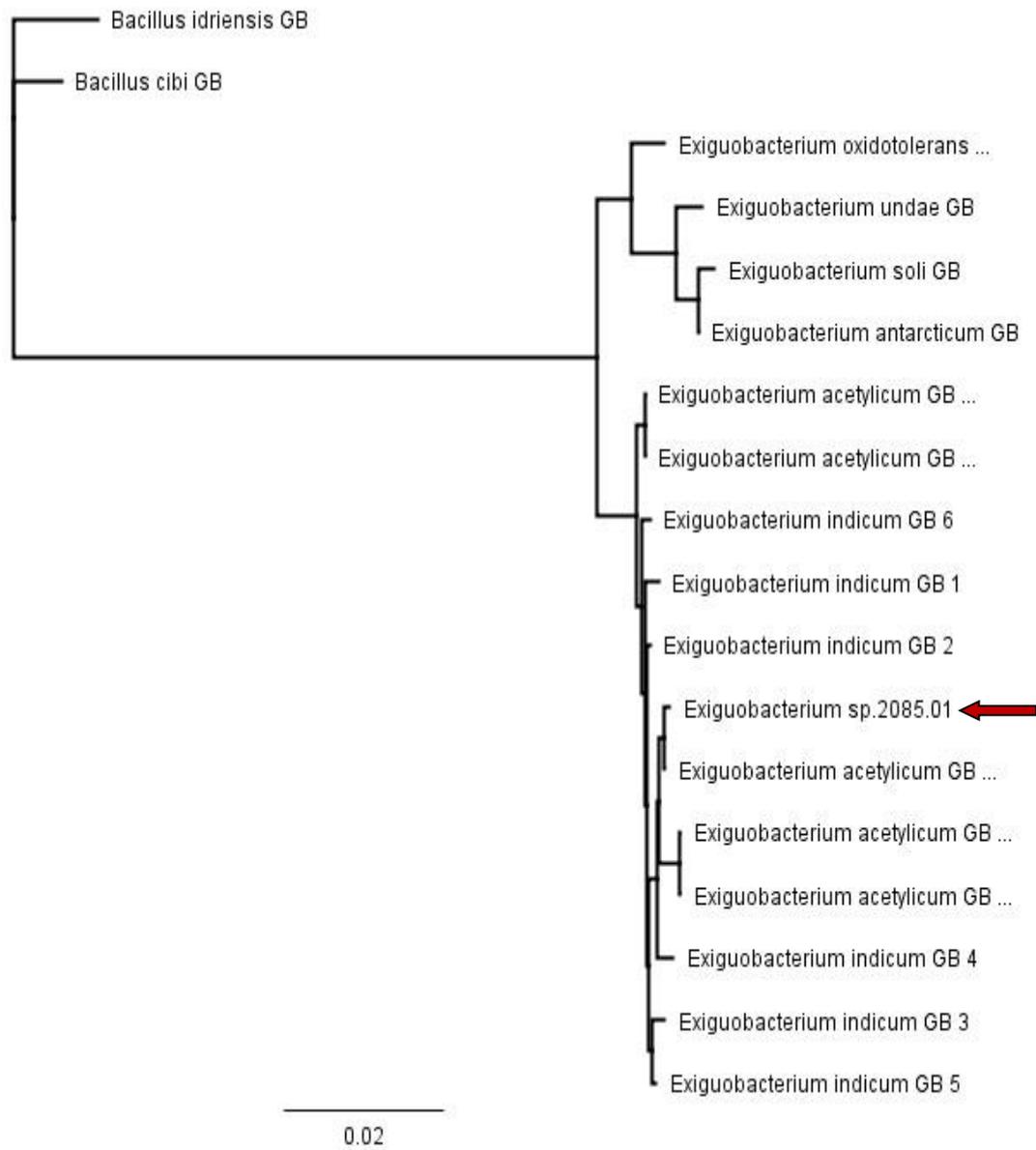


Figura 17: Árvore de distância do gênero *Exiguobacterium*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. A seta em vermelho indica a localização da amostra deste trabalho inserida entre as obtidas do NCBI.

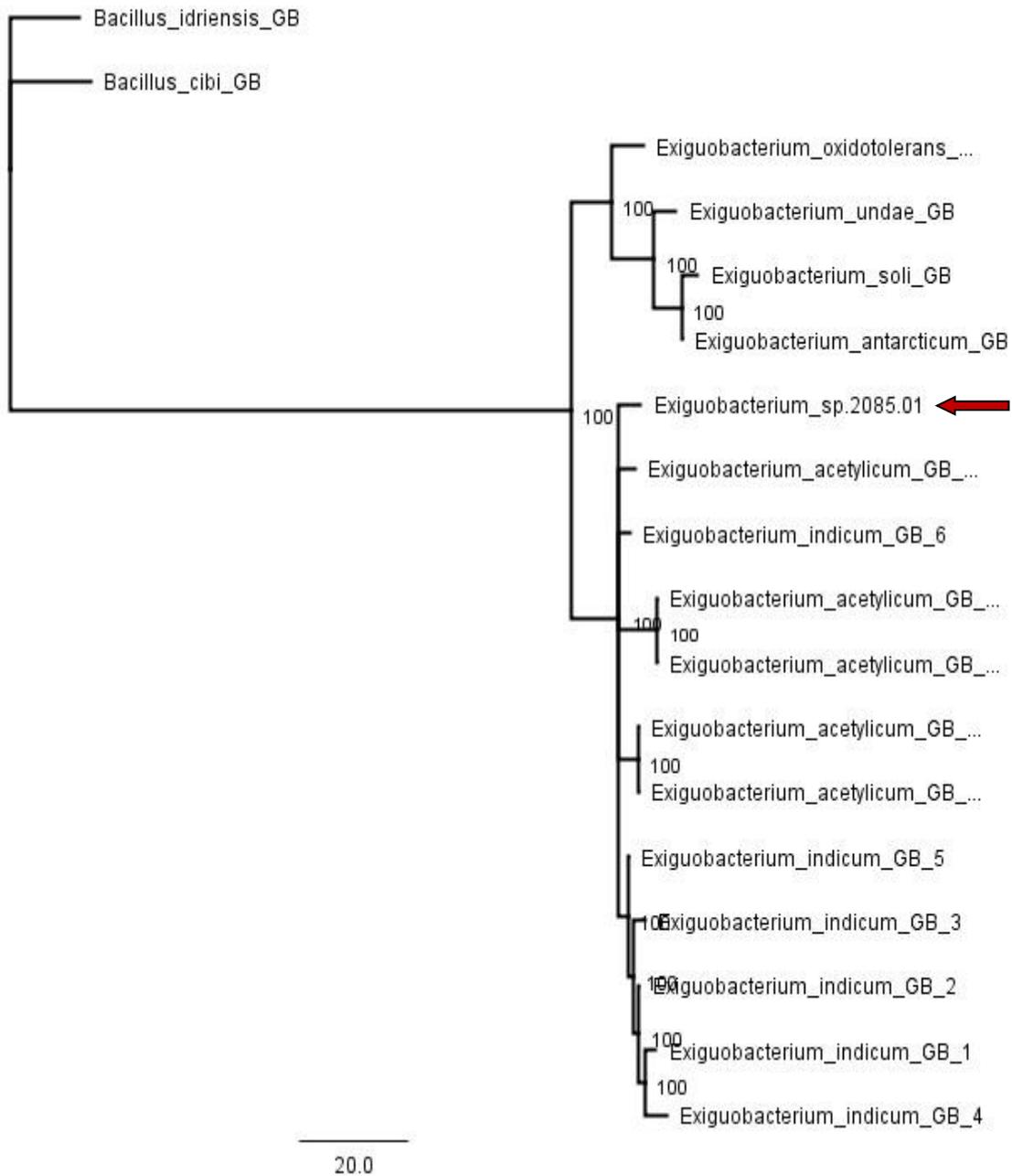


Figura 18: Consenso estrito das 29 árvores mais parcimoniosas do gênero *Exiguobacterium* obtidas pela busca heurística. A seta em vermelho indica a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.2.3 *Lysinibacillus* (Ahmed *et al.* 2007)

Lysinibacillus é formado por ca. 10 espécies, sendo o *Lysinibacillus boronitolerans* (Ahmed *et al.* 2007) a espécie típica (LBSN). Este gênero se caracteriza por apresentar organismos Gram positivos, móveis e com esporos (Koneman *et al.*, 2008).

Das 154 amostras isoladas neste trabalho, 13 foram indicadas como pertencentes ao gênero *Lysinibacillus* em ambas as análises (distância e parcimônia), com clados de elevado suporte. A maioria das espécies obtidas neste trabalho se apresentou em Associação Direta Monofilética com espécies obtidas do GB, como a amostra 2117.13 que está inserida no clado de *L. xylanilyticus* (Lee *et al.* 2010); 2085.12, 2117.20, 2117.21, 2117.24 e 2118.12 com *L. sphaericus* (Meyer and Neide 1904) Ahmed *et al.* 2007 e, por fim, 2085.11, 2086.18, 2114.09, 2118.10 e 2120.02 com espécies de *L. fusiformis* (Priest *et al.* 1989) Ahmed *et al.* 2007 (Fig. 19 e 20). Porém, somente as amostras 2114.12 e 2114.13 se agruparam em Associação Direta de Grupo com as espécies de *L. macroides* (*ex* Bennett and Canale-Parola 1965) Coorevits *et al.* 2012 e *L. boronitolerans* (Ahmed *et al.* 2007) obtidos do GB (Fig. 19 e 20).

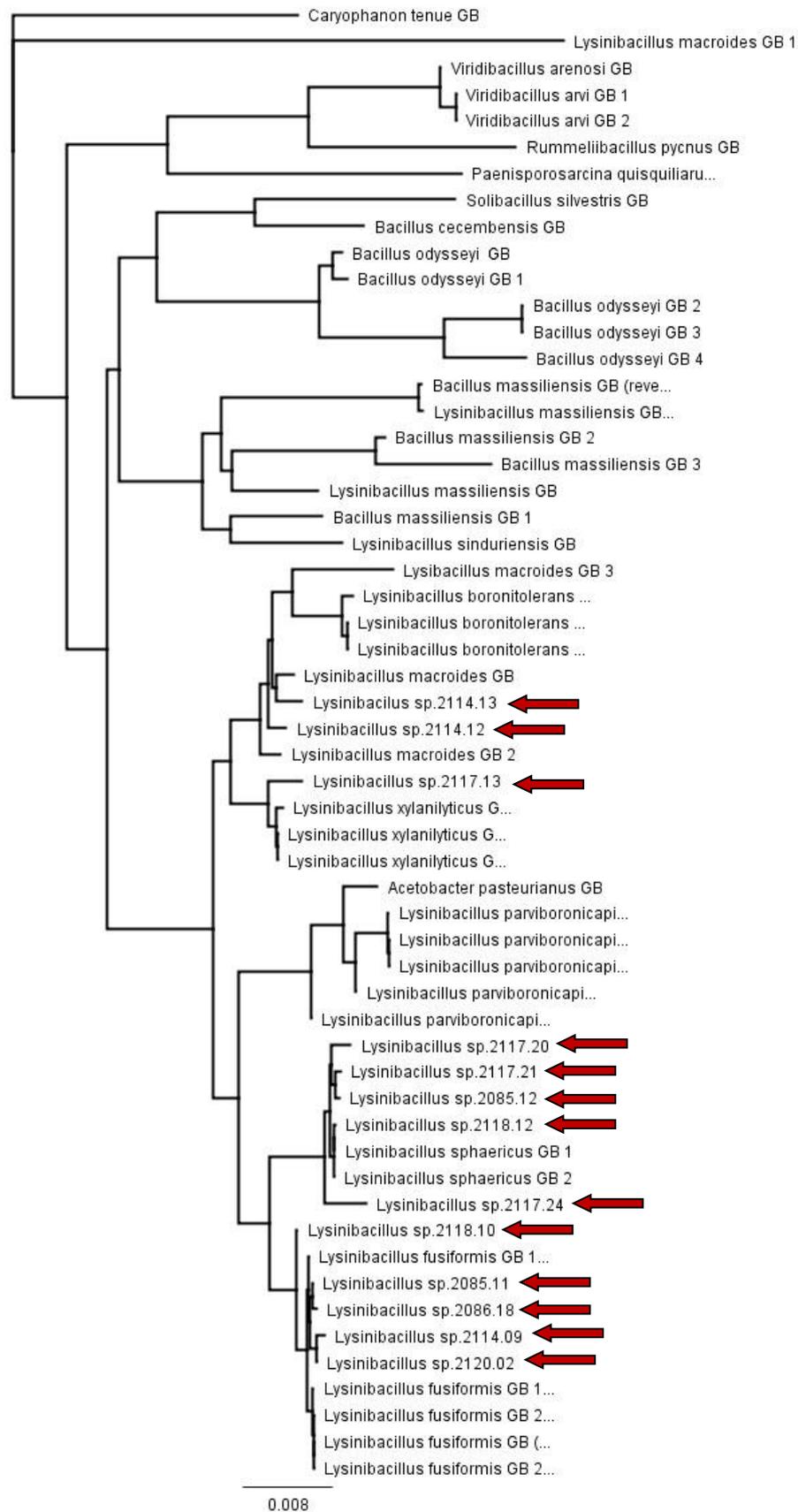


Figura 19: Árvore de distância do gênero *Lysinibacillus*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. A seta em vermelho indica a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

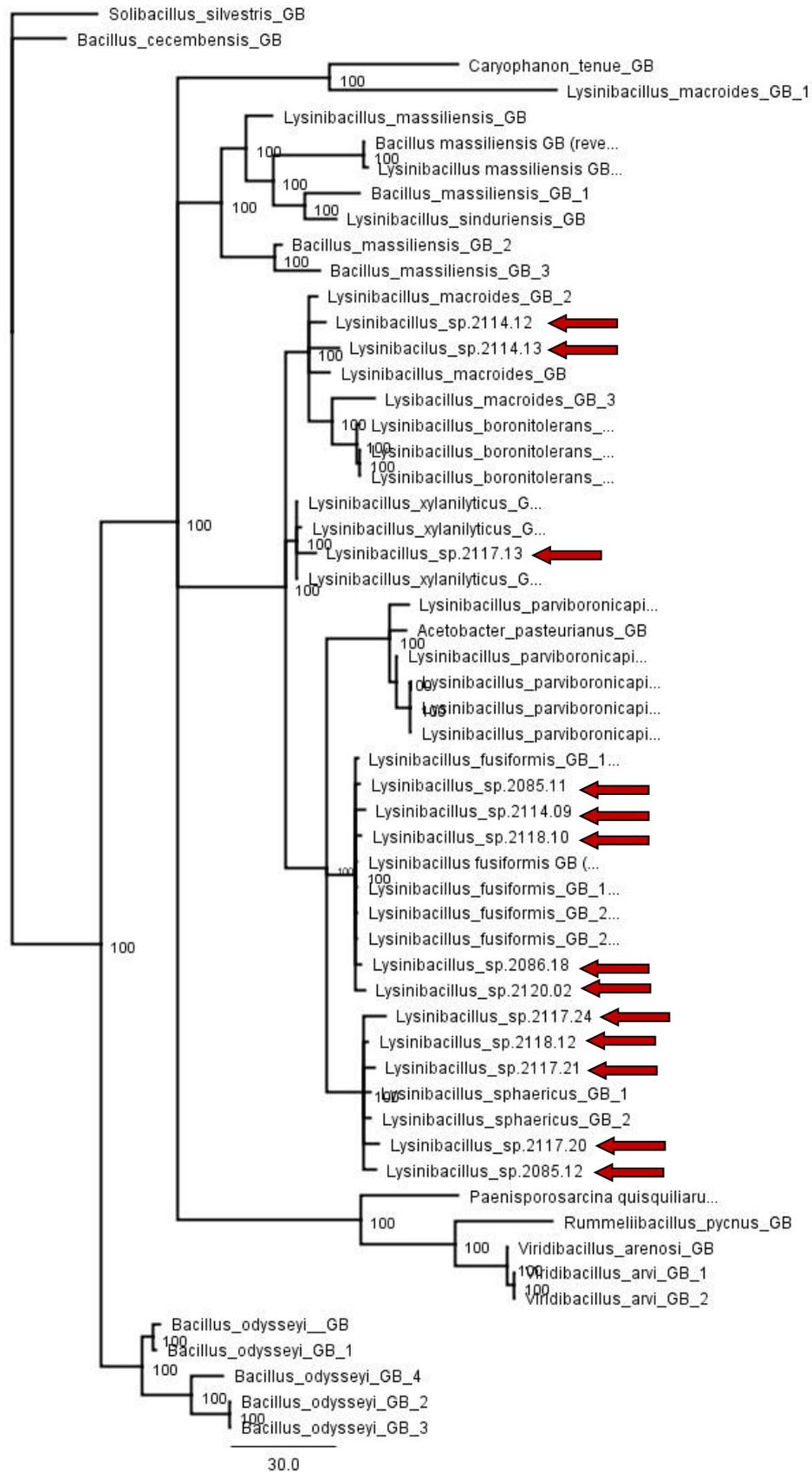


Figura 20: Consenso estrito das 80 árvores mais parcimoniosas do gênero *Lysinibacillus* obtidas pela busca heurística. A seta em vermelho indica a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.3 Brucellaceae (Breed *et al.* 1957)

A família Brucellaceae é composta por 7 gêneros, sendo *Brucella* (Meyer and Shaw 1920) o gênero típico (LBSN). É formado por microrganismos Gram negativos, patogênicos e, normalmente, encontrado em solo (Koneman *et al.*, 2008).

Das 154 amostras obtidas, apenas 1 foi sinalizada como pertencente a esta família, 2117.05, inserida no gênero *Pseudochrobactrum* (Kampfer *et al.* 2006), cujos Microrganismos são Gram-negativos, não formam esporos e não apresentam mobilidade (Kampfer *et al.*, 2006). Este gênero, recentemente descrito, possui 7 espécies, sendo *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* (Kämpfer *et al.* 2006) a espécie típica.

Nas árvores resultantes das análises de distância (fig. 21) e parcimônia (fig. 22), a amostra 2117.05 se apresenta em Associação Direta de Grupo com as espécies de *P. asaccharolyticum* e *P. saccharolyticum* obtidas do GB.

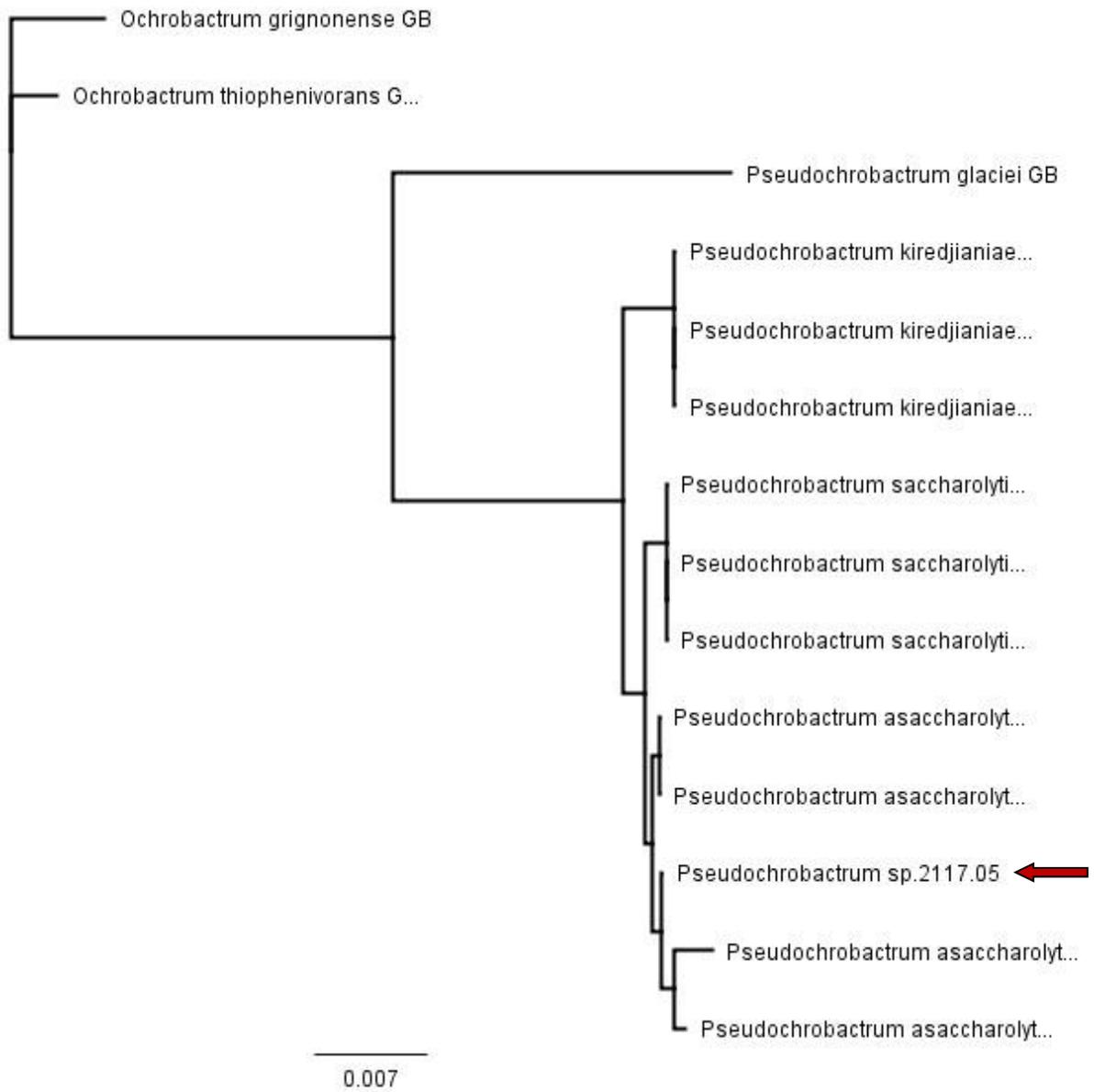


Figura 21: Árvore de distância do gênero *Pseudochrobactrum*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. A seta em vermelho indica a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

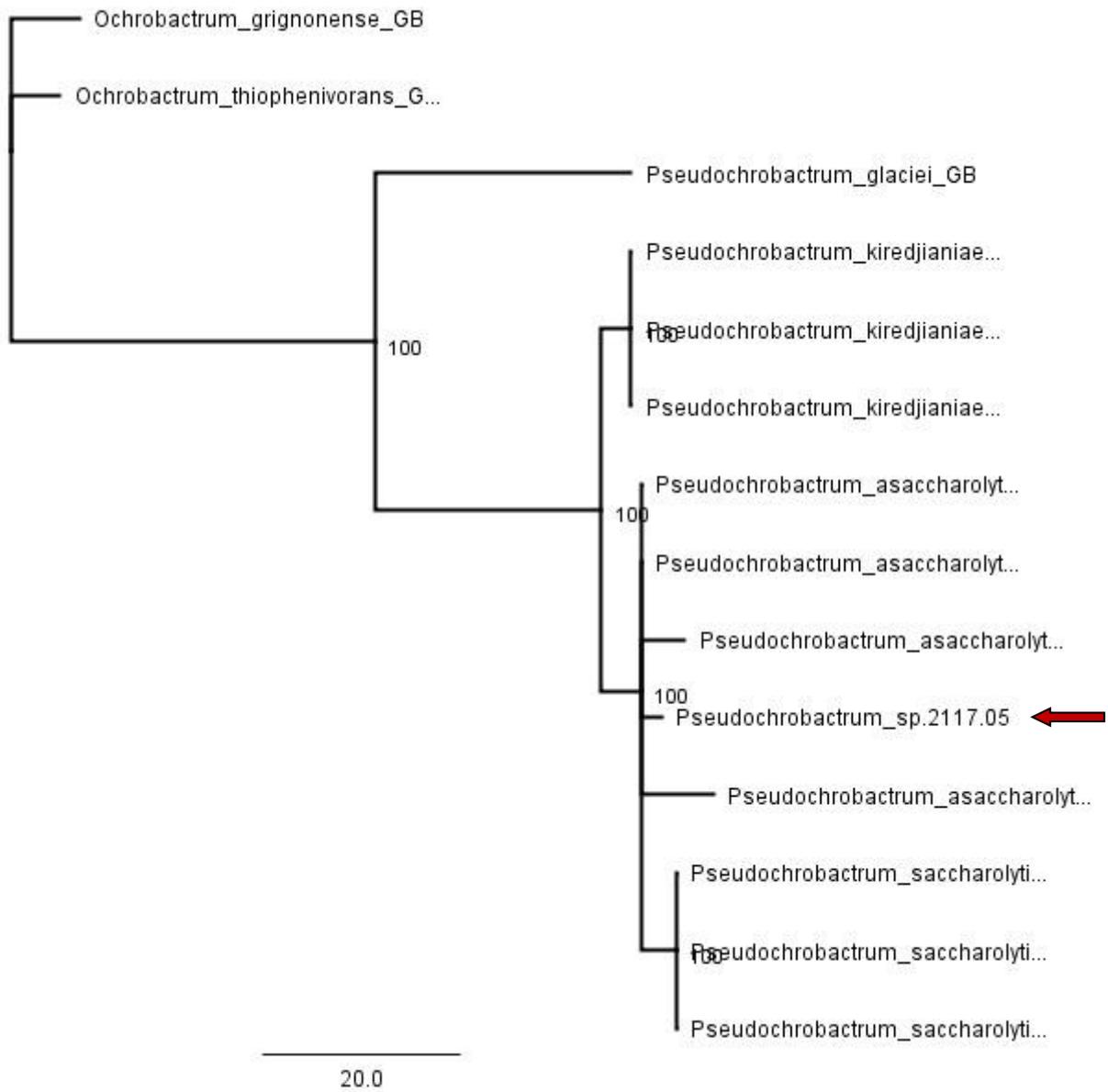


Figura 22: Consenso estrito das 80 árvores mais parcimoniosas do gênero *Pseudochrobactrum* obtidas pela busca heurística. A seta em vermelho indica a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.4 Comamonadaceae (Willems *et al.* 1991)

A família Comamonadaceae é formada 33 gêneros sendo *Comamonas* (*ex* Davis and Park 1962) De Vos *et al.* 1985 o gênero típico (LBSN). É constituída por bactérias Gram negativas, aeróbias e a maioria das espécies se movimentam por flagelos polares (Koneman *et al.*, 2008).

Por sua vez, o gênero *Comamonas* é formado por 15 espécies, sendo *Comamonas terrigena* (*ex* Hugh 1962) De Vos *et al.* 1985 a espécie típica. Neste trabalho, 1 amostra foi sinalizada como *Comamonas*, 2117.16.

Este microrganismo, nas árvores de distância (fig. 23) e parcimônia (fig. 24), apresenta-se no clado das espécies *C. testosteroni* (Marcus and Talalay 1956) Tamaoka *et al.* 1987 em Associação Direta Monofilética.

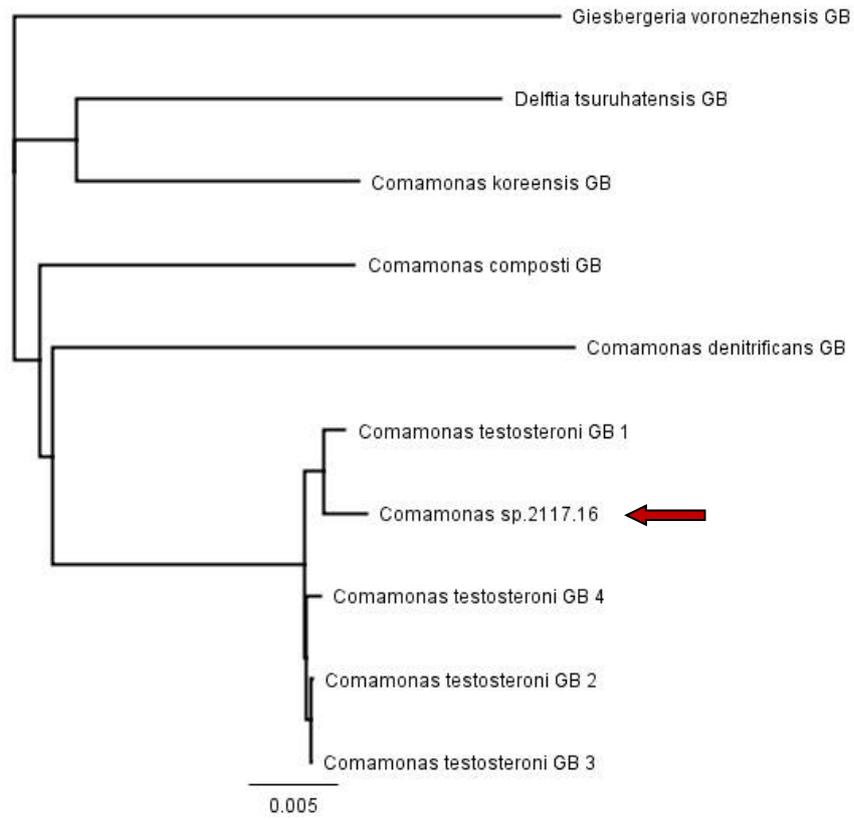


Figura 23: Árvore de distância do gênero *Comamonas*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. A seta em vermelho indica a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

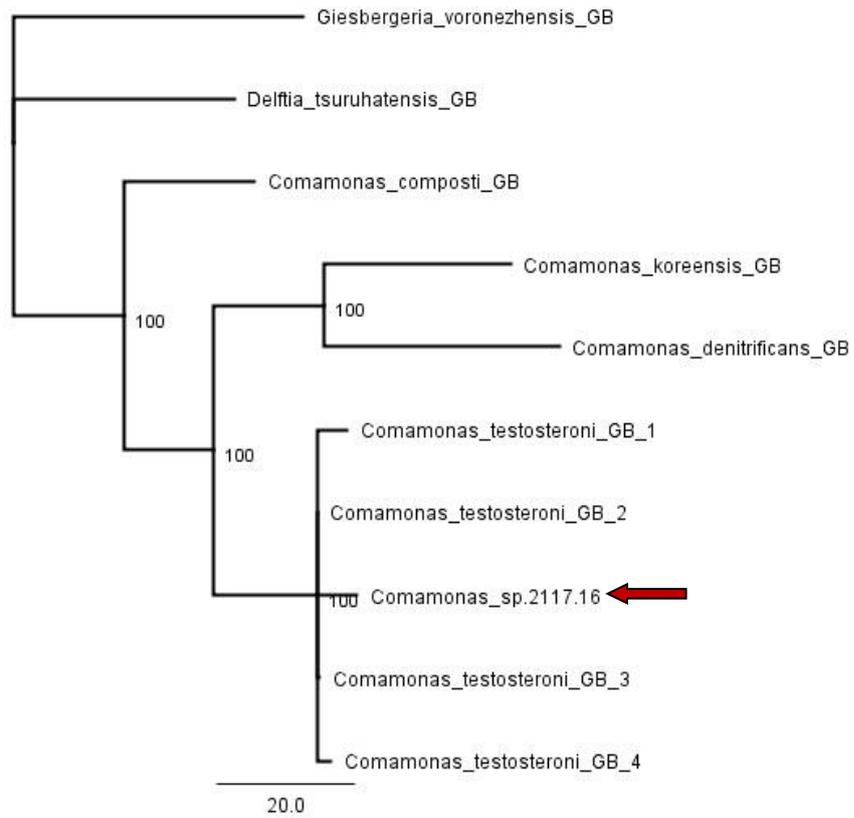


Figura 24: Consenso estrito das 70 árvores mais parcimoniosas do gênero *Comamonas* obtidas pela busca heurística. A seta em vermelho indica a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.5 Enterobacteriaceae (Rahn 1937)

A família Enterobacteriaceae se encontra amplamente distribuída na natureza, presente no solo, água, vegetais e, como indica o seu nome, no trato digestivo de animais e seres humanos (Koneman *et al.*, 2008). Possui ca. 31 gêneros, tendo *Escherichia* (Castellani & Chalmers 1919) como gênero típico. Os organismos desta família caracterizam-se por serem Gram negativos, anaeróbios facultativos e não formam esporos (Koneman *et al.*, 2008).

Dos 154 isolados, 50 foram sinalizadas como pertencentes a esta família, representada pelos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Pantoea*.

5.5.5.1 *Citrobacter* (Werkman and Gillen 1932)

O gênero *Citrobacter* possui ca. 11 espécies, sendo *Citrobacter freundii* (Braak 1928) Werkman and Gillen 1932, a sua espécie típica (LBSN). As espécies deste gênero são anaeróbios facultativos, móveis e utilizam o citrato como única fonte de carbono (Koneman *et al.*, 2008).

Por meio das análises comparativas por métodos de distância (fig. 25) e parcimônia, (fig. 26) observa-se que a amostra 2103.17 aparece em Associação Direta Parafilética com espécies do GB *C. cf. werkmanii* (Brenner *et al.* 1993), enquanto que a amostra 2086.27 se encontra em Associação Direta de Grupo com *C. amalonaticus* (Young *et al.* 1971) Brenner e Farmer 1982 e *C. farmeri* (Brenner *et al.* 1993). Por sua vez, 2086.36, 2103.28, 2114.16, 2117.02, 2117.18, 2118.04, 2118.11 e 2246.04 foram definidas somente ao nível de gênero uma vez que os clados de ambas as árvores se apresentam mal definidos e colapsados, não sendo possível uma classificação específica das amostras apenas com base na sequência do 16S. Parte desta falta de resolução pode estar relacionada à paralogia presente ao longo do genoma do gênero *Citrobacter*.

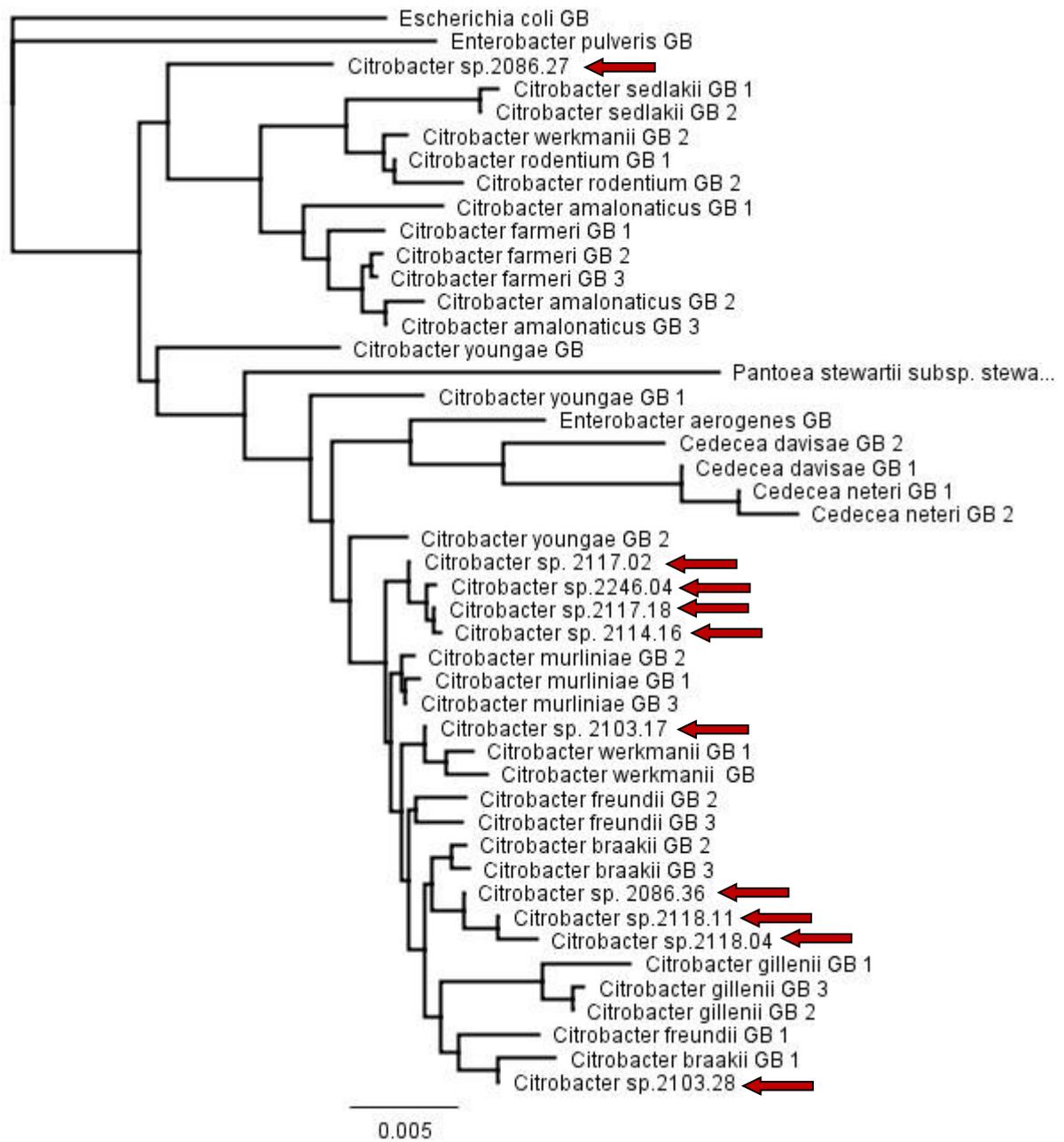


Figura 25: Árvore de distância do gênero *Citrobacter*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. A seta em vermelho indica a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

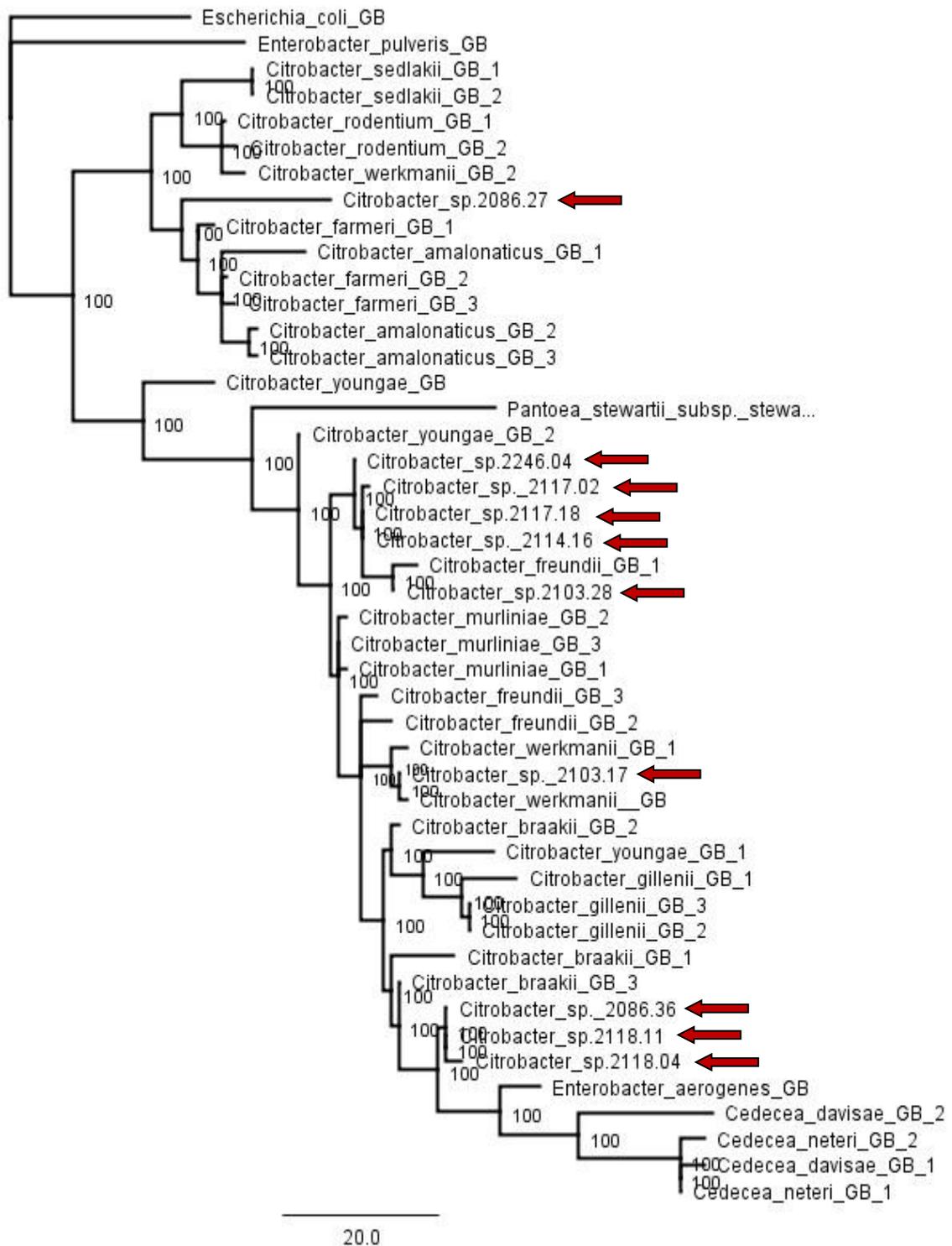


Figura 26: Consenso estrito das 10 árvores mais parcimoniosas do gênero *Citrobacter* obtidas pela busca heurística. A seta em vermelho indica a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.5.2 *Enterobacter* (Hormaeche and Edwards 1960)

O gênero *Enterobacter* possui ca. 25 espécies e 2 subespécies, sendo *Enterobacter cloacae* (Jordan 1890) Hormaeche e Edwards 1960 a espécie típica (LBSN). As bactérias deste grupo consistem em bacilos curtos Gram negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, sendo encontradas em água, solo, vegetais e em fezes de animais e seres humanos (Koneman *et al.*, 2008).

Na análise de parcimônia (fig. 28), as amostras 2117.04 e 2117.14 encontram-se em Posição Isolada, podendo representar uma nova espécie para este gênero. Quanto a 2086.11, 2086.15, 2086.26 e 2117.23 foram identificadas como *E. hormaechei* (O'Hara *et al.* 1990), uma vez que se apresentaram em Associação Direta Monofilética com as espécies obtidas do GB. Por sua vez as amostras 2086.16 e 2120.04 estão em Associação Indireta Monofilética com *E. cancerogenus* (Urosevic 1966) Dickey and Zumoff 1988 e *E. kobei* (Kosako *et al.* 1997), respectivamente, sendo, portanto identificadas como *Enterobacter* aff. *cancerogenus* 2086.16 e *Enterobacter* aff. *kobei* 2120.04 (fig. 28).

Em Associação Direta Parafilética estão as bactérias 2085.07, 2086.05, 2086.28, 2114.05 e 2114.08 com as espécies do GB *E. cloacae*. Por outro lado, os isolados 2070.07, 2070.09, 2085.08, 2086.01, 2086.14, 2086.23, 2103.23, 2114.04, 2114.10, 2114.14, 2118.13, 2246.02, 2246.07 e 2246.08 não puderam ser classificadas especificamente apenas com base na sequência do 16S, pois apresentaram baixa resolução. Parte desta falta de resolução pode estar relacionada à paralogia presente ao longo do genoma do gênero *Enterobacter*.



Figura 27: Árvore de distância do gênero *Enterobacter*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. A seta em vermelho indica a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

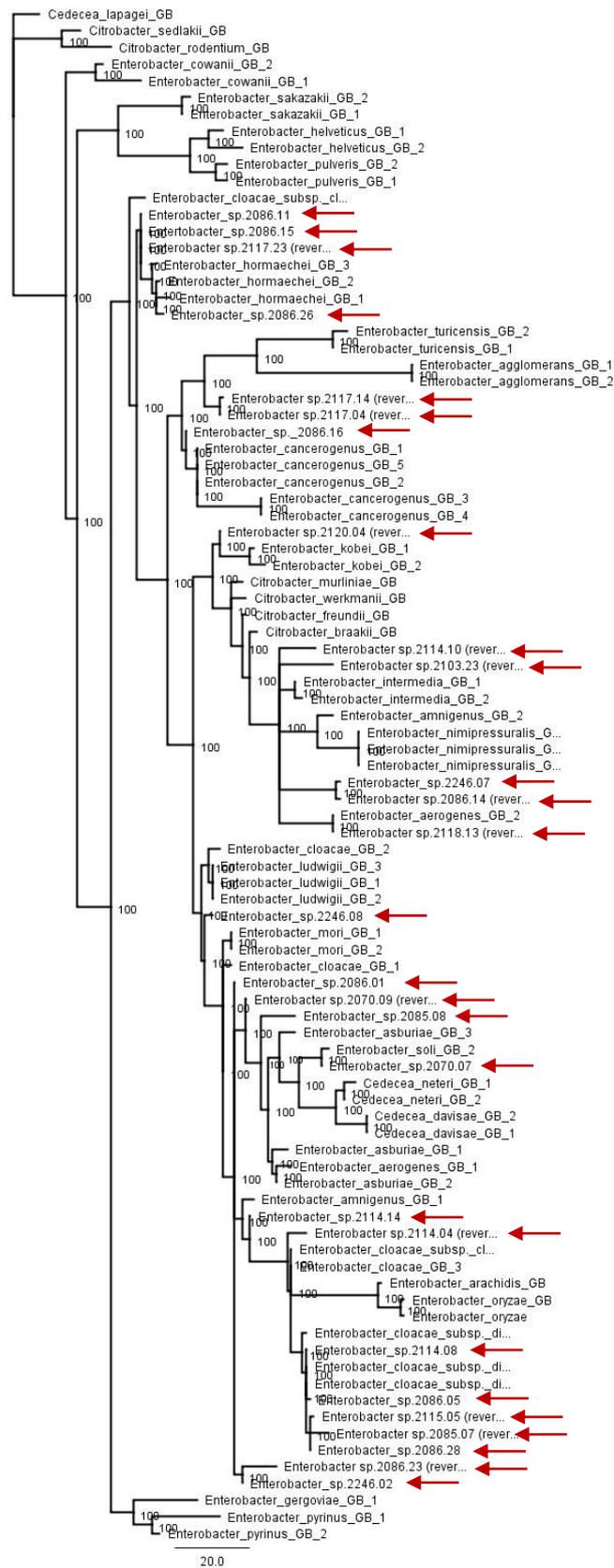


Figura 28: Consenso estrito das 10 árvores mais parcimoniosas do gênero *Enterobacter* obtidas pela busca heurística. A seta em vermelho indica a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.5.3 *Escherichia* (Castellani and Chalmers 1919)

O gênero *Escherichia* é formada por 7 espécies, sendo *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919 a espécie típica. É formado por microrganismos comensais e patogênicos aos humanos, sendo os mais conhecidos aqueles que provocam infecções urinárias e doenças gastrointestinais (Madigan *et al.*, 2010)

Do total de amostras isoladas do solo de Santo Amaro, 1 foi identificada como *Escherichia*, 2103.20. Esta bactéria se encontra em Associação Direta Monofilética com as espécies de *E. coli* obtidas do GB, tanto na análise de distância (fig. 29) quanto de parcimônia (fig. 30), em um clado com elevado suporte.

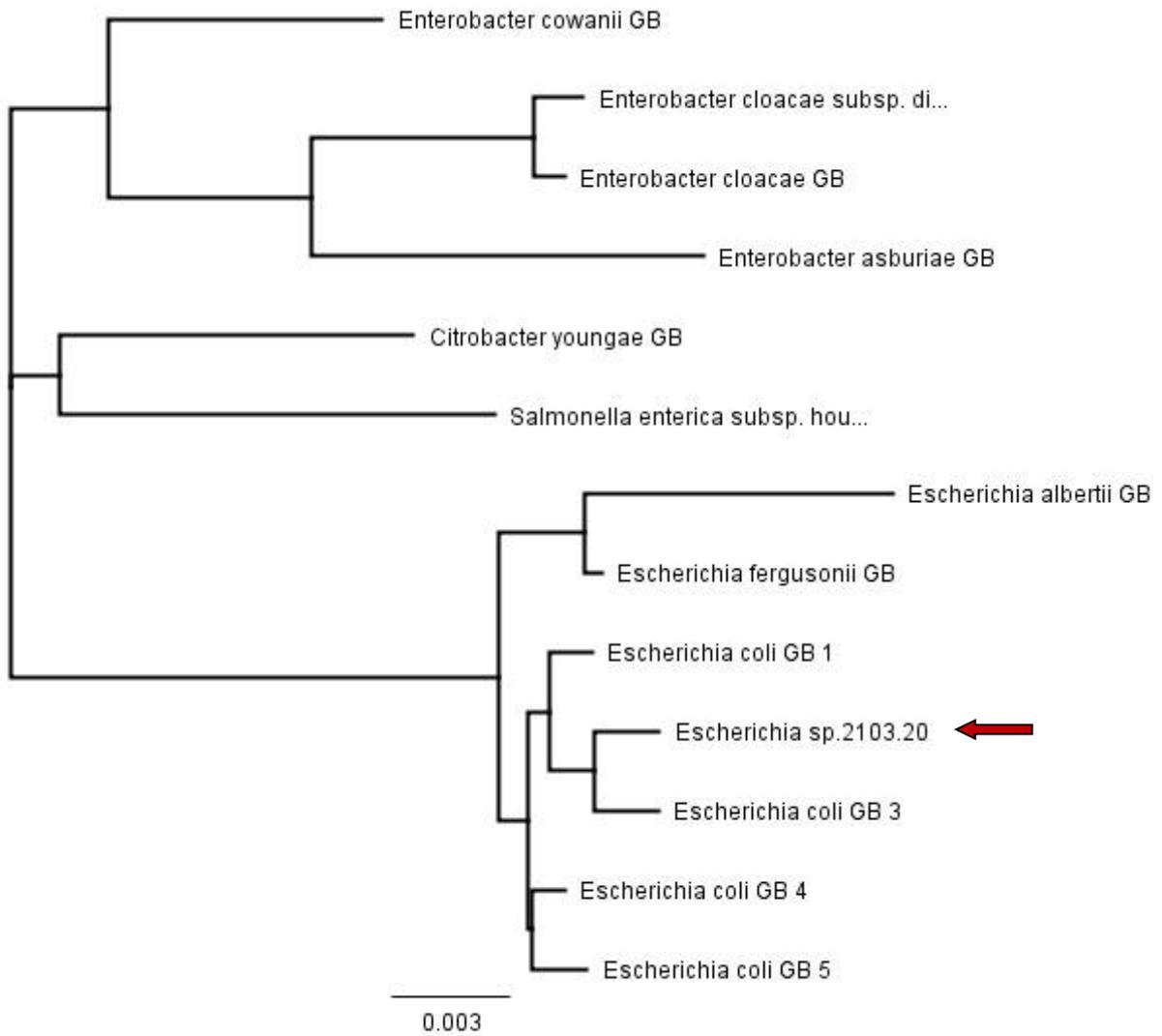


Figura 29: Árvore de distância do gênero *Escherichia*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. A seta em vermelho indica a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

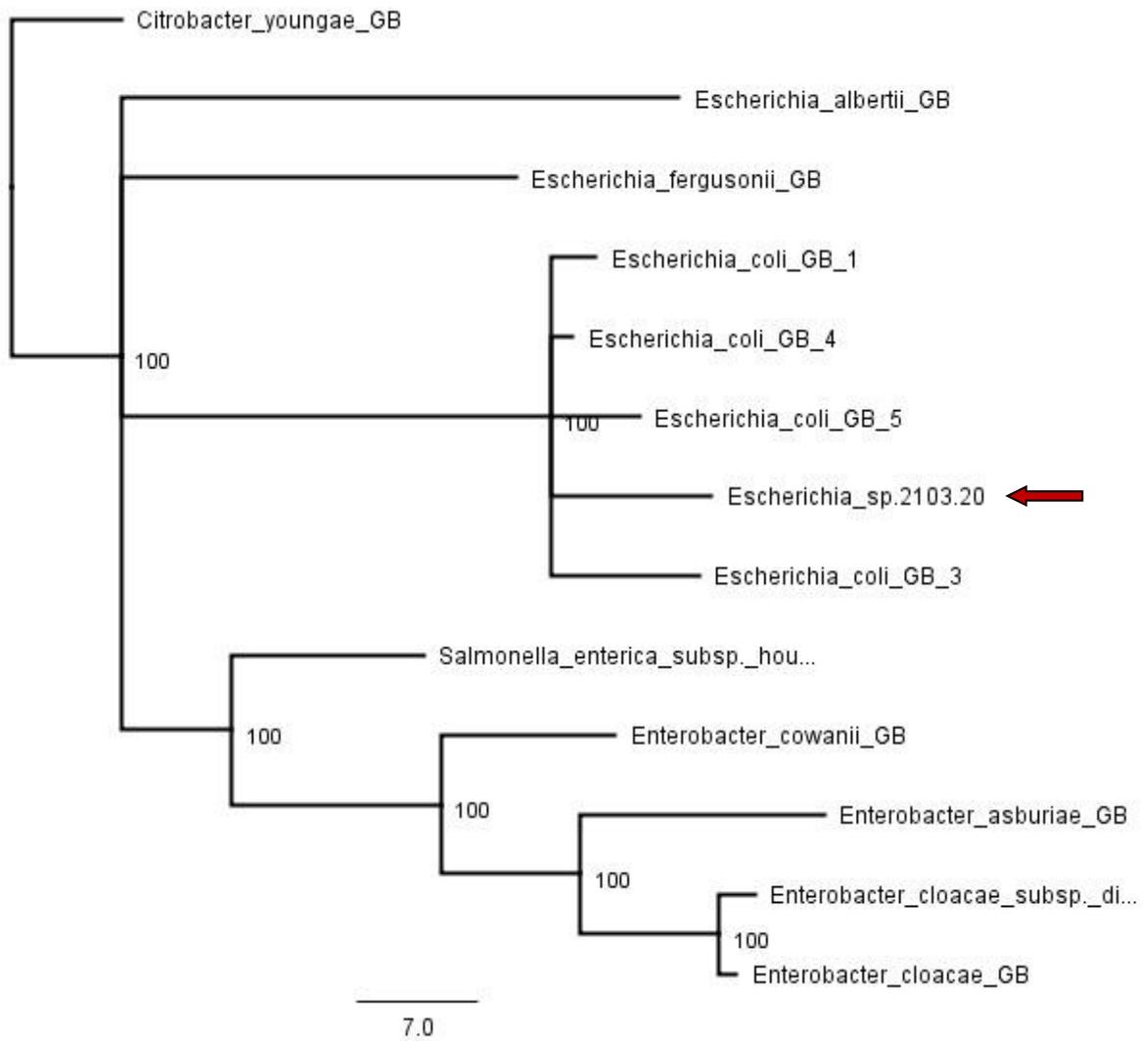


Figura 30: Consenso estrito das 28 árvores mais parcimoniosas do gênero *Escherichia* obtidas pela busca heurística. A seta em vermelho indica a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.5.4 *Klebsiella* (Trevisan 1885)

O gênero *Klebsiella* é formado por 12 espécies e 3 subespécies, sendo *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter 1886) Trevisan 1887 a espécie típica (LBSN). Os microrganismos deste grupo se encontram amplamente distribuídos na natureza e no trato gastrointestinal de animais e seres humanos, nos quais, quando imunodeprimidos, causam infecções e pneumonia (Koneman *et al.*, 2008).

Nas árvores de distância (fig. 31) e parcimônia (fig. 32), as amostras de *K. variicola*, obtidas do GB, se agruparam em um clado colapsado e com elevada resolução às amostras 2085.15 e 2086.20, em Associação Direta Parafilética.

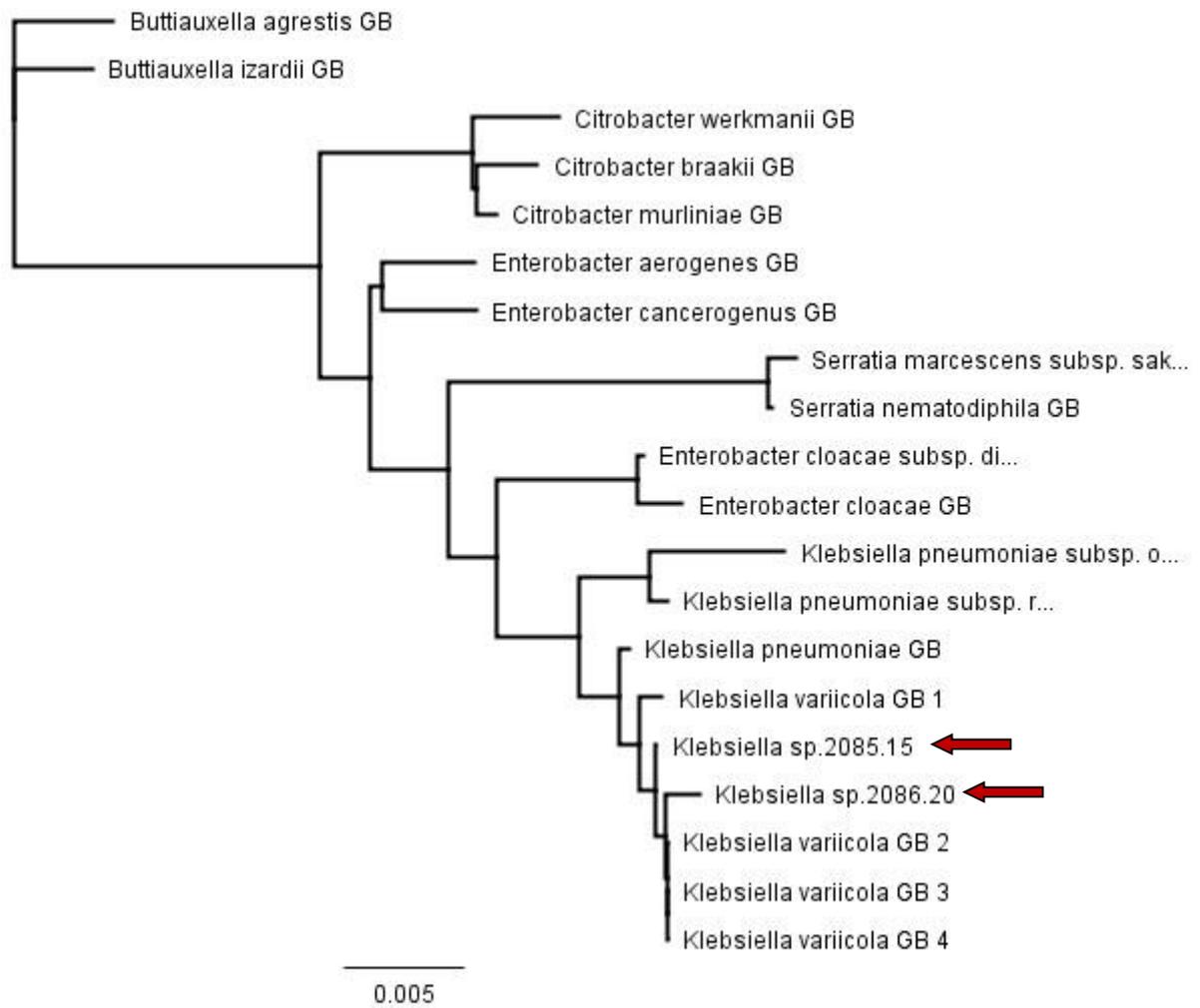


Figura 31: Árvore de distância do gênero *Klebsiella*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. As setas em vermelho indicam a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

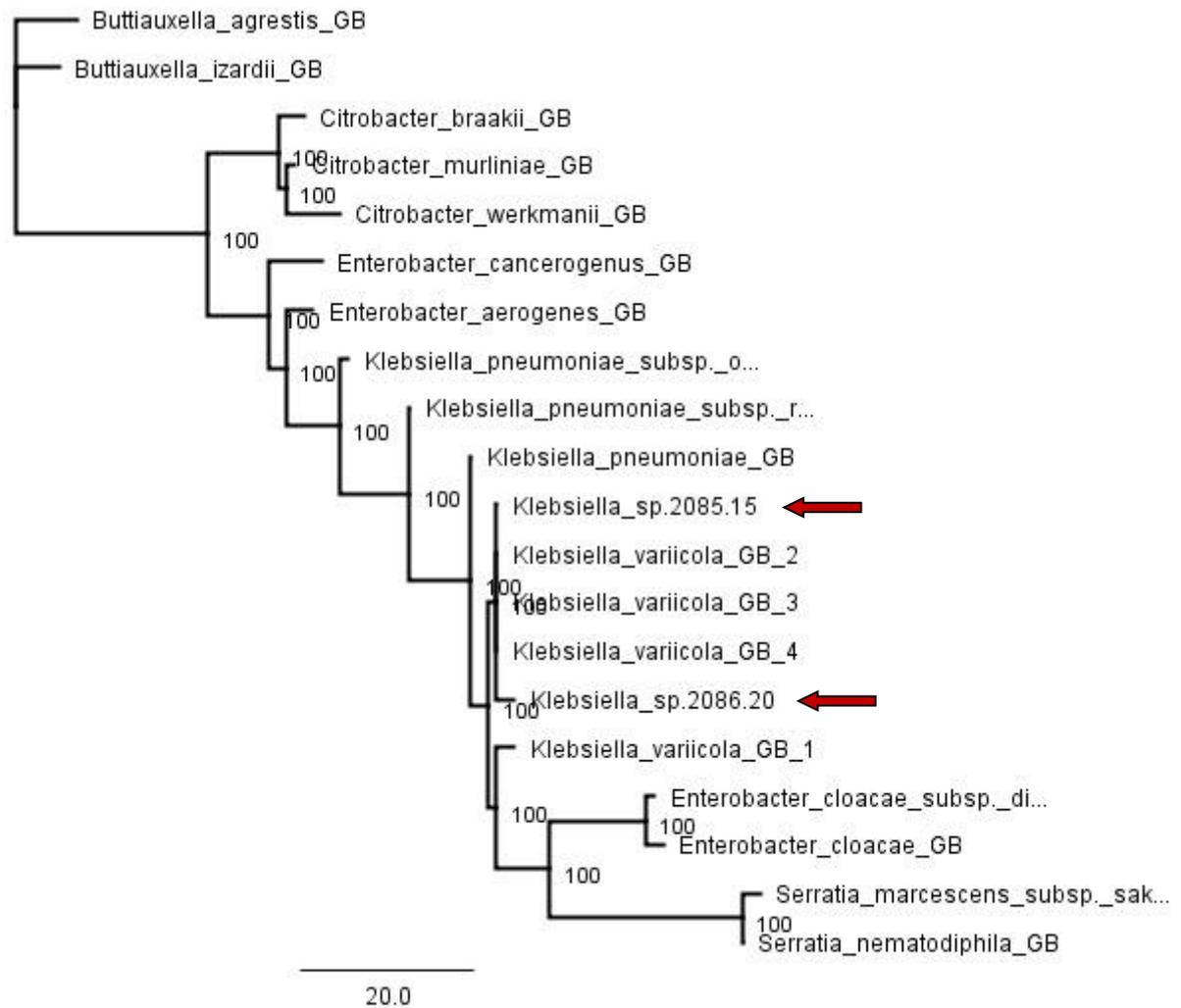


Figura 32: Consenso estrito das 2 árvores mais parcimoniosas do gênero *Klebsiella* obtidas pela busca heurística. As setas em vermelho indicam a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.5.5 *Pantoea* (Gavini *et al.* 1989)

O gênero *Pantoea* é composto por 22 espécies, sendo a espécie típica *Pantoea agglomerans* (Ewing and Fife 1972) Gavini *et al.* 1989 (LBSN). O termo *Pantoea* provém de uma palavra grega que significa “de todos os tipos e fontes”, referente a sua ampla distribuição geográfica e ecológica (Koneman *et al.*, 2008).

Nas análises de distância (fig. 33) e parcimônia (fig.34), a amostra 2086.03 se encontra em Associação Direta Parafilética com as espécies *P. anthophila* (Brady *et al.* 2009) e *P. agglomerans* (Ewing and Fife 1972) Gavini *et al.* 1989. Por sua vez, as amostras 2086.02, 2086.08 e 2086.06 se inserem, em Associação Direta Monofilética, no clado das espécies de *P. eucrina* (Brady *et al.* 2010) (fig. 33 e 34).

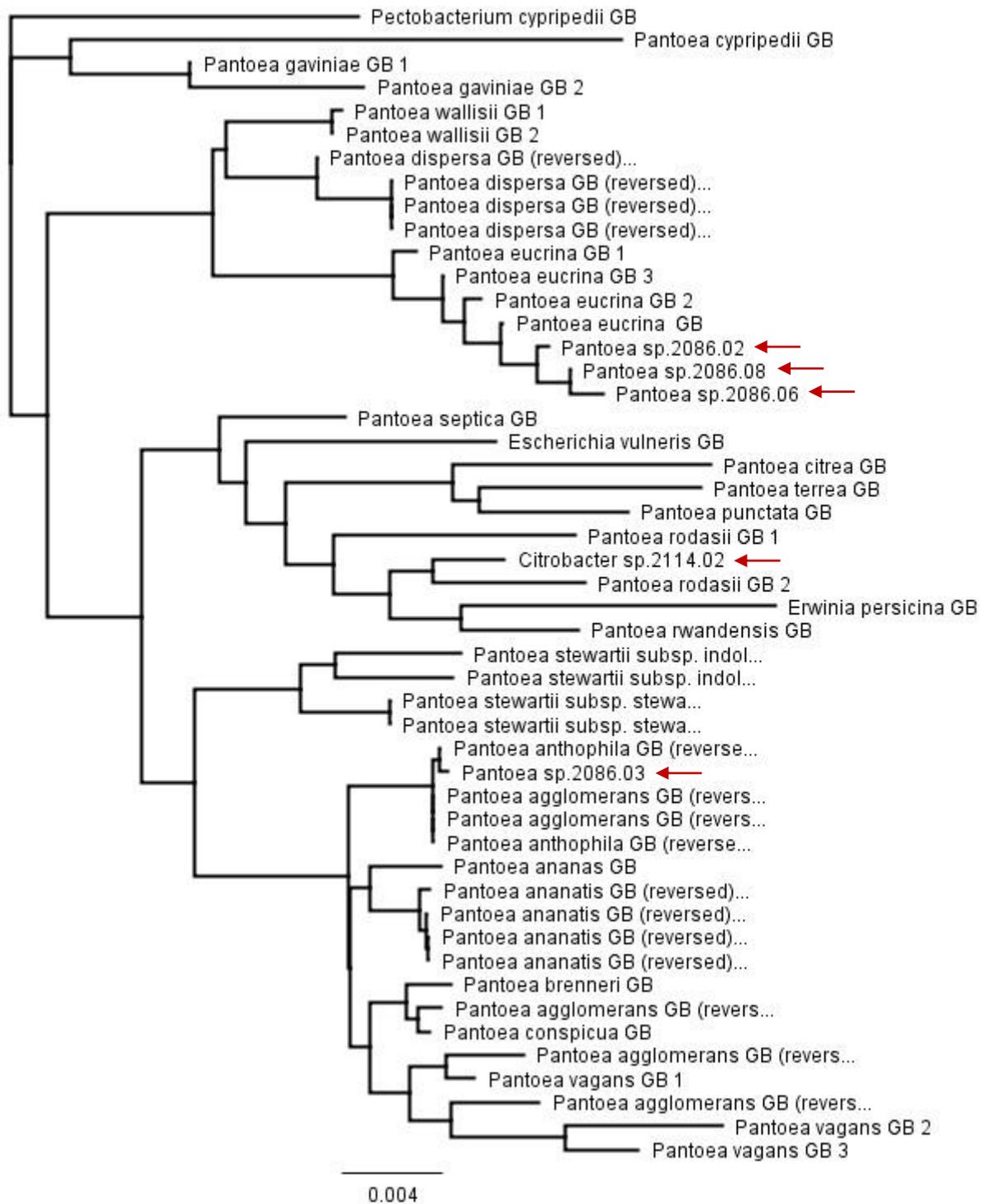


Figura 33: Árvore de distância do gênero *Pantoea*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. As setas em vermelho indicam a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

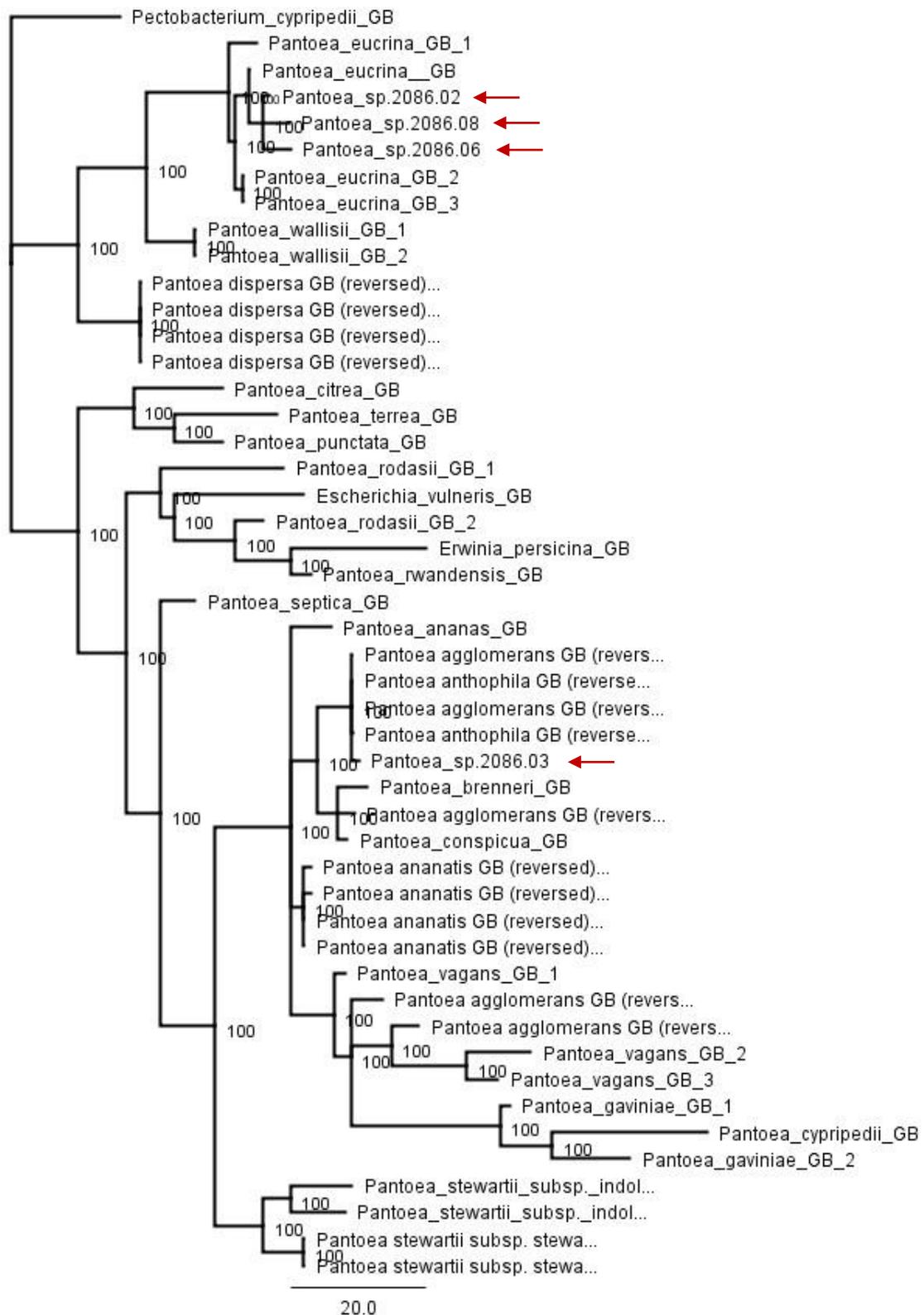


Figura 34: Consenso estrito das 30 árvores mais parcimoniosas do gênero *Pantoea* obtidas pela busca heurística. As setas em vermelho indicam a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.5.6 *Providencia* (Ewing 1962)

O gênero *Providencia* é composto por 9 espécies, sendo *Providencia alcalifaciens* (de Salles Gomes 1944) Ewing 1962 a espécie típica.

Neste trabalho, 5 amostras foram identificadas como pertencentes a este gênero, por meio de análises de distância (fig. 35) e parcimônia (fig. 36). Nestas análises, a amostra 2118.07 se apresentou no clado das espécies do GB *P. alcalifaciens* (de Salles Gomes 1944) Ewing 1962 e *P. rustigianii* (Hickman-Brenner *et al.* 1983), em Associação Direta de Grupo, enquanto que as bactérias 2103.29, 2103.27, 2118.03 e 2117.03 não puderam ser definidas com o uso do 16S.

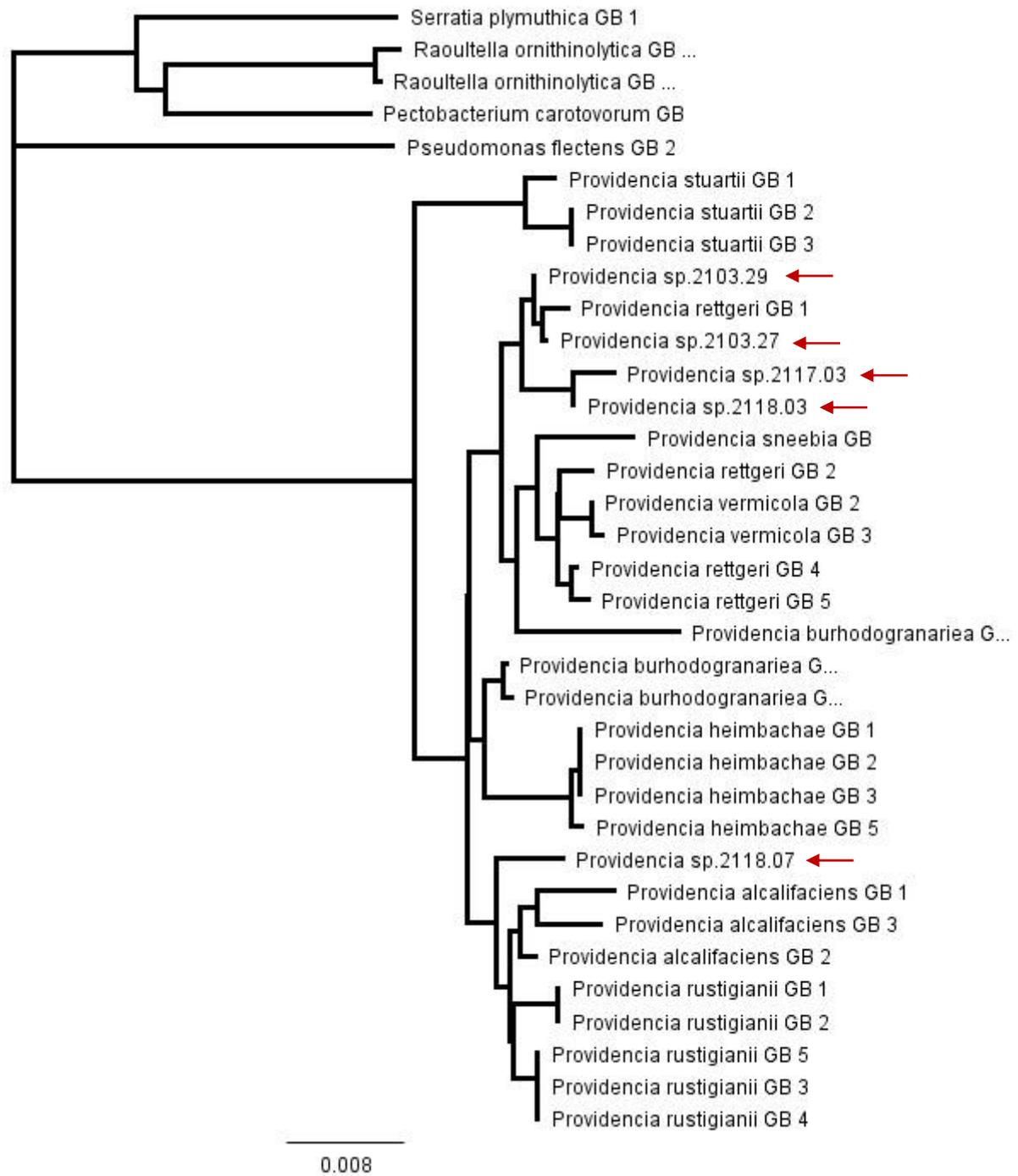


Figura 35: Árvore de distância do gênero *Providencia*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. As setas em vermelho indicam a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

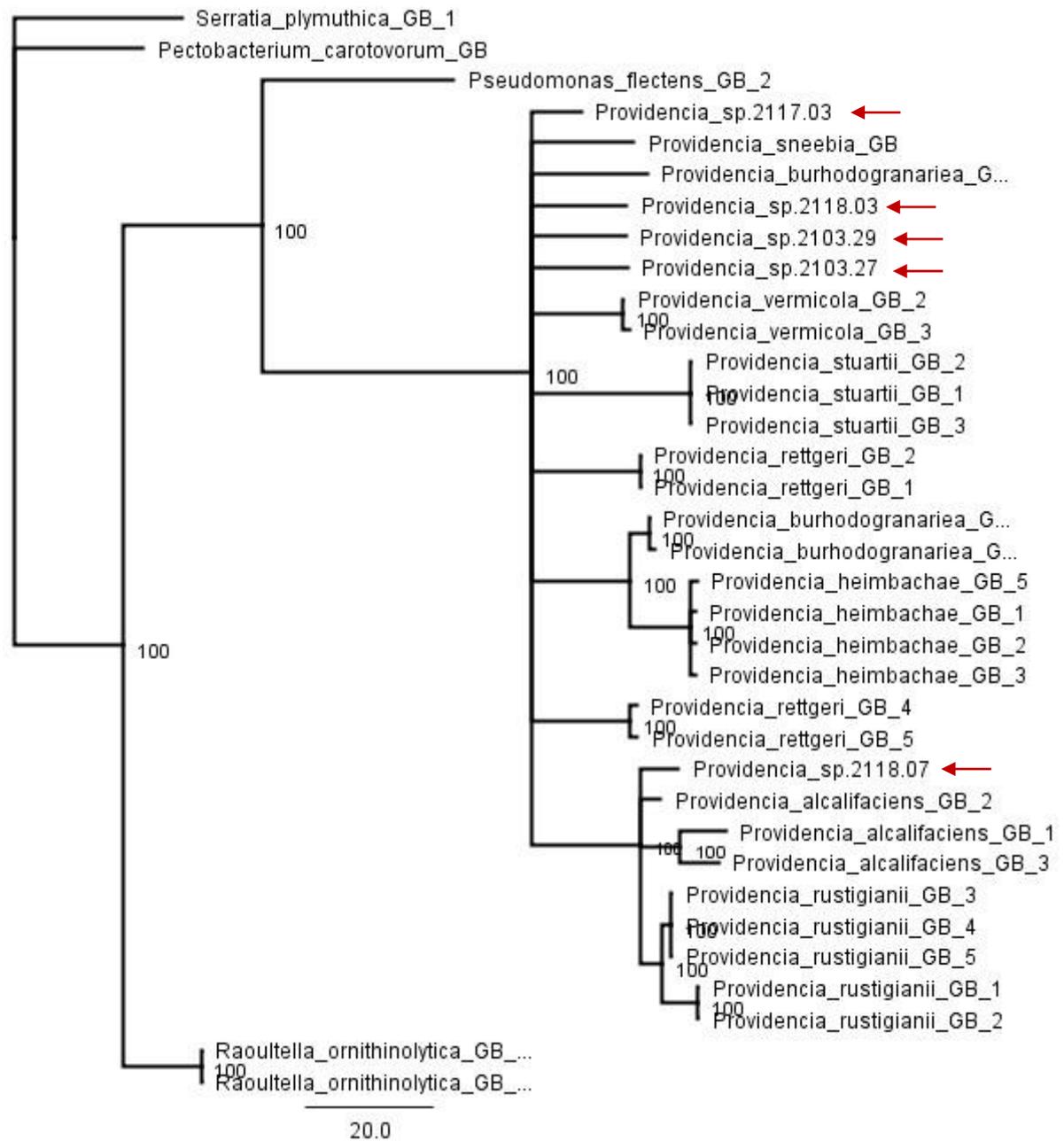


Figura 36: Consenso estrito das 60 árvores mais parcimoniosas do gênero *Providencia* obtidas pela busca heurística. As setas em vermelho indicam a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.5.7 *Serratia* (Bizio 1823)

O gênero *Serratia* possui ca. 16 espécies e 4 subespécies, sendo *Serratia marcescens* (Bizio 1823) a sua espécie típica (LBSN). As espécies deste gênero são bacilos Gram negativos e anaeróbios facultativos (Koneman *et al.*, 2008).

Por meio das análises comparativas por métodos de distância (fig. 37) e parcimônia, (fig. 38) observa-se que as amostras 2070.03, 2070.16, 2070.19, 2086.07, 2085.13, 2085.15, 2086.29, 2086.30, 2086.32, 2086.34, 2086.35, 2103.15, 2103.19, 2103.21, 2103.22, 2103.24, 2114.19, 2114.22, 2114.23, 2114.24, 2117.07, 2117.09, 2117.11, 2117.12 e 2246.05 se apresentaram em clados mal definidos e com baixa resolução, não sendo possível uma classificação específica das amostras apenas com base na sequência do 16S. Parte desta falta de resolução pode estar relacionada à paralogia presente ao longo do genoma do gênero *Serratia*.

Contudo, as amostras 2118.14, 2246.03 e 2114.20 foram identificadas até espécie com o uso do 16S. Elas se apresentaram em Associação Direta Monofilética com as espécies *S. nematodiphila* (Zhang *et al.* 2009) obtidas do GB (fig. 37 e 38).

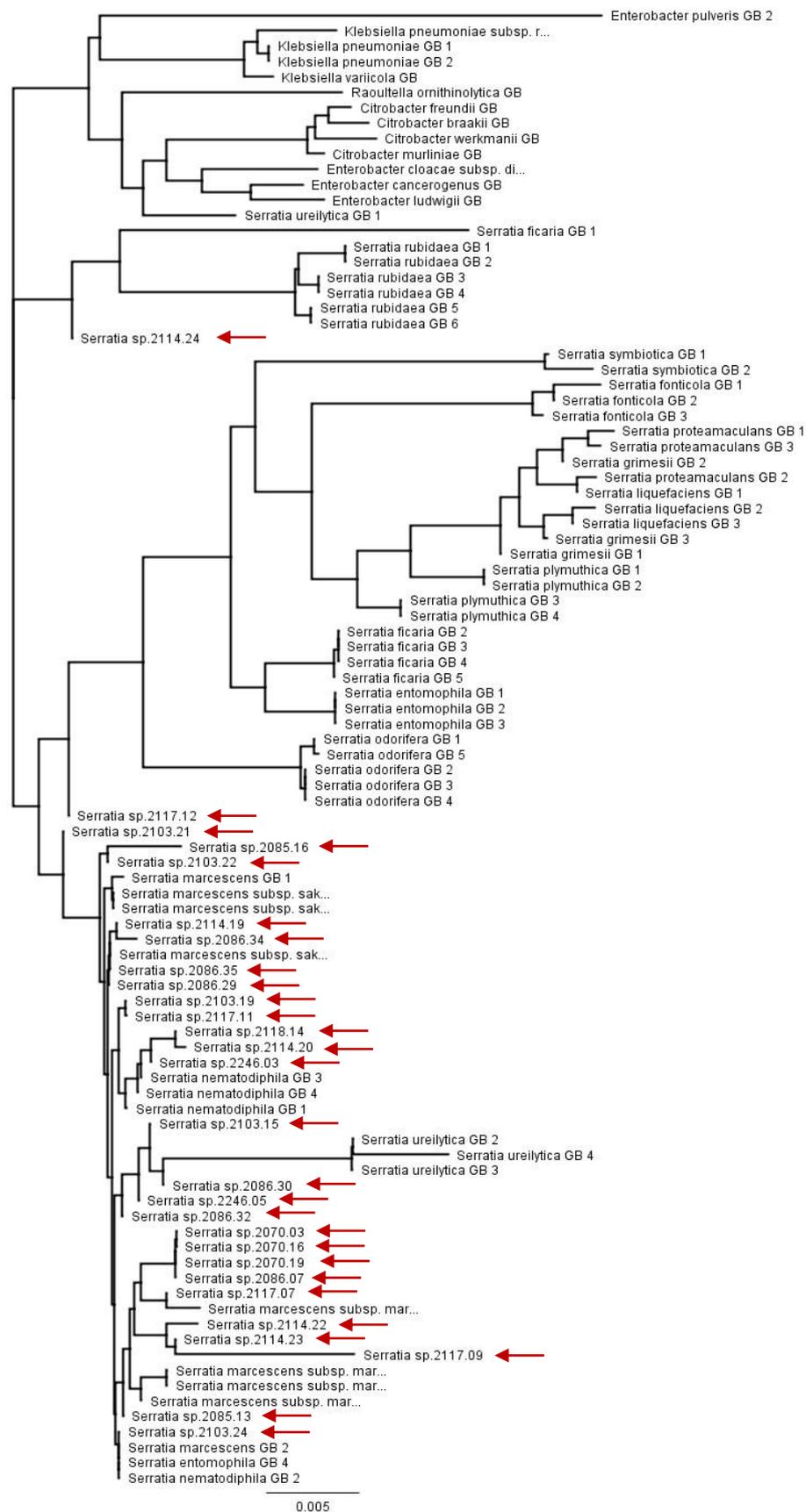


Figura 37: Árvore de distância do gênero *Serratia*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. As setas indicam a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

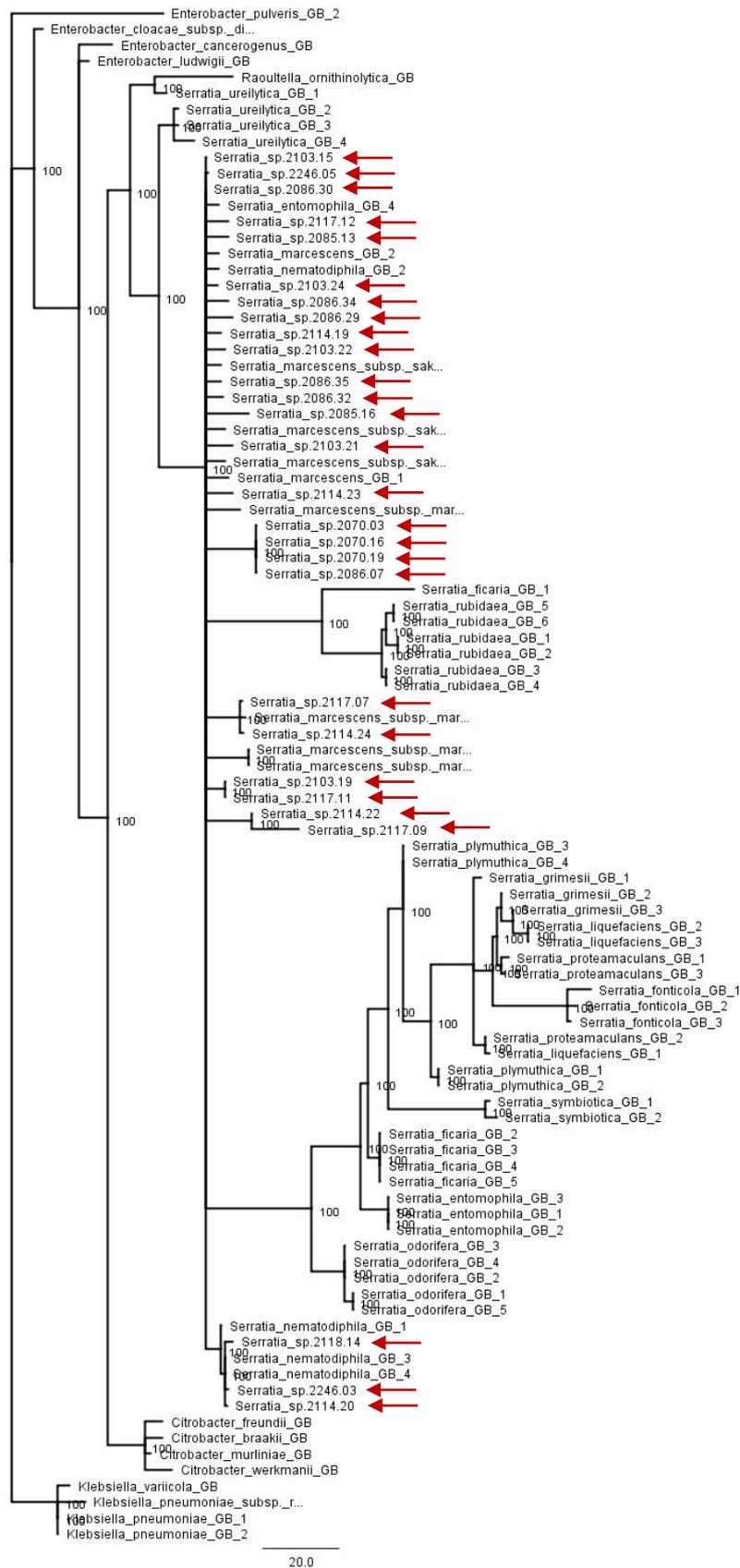


Figura 38: Consenso estrito das 10 árvores mais parcimoniosas do gênero *Serratia* obtidas pela busca heurística. As setas em vermelho indicam a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.6 Enterococcaceae (Ludwig *et al.* 2010)

A família Enterococcaceae é formada por 7 gêneros, sendo *Enterococcus* (*ex* Thiercelin and Jouhaud 1903) Schleifer and Kilpper-Bälz 1984 o gênero típico, o qual é formado por 46 espécies, dentre as quais *Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder 1906) Schleifer and Kilpper-Bälz 1984 é a espécie típica (Fisher e Phillips, 2009).

Os microrganismos que compõem este grupo são formados por cocos Gram positivos encontrados no meio ambiente, além do trato digestivo de humanos e animais (Koneman *et al.*, 2008).

Neste trabalho foram obtidas 2 amostras do gênero *Enterococcus*, 2085.05 e 2085.09, as quais se apresentaram em Associação Direta de Grupo com as espécies do GB *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* (fig. 39 e 40).

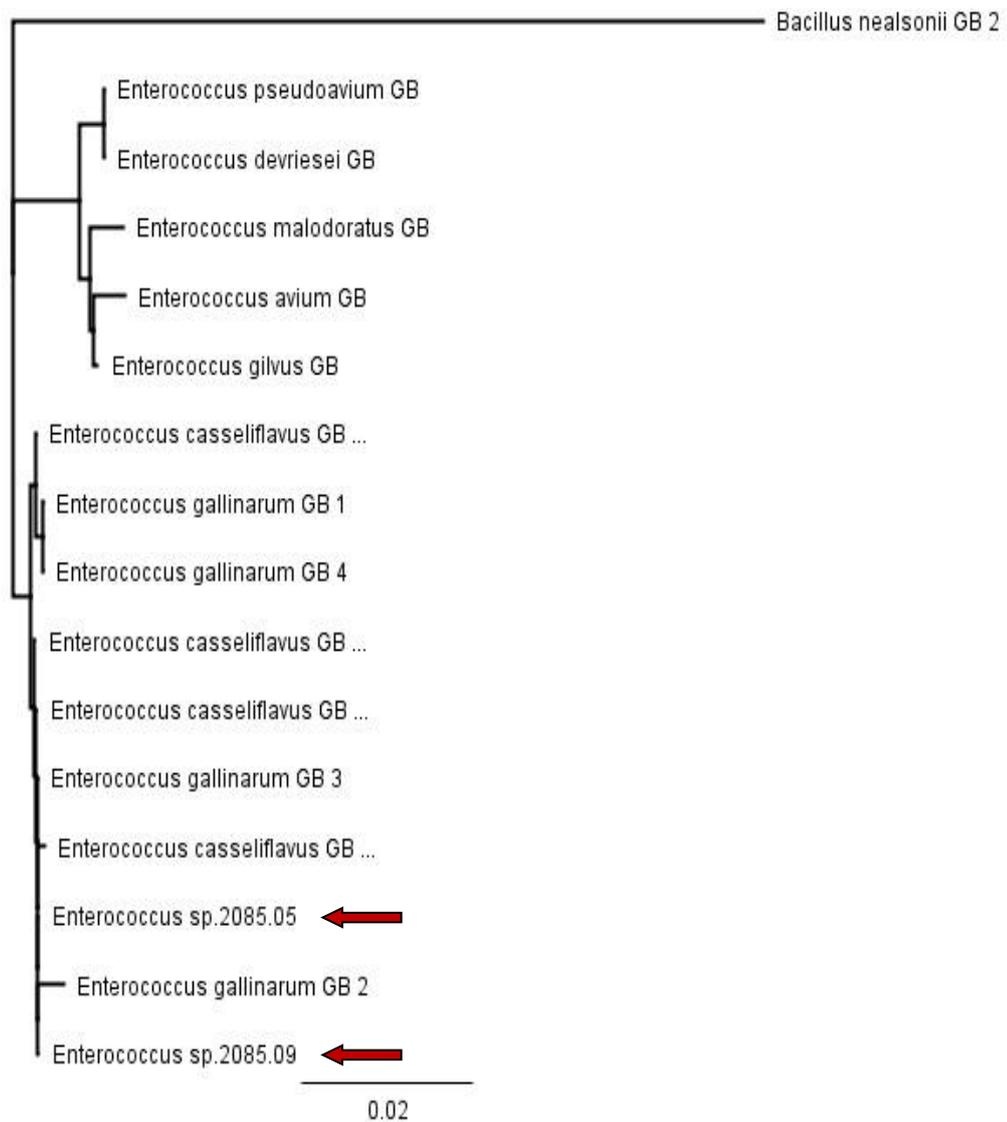


Figura 39: Árvore de distância do gênero *Enterococcus*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. As setas indicam a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

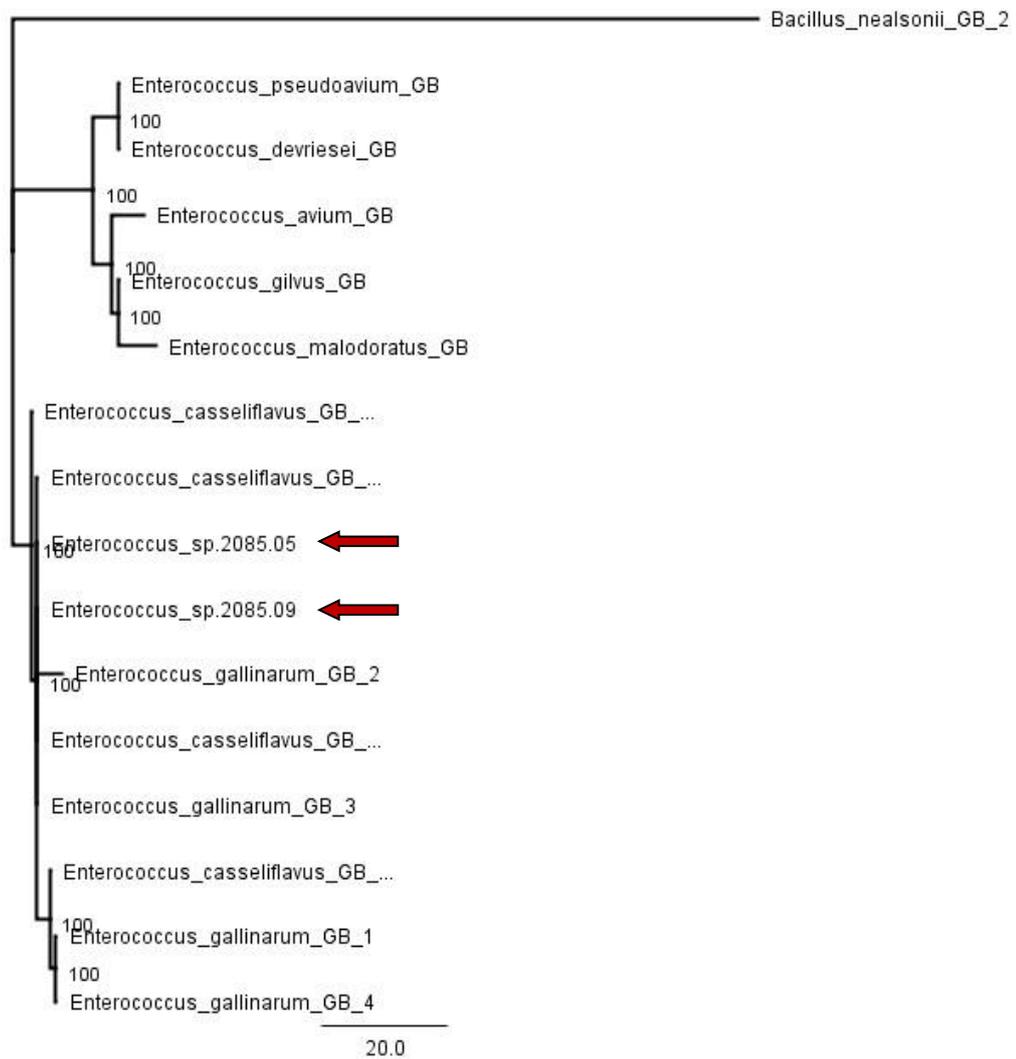


Figura 40: Consenso estrito das 2 árvores mais parcimoniosas do gênero *Enterococcus* obtidas pela busca heurística. As setas em vermelho indica a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.7 Microbacteriaceae (Park *et al.* 1995)

A família Microbacteriaceae é composta por 39 gêneros, sendo *Microbacterium* (Orla-Jensen 1919) o gênero típico. Os organismos deste grupo são predominantemente aeróbios, Gram positivos com morfologias que variam entre cocos, bacilos e hifas (Evtushenko e Takeuchi, 2012)

Do total de amostras isoladas, foram identificadas como pertencentes a esta família os gêneros *Leucobacter* (Takeuchi *et al.* 1996) e *Microbacterium* (Orla-Jensen 1919).

5.3.7.1 *Leucobacter*

O gênero *Leucobacter* é constituído por 15 espécies e 2 subespécies sendo *Leucobacter komagatae* (Takeuchi *et al.* 1996) a espécie típica.

Por meio das análises de distância (fig. 41) e parcimônia (fig. 42), observa-se que a amostra 2114.07 se encontra em Associação Indireta Monofilética com as espécies *L. chromiireducens* (Morais *et al.* 2005) em em clado colapsado e com elevada resolução.

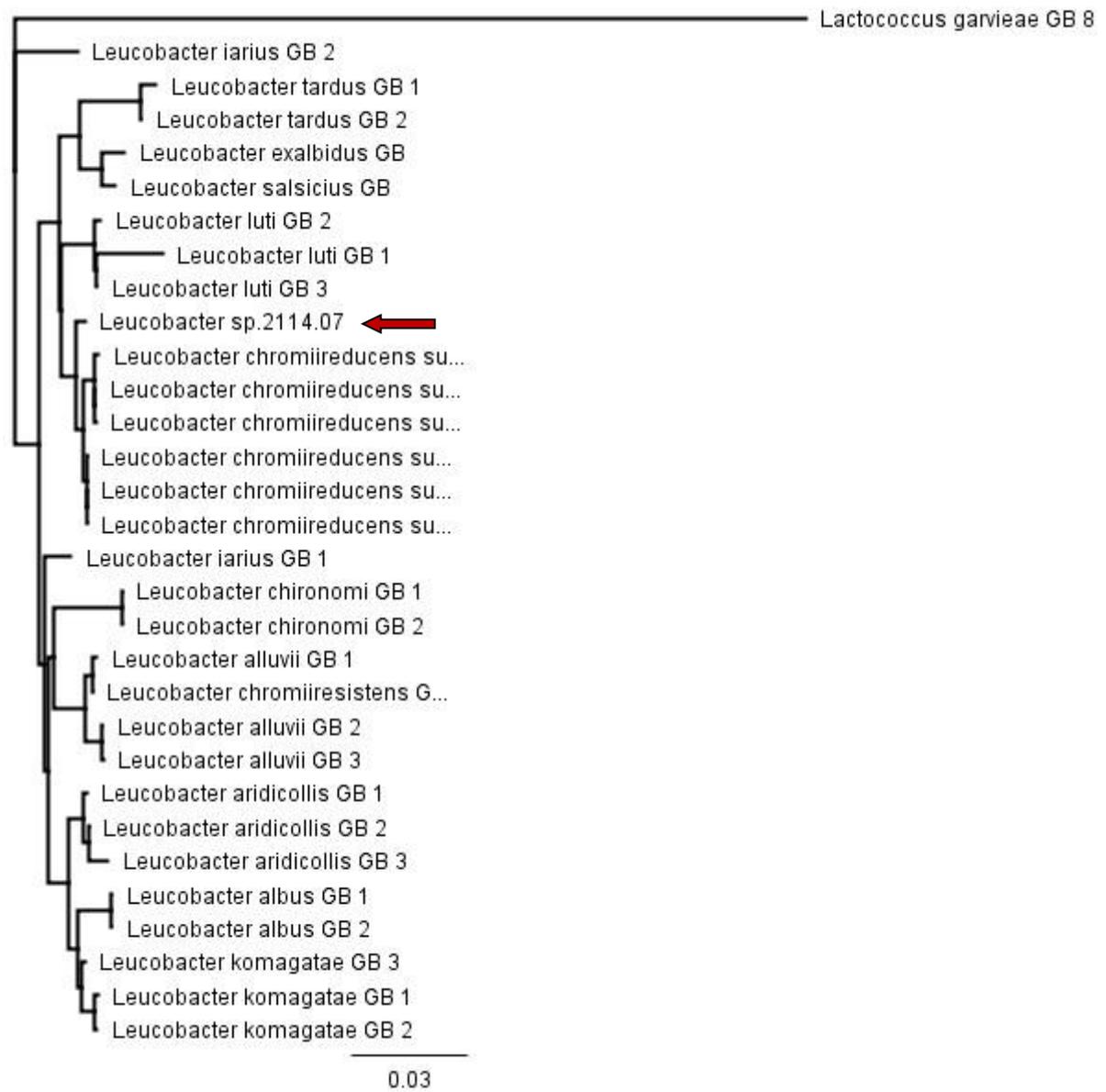


Figura 41: Árvore de distância do gênero *Leucobacter*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. A seta indica a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

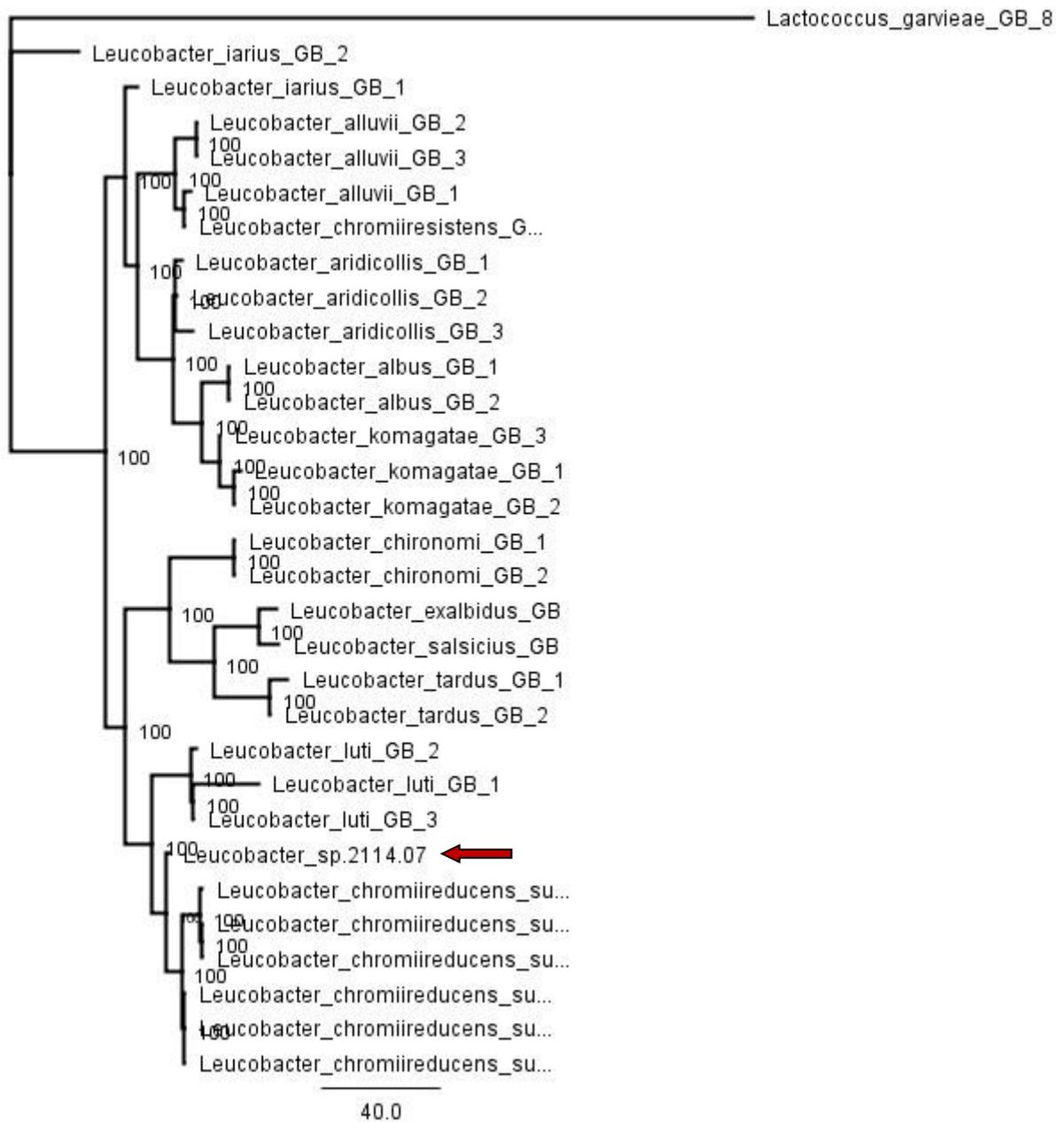


Figura 42: Consenso estrito das 3 árvores mais parcimoniosas do gênero *Leucobacter* obtidas pela busca heurística. A seta em vermelho indica a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.7.2 *Microbacterium* (Orla-Jensen 1919)

O gênero *Microbacterium* possui 79 espécies sendo *Microbacterium lacticum* (Orla-Jensen 1919) a espécie típica (LBSN).

Por meio das análises comparativas por métodos de distância (fig. 43) e parcimônia (fig. 44), observa-se que as amostras 2085.03 e 2086.17 são do gênero *Microbacterium*, uma vez que pertencem ao clado formado exclusivamente por espécies de *Microbacterium* obtidas do GB. Contudo, os clados de ambas as árvores se apresentam colapsados e sem resolução, não sendo possível uma classificação específica das amostras apenas com base na sequência do 16S. Parte desta falta de resolução pode estar relacionada à paralogia presente ao longo do genoma do gênero *Microbacterium*.

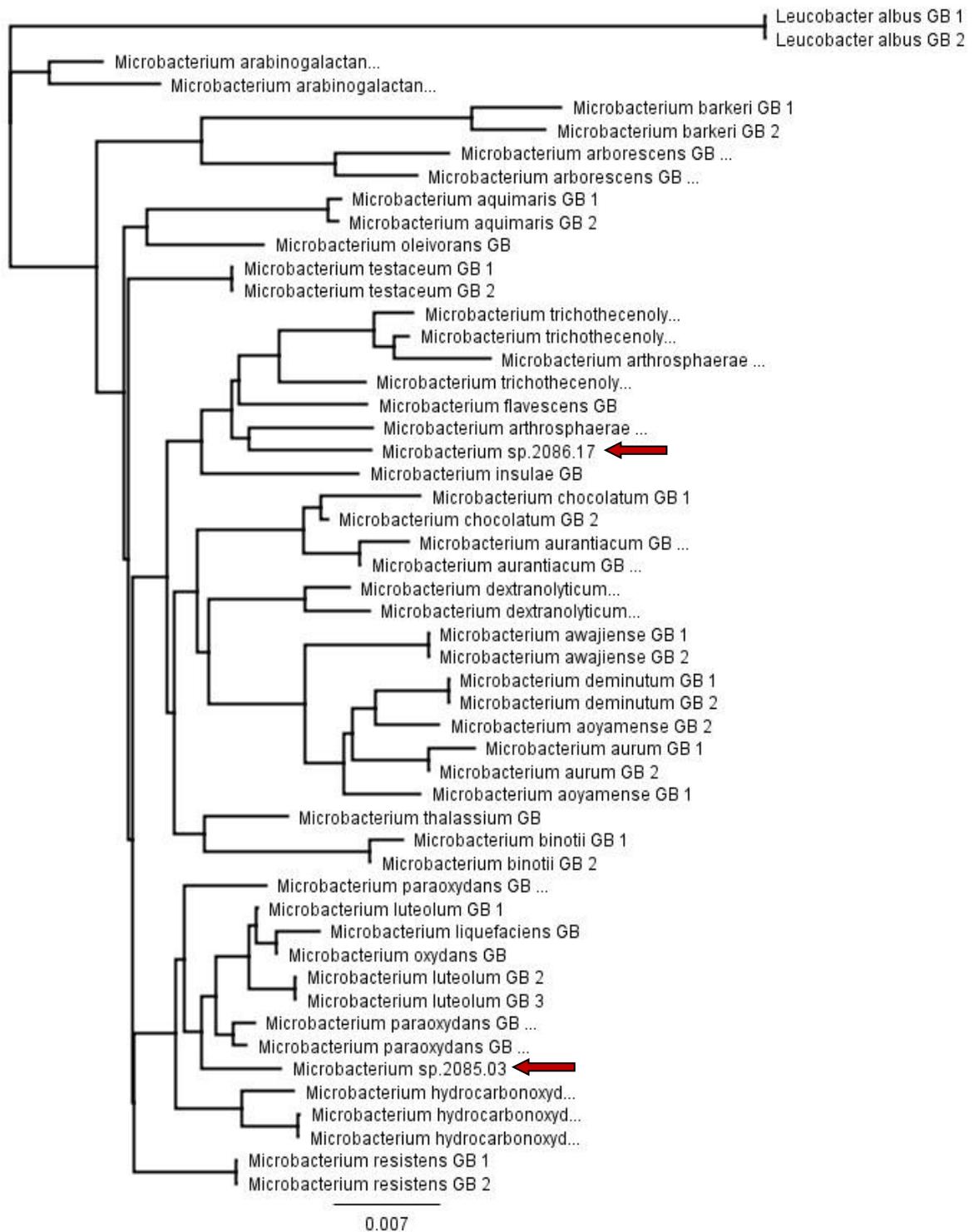


Figura 43: Árvore de distância do gênero *Microbacterium*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. As setas indicam a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

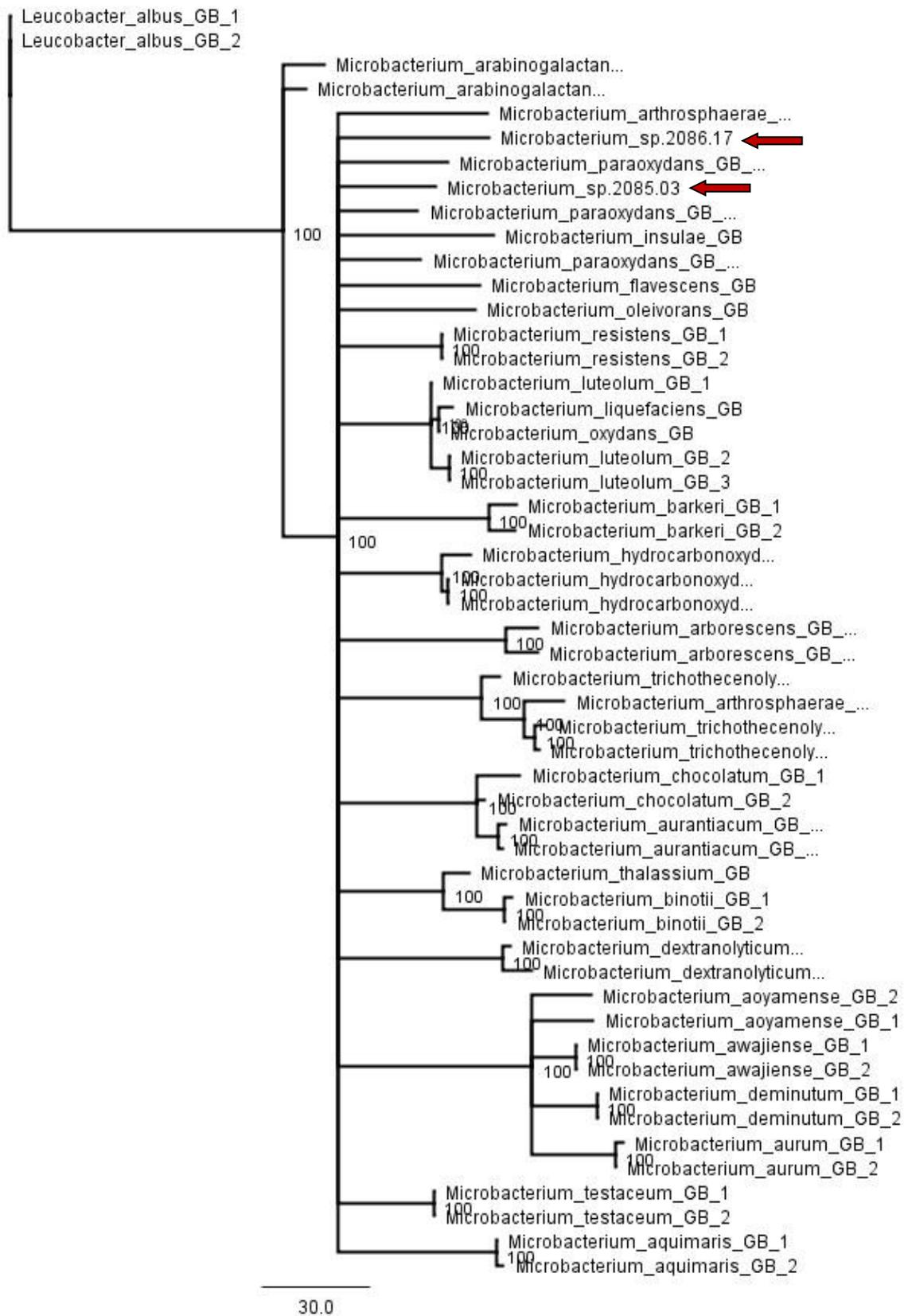


Figura 44: Consenso estrito das árvores mais parcimoniosas do gênero *Microbacterium* obtidas pela busca heurística. As setas em vermelho indicam a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.8 Micrococcaceae (Pribram 1929)

A família Micrococcaceae é constituída por 15 gêneros sendo *Micrococcus* (Cohn 1872) o gênero típico (LBSN), formado por cocos Gram positivos, não móveis e não formadores de esporos (Koneman *et al.*, 2008).

Neste trabalho foi identificado, com o uso do 16S rRNA, o gênero *Arthrobacter* (Conn and Dimmick 1947), o qual é formado por 80 espécies, sendo *Arthrobacter globiformis* (Conn 1928) Conn and Dimmick 1947 a espécie típica. Microrganismos pertencentes a este grupo são amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados principalmente no solo (Funke *et al.*).

Por meio das análises comparativas por métodos de distância (fig. 45) e parcimônia (fig. 46), observa-se que as amostras 2070.04, 2070.11, 2070.12 e 2085.04 são do gênero *Arthrobacter* uma vez que pertencem ao clado formado exclusivamente por espécies de *Arthrobacter* obtidas do GB. Contudo, o clado da árvore de parcimônia (fig. 46) se apresenta colapsado e sem resolução, não sendo possível uma classificação específica das amostras apenas com base na sequência do 16S. Parte desta falta de resolução pode estar relacionada à paralogia presente ao longo do genoma do gênero *Arthrobacter*.

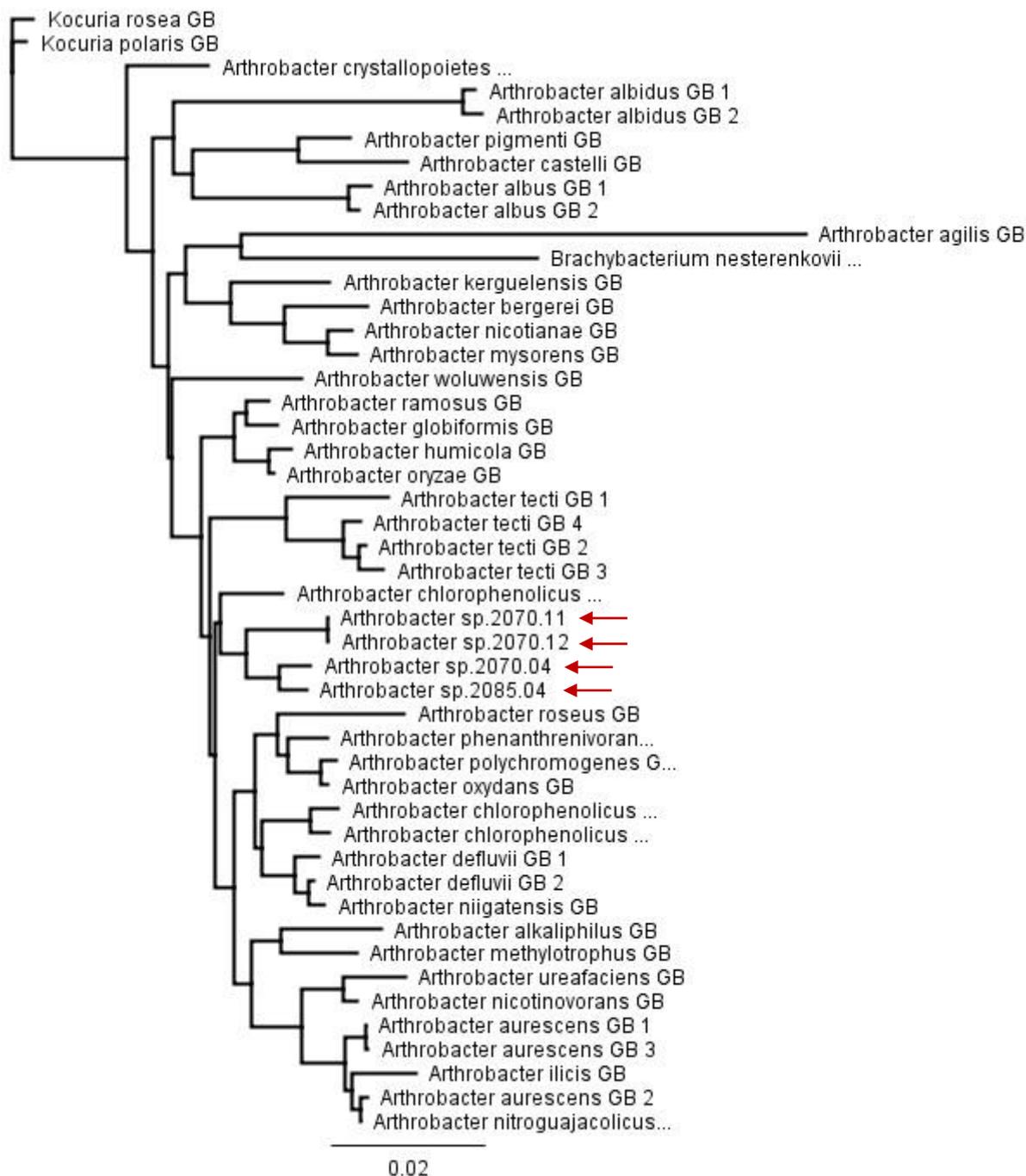


Figura 45: Árvore de distância do gênero *Arthrobacter*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. As setas indicam a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

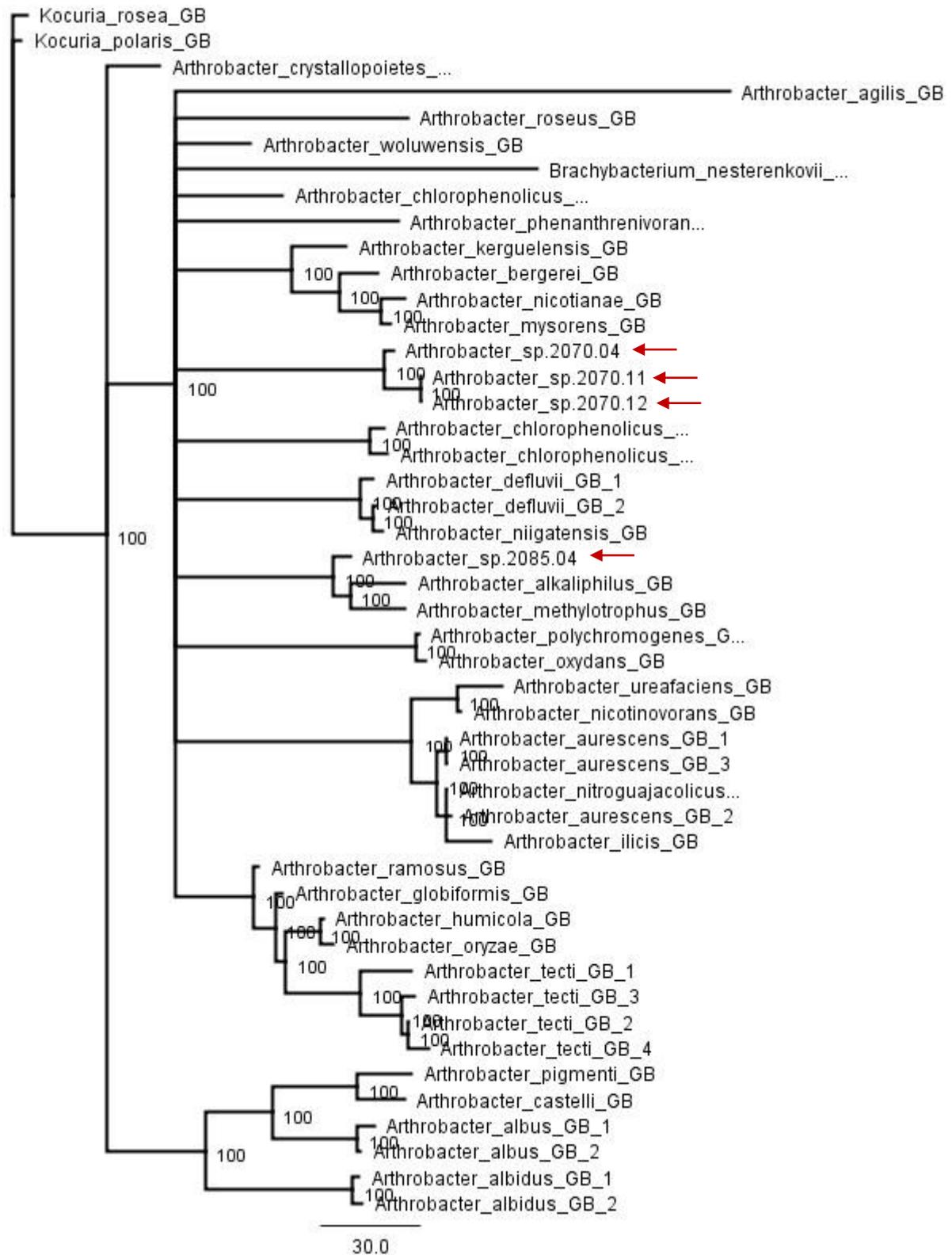


Figura 46: Consenso estrito das 21 árvores mais parcimoniosas do gênero *Arthrobacter* obtidas pela busca heurística. As setas em vermelho indicam a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.9 Moraxellaceae (Rossau *et al.*, 1991)

A família Moraxellaceae possui 3 gêneros e seus microrganismos são Gram negativos, aeróbios e mesófilos (Koneman *et al.*, 2008). O gênero típico é *Moraxella* Lwoff 1939 o qual possui ca. 22 espécies, sendo *Moraxella lacunata* (Eyre 1900) Lwoff 1939 a espécie típica (LBSN).

O gênero *Acinetobacter* (Brisou and Prévot 1954) compõe esta família e é formado por 28 espécies, sendo *Acinetobacter calcoaceticus* (Beijerinck 1911) Baumann *et al.* 1968 a espécie típica (LBSN). Os microrganismos deste gênero são cocobacilos Gram negativos, imóveis e oxidase-negativos (Koneman *et al.*, 2008) e está representado neste trabalho com as amostras 2070.02, 2070.05, 2086.09, 2114.11, 2114.15, 2118.01 e 2246.01

Por meio das análise de parcimônia (fig. 48), observa-se que as bactérias 2086.09, 2070.05, 2070.02, 2118.01, 2114.11 e 2246.01 se integram ao clado das espécies do GB *Acinetobacter calcoaceticus* em Associação Direta Parafilética. Por sua vez, a amostra 2114.15 insere-se em um clado mal definido, constituído por espécies distintas e não monofiléticas, como pode ser visto na figura 48.

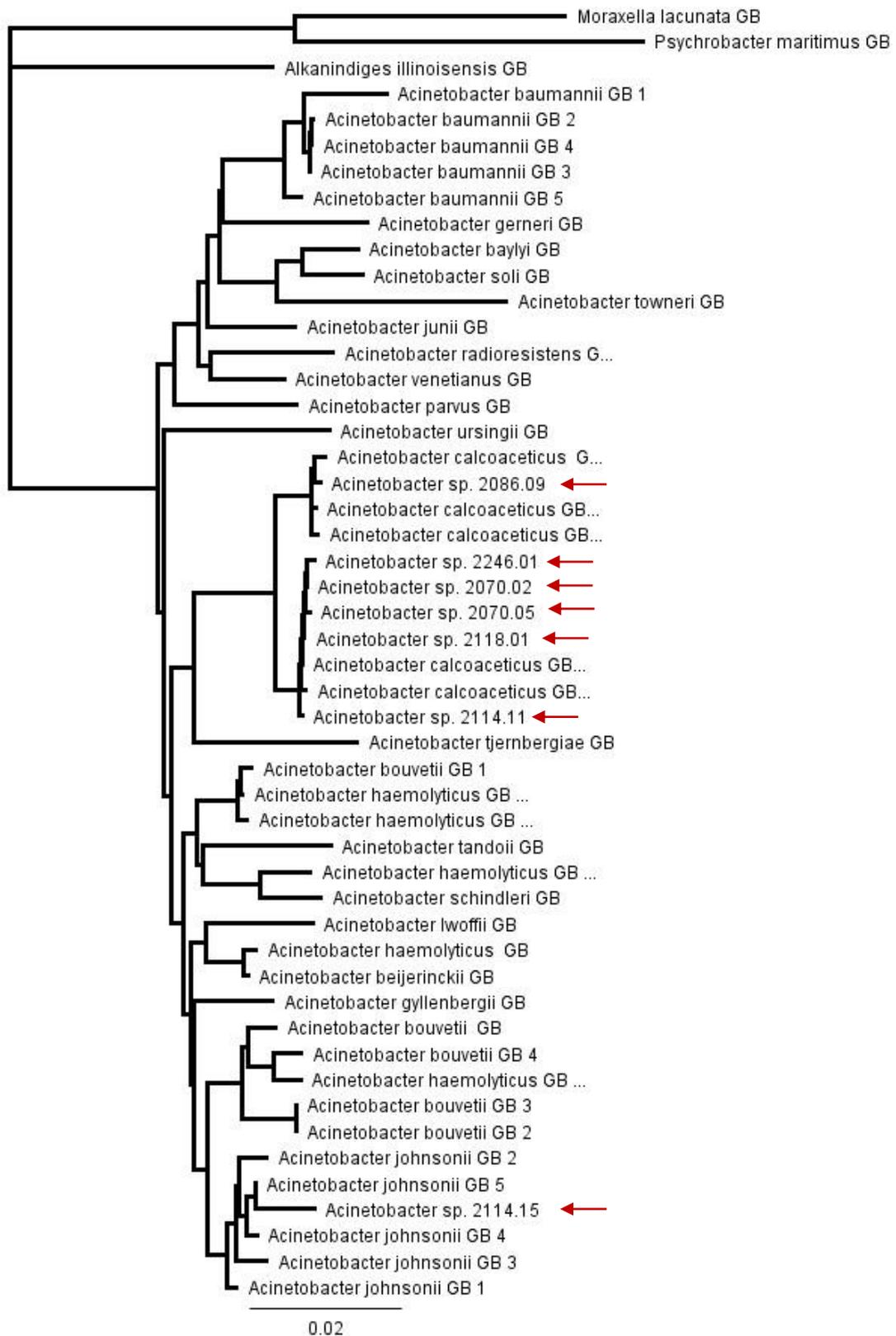


Figura 47: Árvore de distância do gênero *Acinetobacter*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. As setas indicam a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

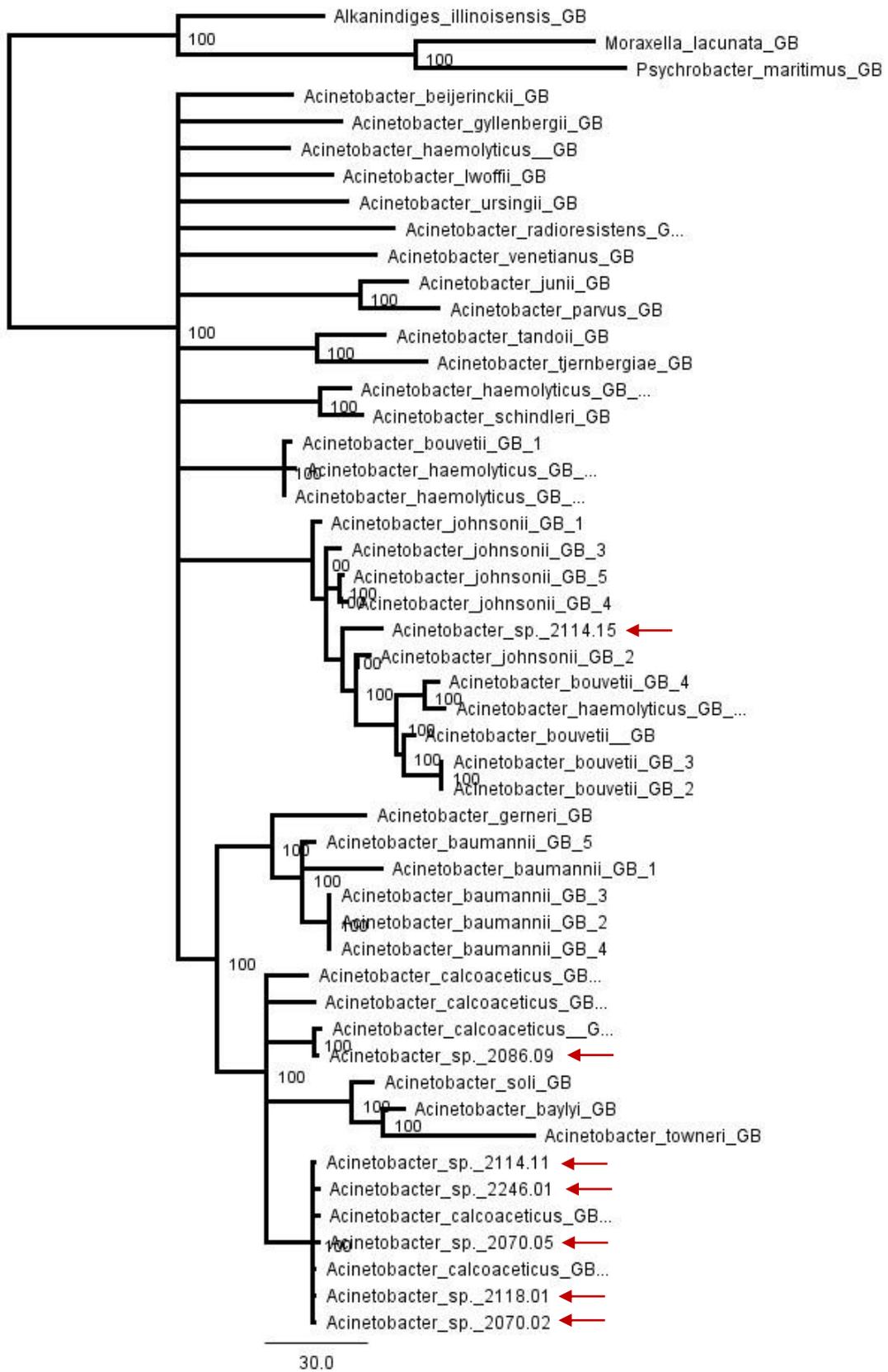


Figura 48: Consenso estrito das 20 árvores mais parcimoniosas do gênero *Acinetobacter* obtidas pela busca heurística. As setas em vermelho indicam a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.10 Planococcaceae (Krasil'nikov 1949)

A família Planococcaceae é constituída de 12 gêneros, sendo *Planococcus* (Migula 1894) o gênero típico (LBSN). Os microrganismos deste grupo consistem em cocos Gram positivos, com presença de flagelo em sua extremidade (Yoon *et al.*, 2003).

Das 154 amostras isoladas, 2 foram sinalizadas pertencentes a esta família, gênero *Kurthia* (Trevisan 1885), o qual é constituído por 3 espécies, sendo *Kurthia zopfii* (Kurth 1883) Trevisan 1885 a espécie típica. Os indivíduos deste gênero são Gram positivos, apresentam mobilidade por meio de peritríquios e não formam esporos (Belikova *et al.*, 1986).

De acordo com a análise de distância (fig. 49), as amostras 2103.25 e 2103.26 apresentam sequências similares, representando, portanto um mesmo microrganismo. Este, em ambas as análises (Fig. 49 e 50), pertence ao clado do gênero *Kurthia*, porém entre as espécies *K. sibirica* e *K. Zopfii* – *K. gibsonii* obtidas do GB, em uma Posição Isolada representando uma nova espécie para este gênero.

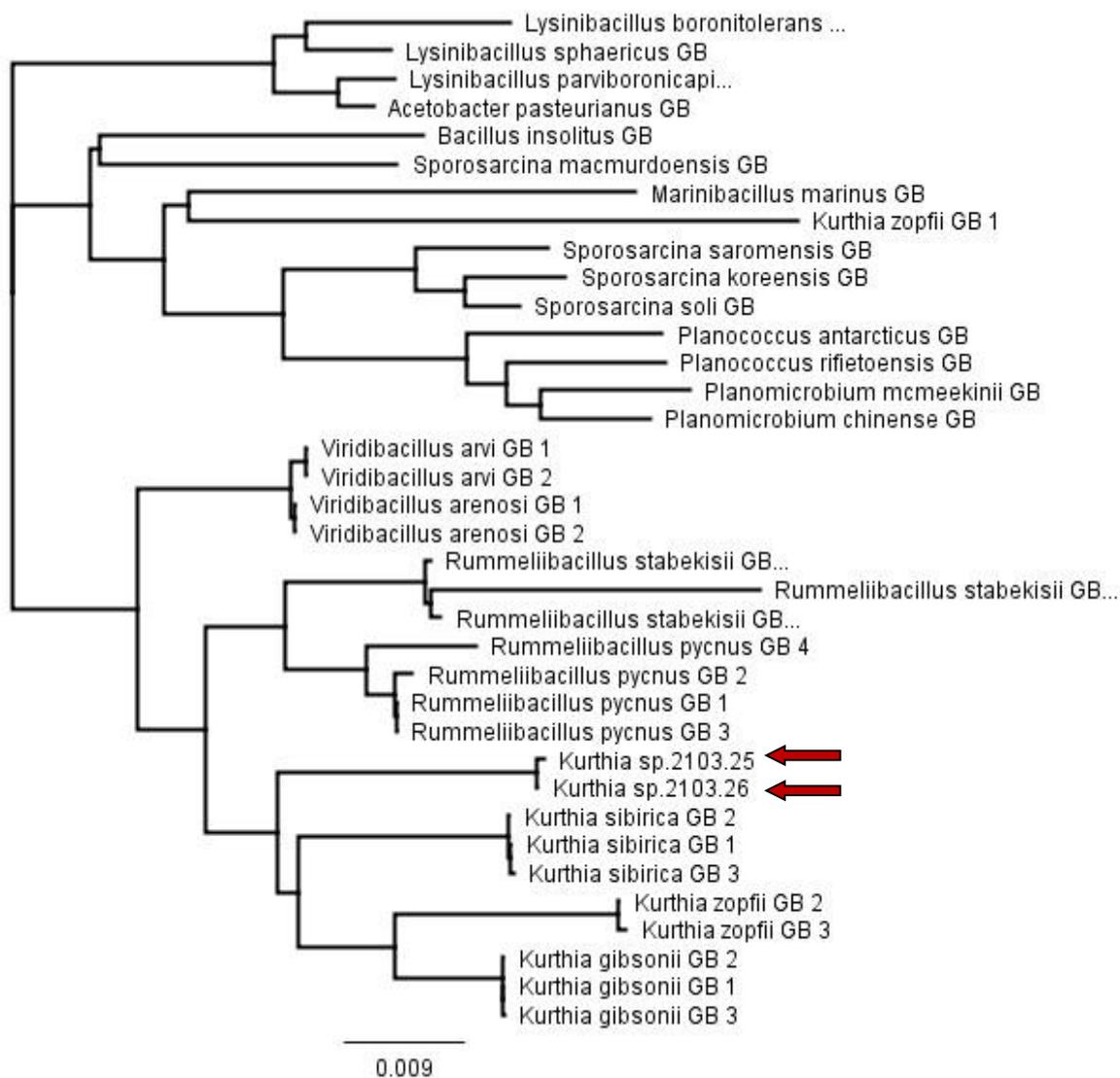


Figura 49: Árvore de distância do gênero *Kurthia*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. A seta indica a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

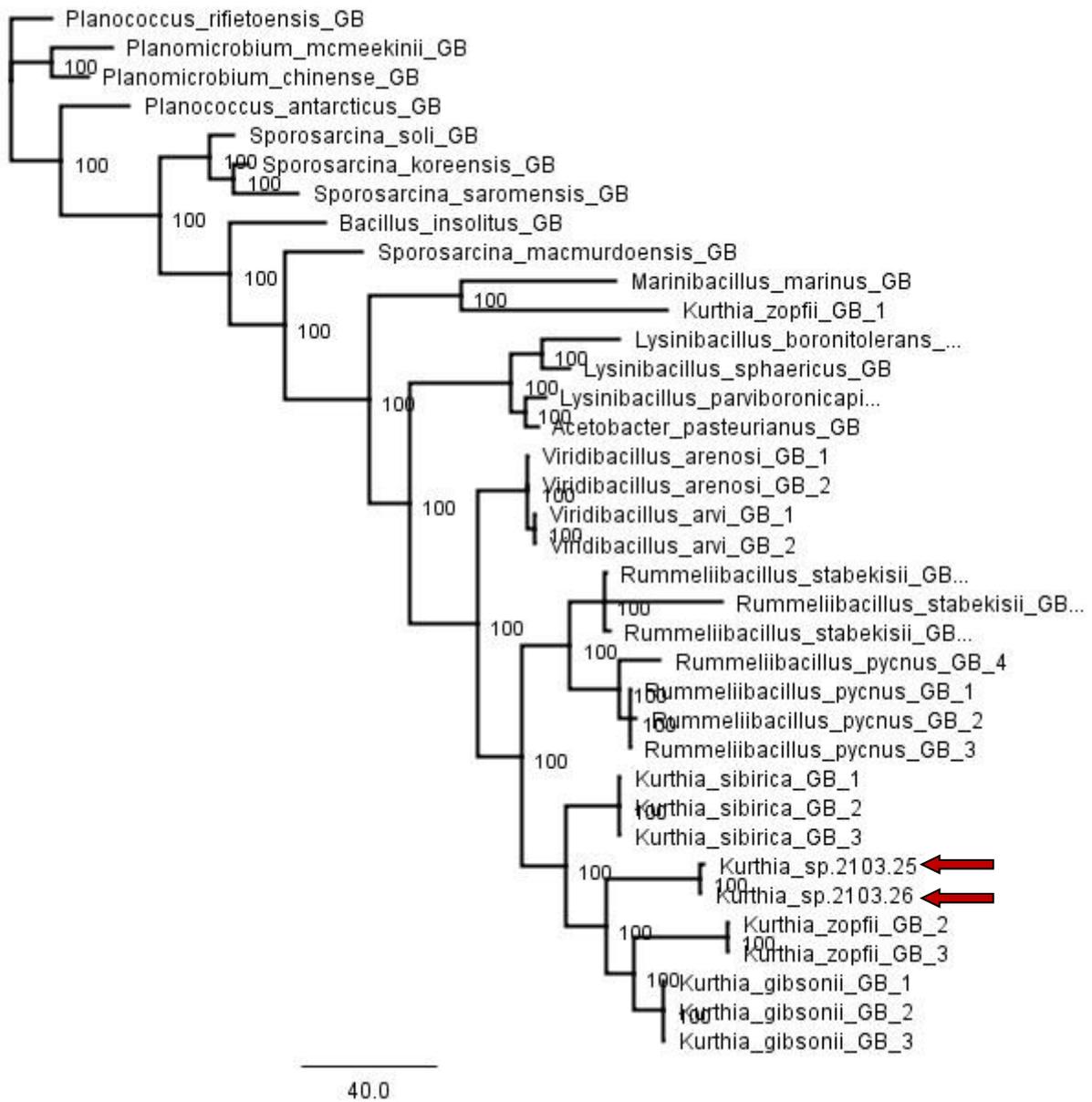


Figura 50: Consenso estrito das 3 árvores mais parcimoniosas do gênero *Kurthia* obtidas pela busca heurística. A seta em vermelho indica a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.11 Pseudomonadaceae (Winslow *et al.* 1917)

A família Pseudomonadaceae possui 12 gêneros, sendo *Pseudomonas* (Migula 1894) o gênero típico (LBSN), o qual possui microrganismos Gram negativos, não esporulados e com flagelos polares (Koneman *et al.*, 2008).

Do total das amostras isoladas, 7 foram identificadas como *Pseudomonas*, o qual é formado por 204 espécies e 18 subespécies, sendo *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 a espécie típica (LBSN). Representando este grupo estão as amostras 2114.03, 2114.17, 2114.18, 2117.01, 2117.06, 2117.10 e 2117.19.

Por meio da análise comparativa por métodos de parcimônia (fig. 52), observa-se que as amostras 2114.17 e 2117.19 se encontram em Associação Direta Parafilética com as espécies de *P. mosselii* do GB e 2117.10 está em Associação Direta Monofilética com *P. aeruginosa*, obtidas do GB. Por sua vez, as bactérias 2114.03, 2114.08, 2117.01 e 2117.06, se apresentam em clados colapsados e com baixa resolução, não sendo possível uma classificação específica destas amostras apenas com base na sequência do 16S. Parte desta falta de resolução pode estar relacionada à paralogia presente ao longo do genoma do gênero *Pseudomonas*.

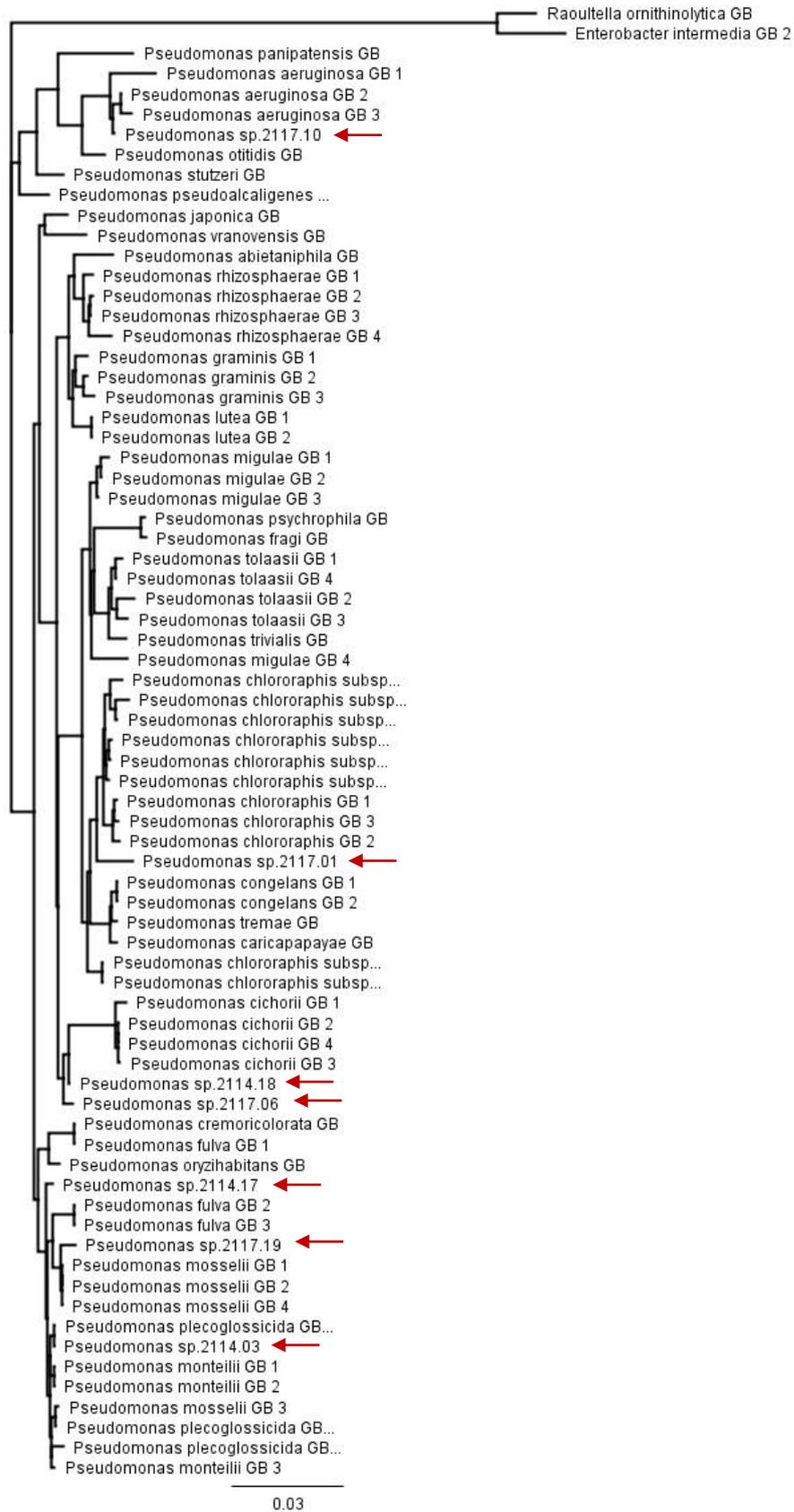


Figura 51: Árvore de distância do gênero *Pseudomonas*. As setas indicam a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

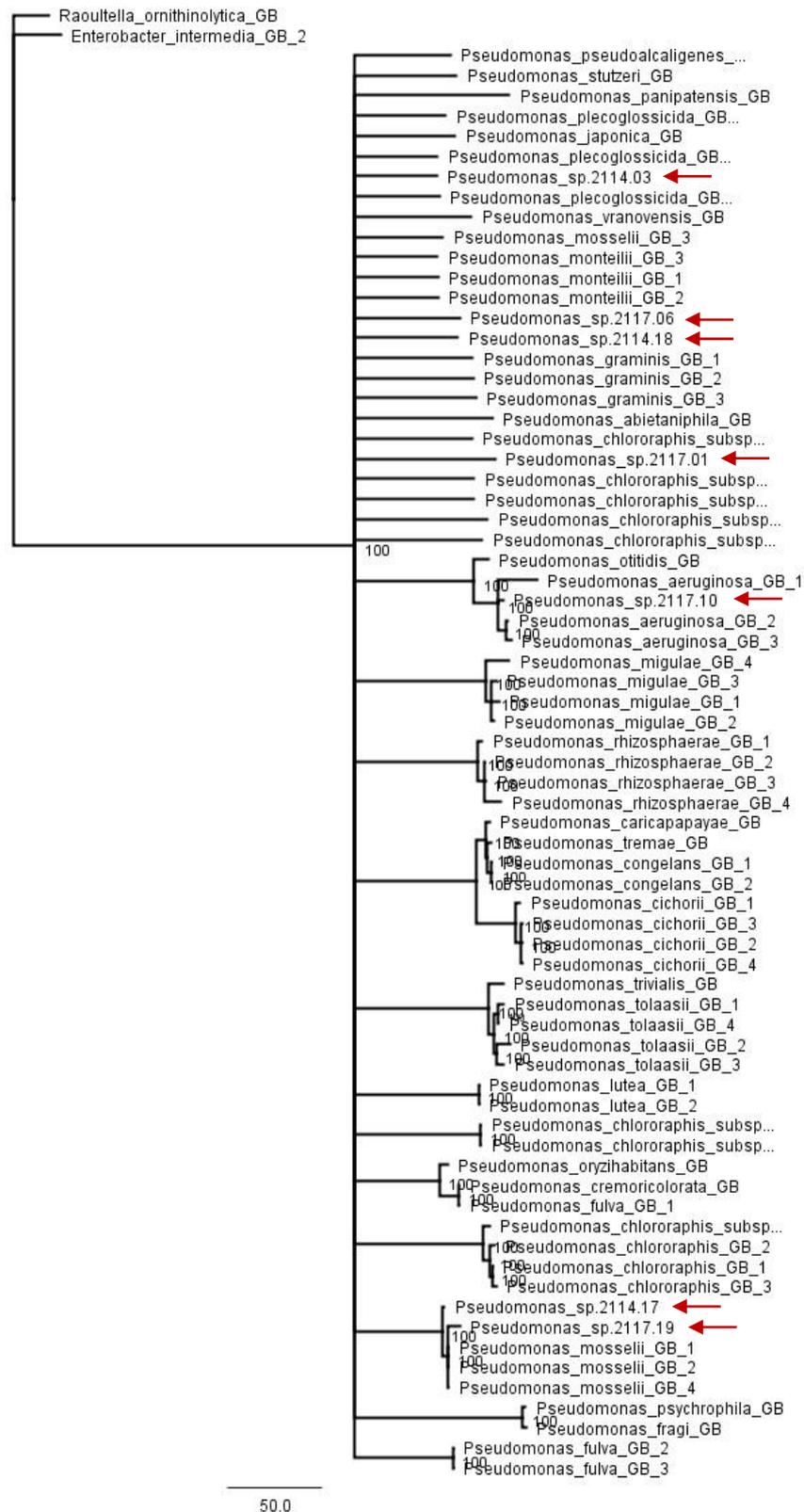


Figura 52: Consenso estrito das 40 árvores mais parcimoniosas do gênero *Pseudomonas* obtidas pela busca heurística. As setas em vermelho indicam a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.12 Staphylococcaceae (Schleifer and Bell 2010)

A família Staphylococcaceae é composta por 5 gêneros sendo *Staphylococcus* (Rosenbach 1884) o gênero típico. Este gênero é composto por 47 espécies e 24 subespécies tendo como espécie típica *Staphylococcus aureus* (Rosenbach 1884) (LBSN). É formado por cocos Gram-positivos, imóveis, não formadores de esporos e ocorrem isolados, em pares, em cadeias curtas, mas principalmente em forma de cachos de uva (Koneman *et al.*, 2008).

Representando este grupo está a amostra 2086.12, a qual foi identificada como *Staphylococcus*, com base no 16S. Nas análises de distância (fig. 53) e parcimônia (fig. 54), este Microrganismo aparece em Associação Direta Monofilética com *S. warneri* (Kloos and Schleifer 1975) obtidas no GB em um clado com elevada resolução.

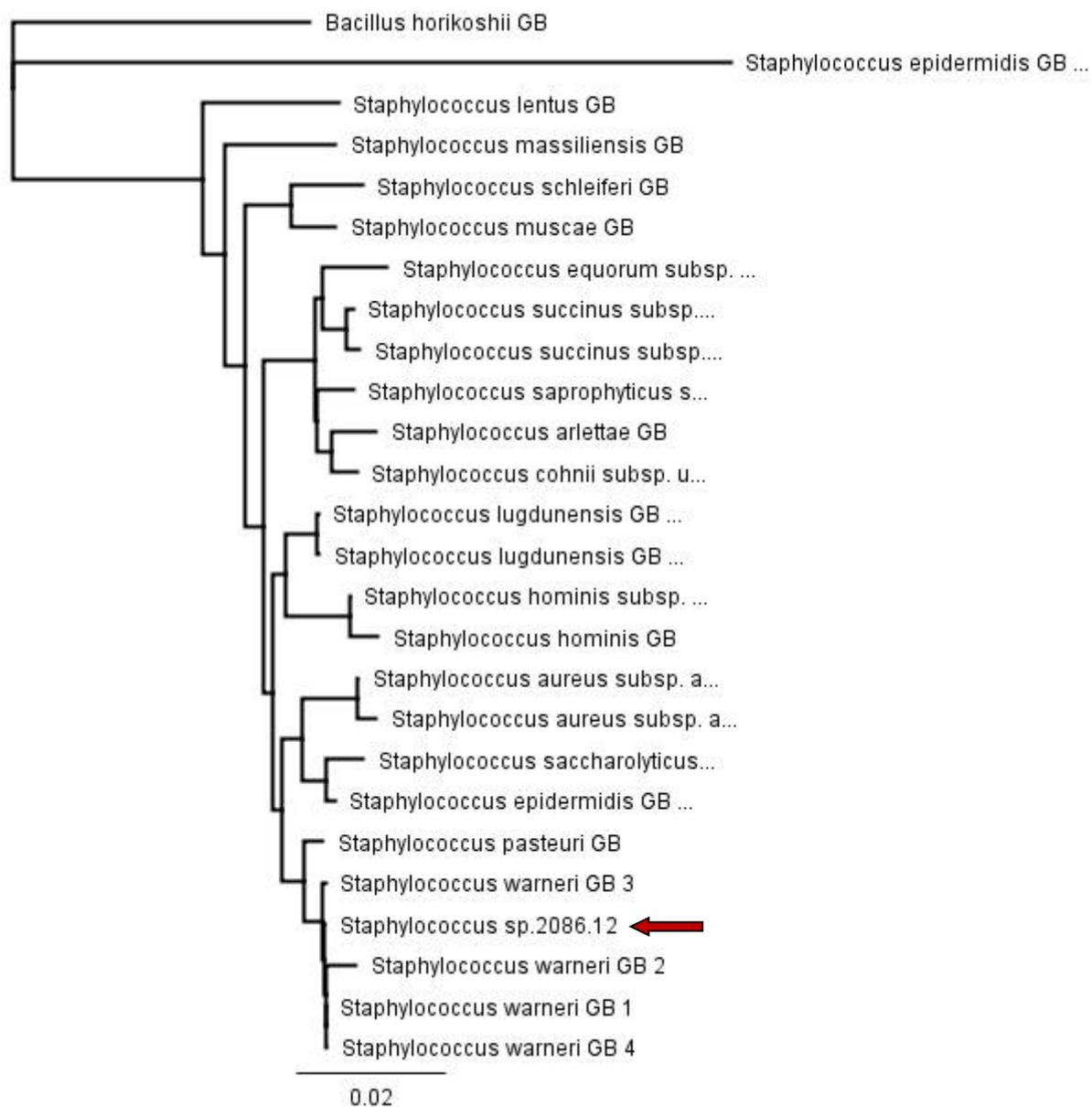


Figura 53: Árvore de distância do gênero *Staphylococcus*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. A seta indica a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

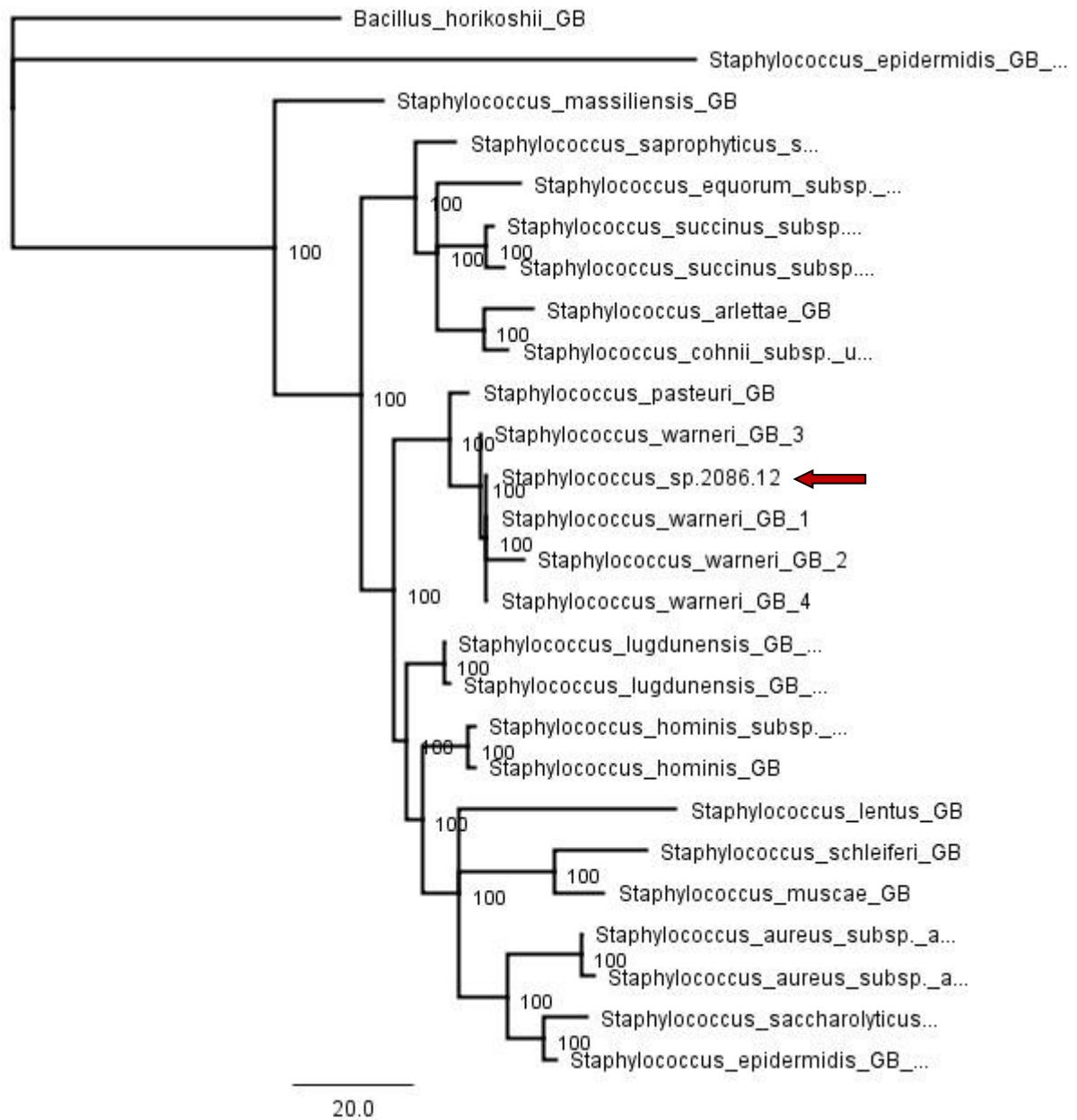


Figura 54: Consenso estrito das 52 árvores mais parcimoniosas do gênero *Staphylococcus* obtidas pela busca heurística. A seta em vermelho indica a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.13 Streptococcaceae (Deibel and Seeley 1974)

A família Streptococcaceae é composta por 3 gêneros sendo *Streptococcus* (Rosenbach 1884) o gênero típico. Os microrganismos deste grupo são cocos Gram positivos, imóveis, não formadores de esporos e ocorrem isolados, em pares, em cadeias curtas ou longas (Koneman *et al.*, 2008).

Representando este grupo estão as amostras 2086.37, 2086.38, 2086.39, 2086.41, 2086.42 e 2086.43, as quais foram identificadas como *Lactococcus* (Schleifer *et al.* 1986), com base no 16S. Nas análises de distância (fig. 55) e parcimônia (fig. 56), os microrganismos 2086.43 e 2086.41 se integraram em Associação Direta Monofilética ao clado das espécies obtidas do GB *L. lactis* (*ex* Latorre-Guzman *et al.* 1977) Schleifer *et al.* 1986, enquanto que 2086.39, 2086.38, 2086.37 e 2086.42 apresenta-se em Associação Direta Monofilética com as espécies *L. garvieae* (Collins *et al.* 1984) Schleifer *et al.* 1986, em um clado com elevada resolução.

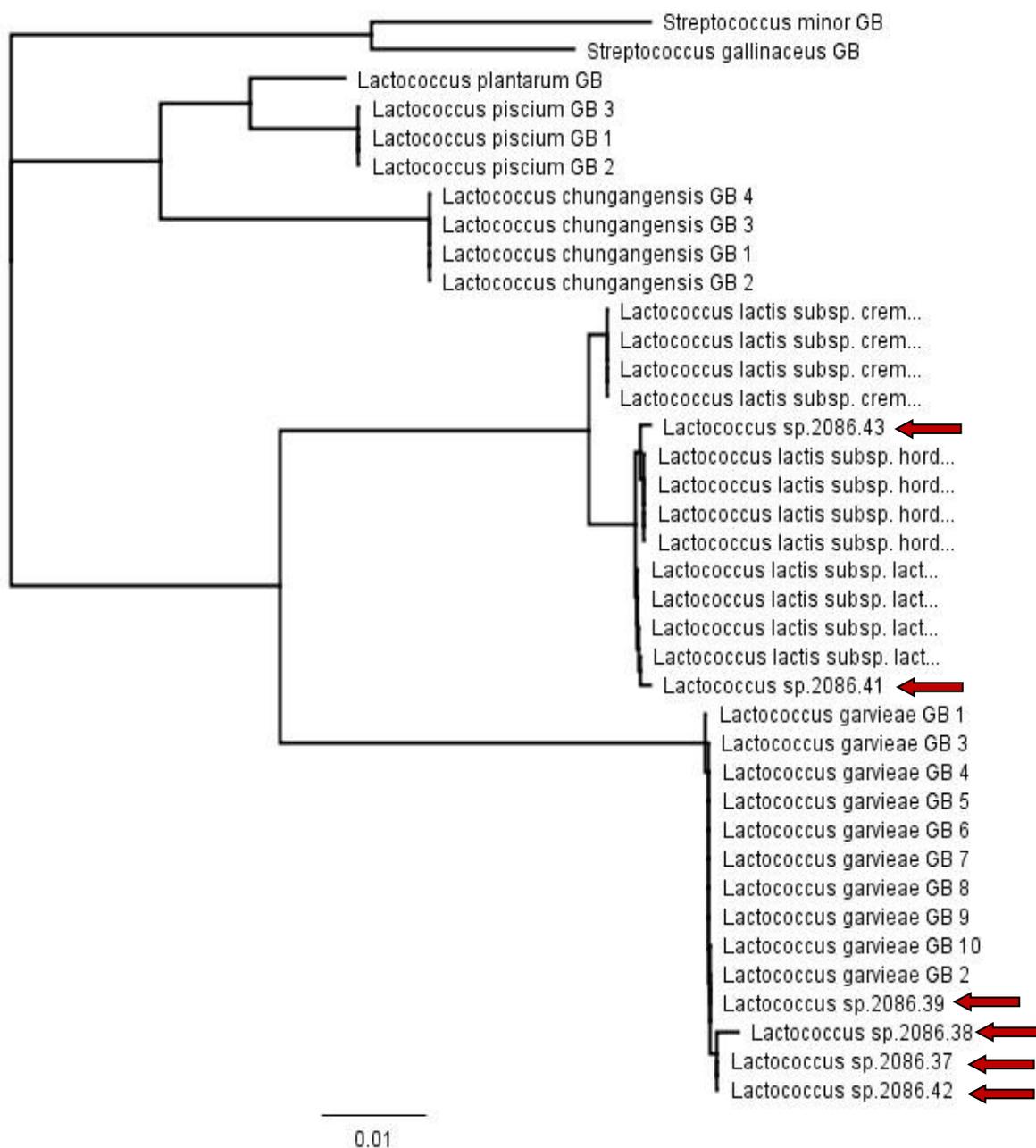


Figura 55: Árvore de distância do gênero *Lactococcus*, pelo método de distância Neighbor-Joining baseado no modelo Tamura-Nei. As setas indicam a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

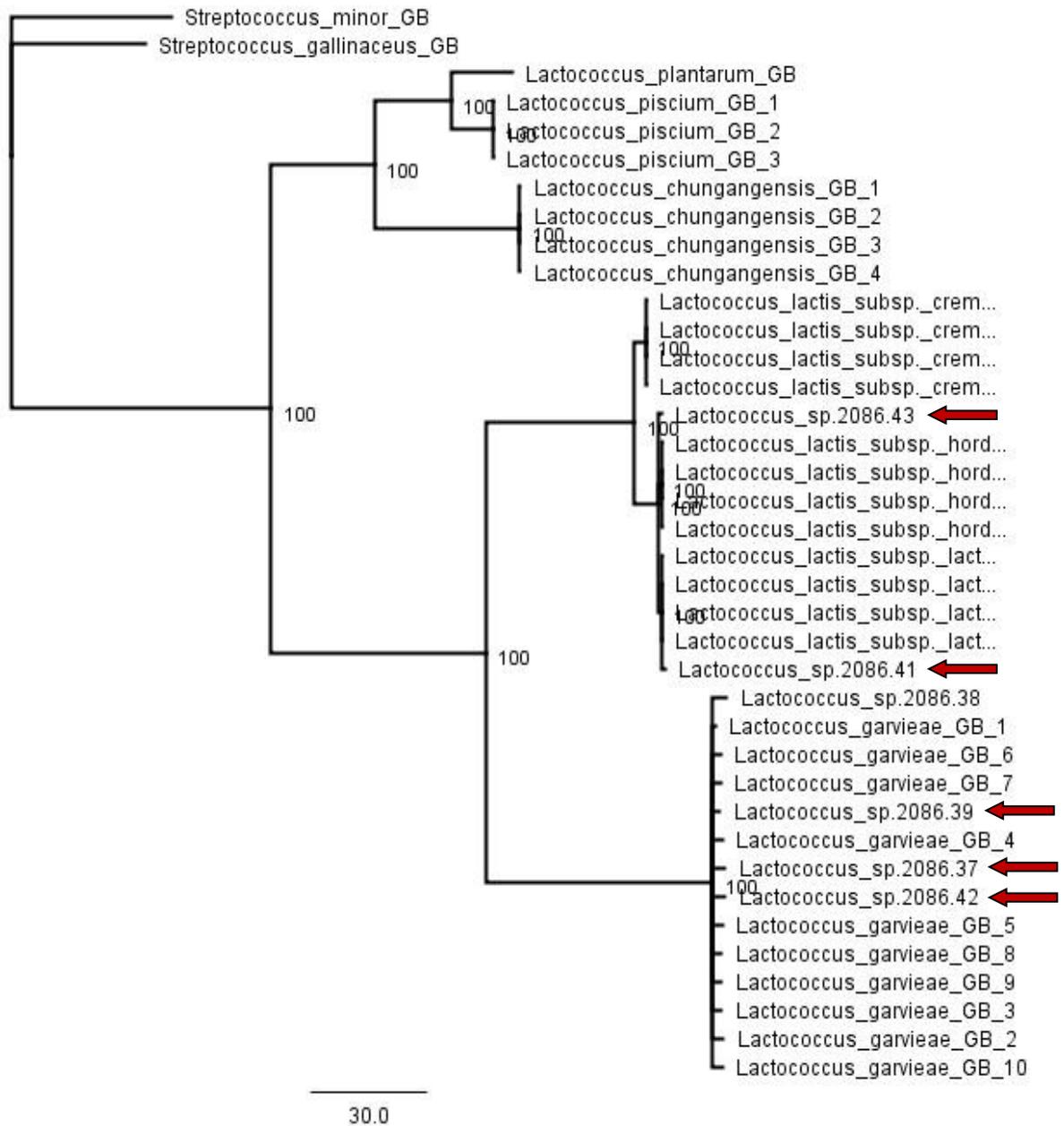


Figura 56: Consenso estrito das 80 árvores mais parcimoniosas do gênero *Lactococcus* obtidas pela busca heurística. As setas em vermelho indicam a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.5.14 Xanthomonadaceae (Saddler and Bradbury 2005)

A família Xanthomonadaceae é formada por 22 gêneros sendo *Xanthomonas* (Dowson 1939) o gênero típico (LBSN).

Neste trabalho foi identificado microrganismos do gênero *Stenotrophomonas* (Palleroni and Bradbury 1993). Este é constituído por 13 espécies sendo *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993 a espécie típica. As bactérias deste gênero são bacilos Gram negativas, comumente encontradas em solo e com flagelos polares multitríquios (Koneman *et al.*, 2008).

Representando este gênero estão os isolados 2103.18 e 2117.08. Nas análises de distância (fig. 57) e parcimônia (fig. 58), estes microrganismos aparecem em um clado com elevada resolução e em Associação Direta Parafilética com *S. pavanii* e *S. maltophilia*, sendo este último um grupo mal definido, se apresentando em clados diversos.

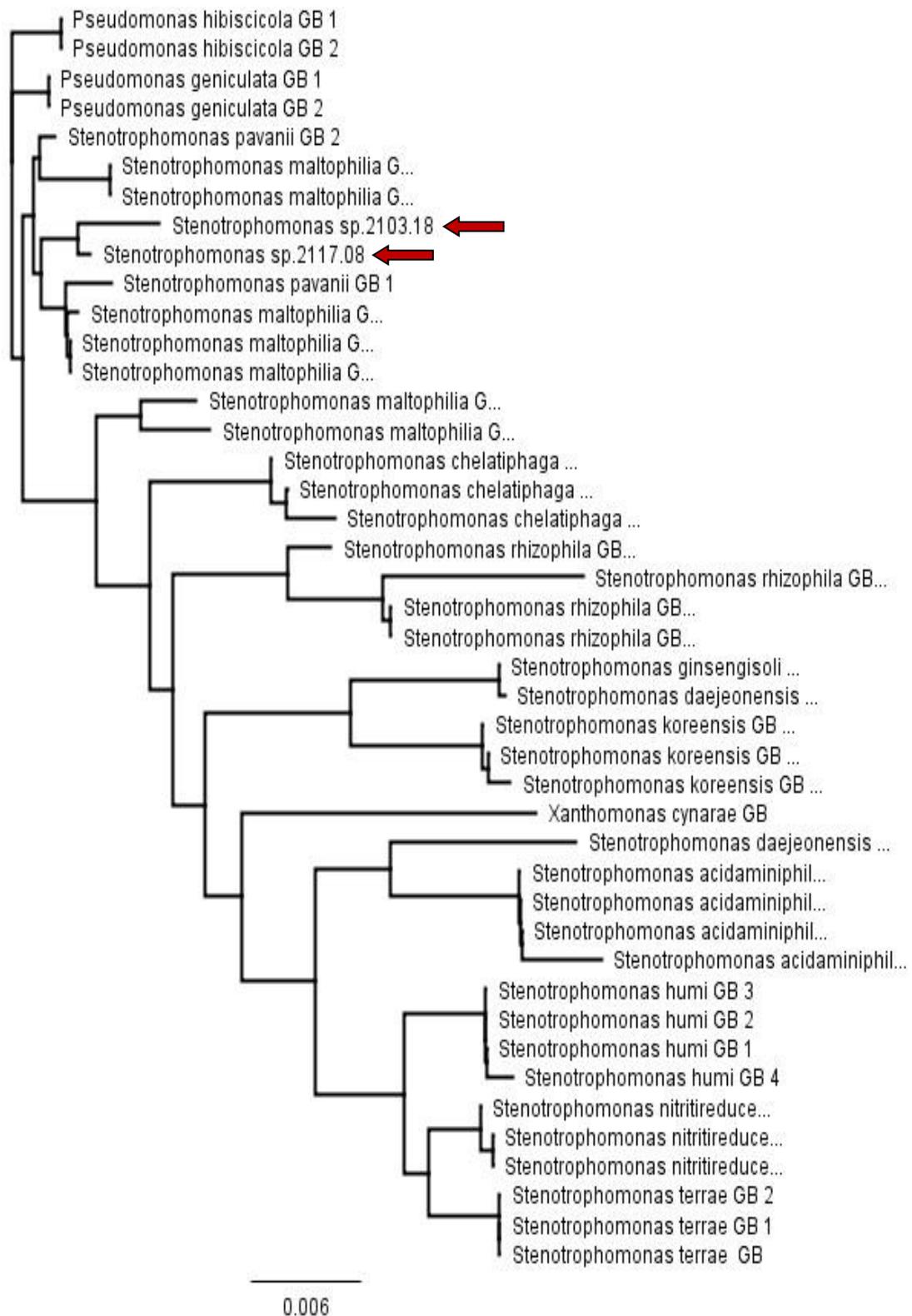


Figura 57: Árvore de distância do gênero *Stenotrophomonas*. As setas indicam a localização da amostra deste trabalho inserida entre as baixadas do NCBI.

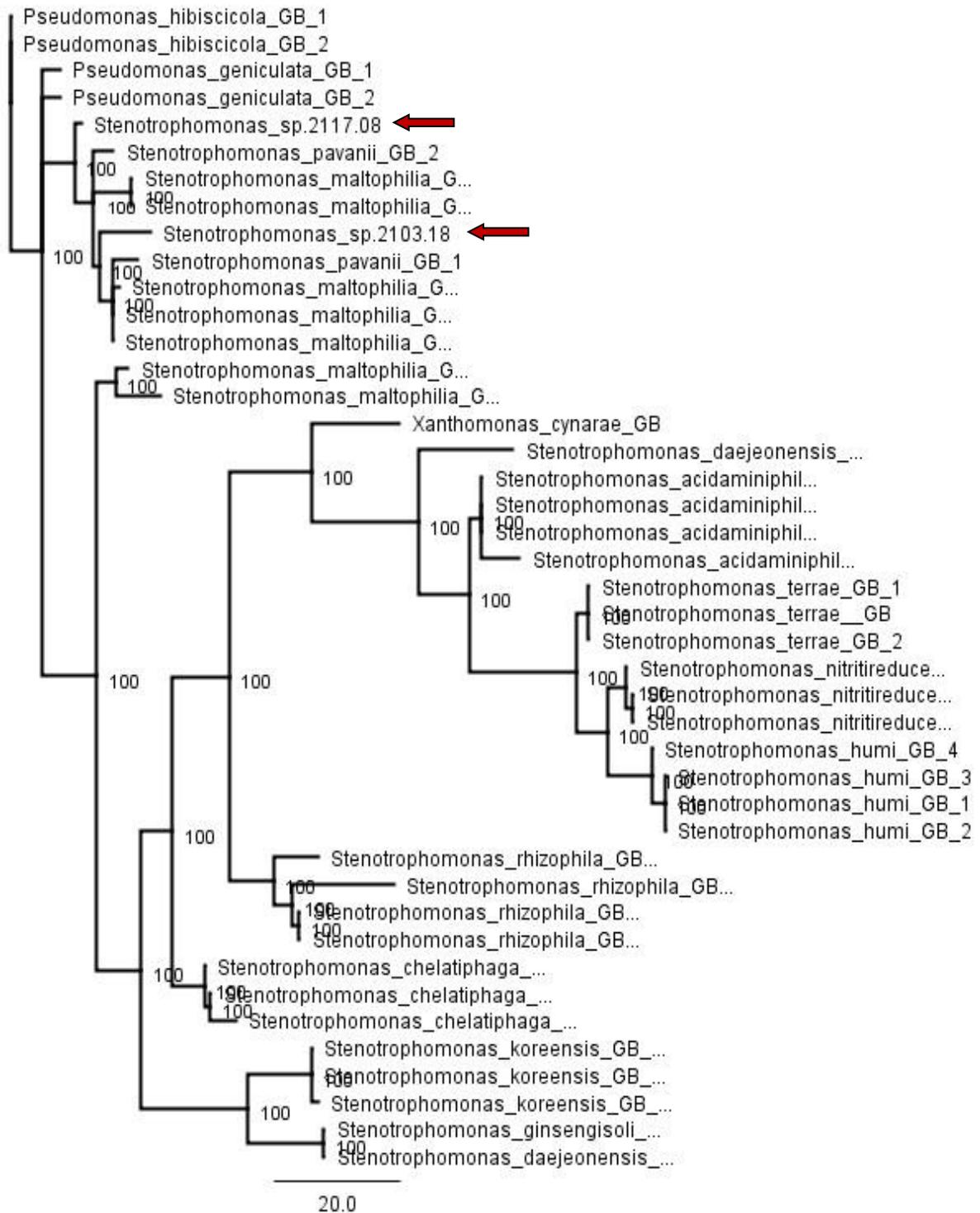


Figura 58: Consenso estrito das 40 árvores mais parcimoniosas do gênero *Stenotrophomonas* obtidas pela busca heurística. As setas em vermelho indicam a localização das amostras deste trabalho inserida entre as amostras baixadas do NCBI.

5.6 CRESCIMENTO INIBITÓRIO MÍNIMO EM CHUMBO E CÁDMIO

O nível de contaminação por cádmio e principalmente chumbo no solo de Santo Amaro não se encontra de forma homogênea ao longo das antigas instalações da Plumbum Mineradora, aumentando à medida que se aproxima da chaminé da antiga fábrica (Anjos 2003).

Neste solo, foram isolados microrganismos, a fim de se avaliar o grau de contaminação a que estes organismos são tolerantes através do ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM). O comportamento de alguns microrganismos isolados em metais de chumbo e cádmio se encontra em fotografias no anexo deste trabalho (fig. 59 – 86).

5.6.1 Aeromonadaceae

As espécies *Aeromonas* sp.1 (2103.16) e *Aeromonas* sp.2 (2086.31) em meio contendo chumbo apresentaram CIM de 1400 e 1050 µg/mL, respectivamente (tabela 04). Quanto ao cádmio, *Aeromonas* sp.1 (2103.16) apresentou CIM de 800 enquanto que a outra cepa não cresceu em controle negativo (tabela 04). Por sua vez, *Aeromonas* sp.2 (2086.33) não cresceu durante os testes em chumbo e cádmio (tabela 04).

O comportamento destas espécies pode ser visualizado em figuras (59 – 86) no anexo, seguindo tabela de orientação que os antecede.

Tabela 04: Concentração Inibitória Mínima (CIM) das espécies de *Aeromonas* em chumbo e cádmio. *Não houve crescimento da bactéria durante os testes.

Espécies de bactérias	Identificação das espécies em fotos no anexo	Planta de origem	CIM chumbo (µg/mL)	CIM cádmio (µg/mL)
<i>Aeromonas</i> sp.1 (2103.16)	9ou6.3	Scrophulariaceae	1400	800
<i>Aeromonas</i> sp.2 (2086.31)	H02	<i>Ipomoea asarifolia</i> Roem. & Schult. (Convolvulaceae)	1050	*

<i>Aeromonas</i> sp.2 (2086.33)	H05	<i>Ipomoea asarifolia</i> Roem. & Schult. (Convolvulaceae)	*	*
------------------------------------	-----	--	---	---

5.6.2 Bacillaceae (*Bacillus*, *Exiguobacterium* e *Lysinibacillus*)

Os isolados pertencentes à família Bacillaceae somam 41 indivíduos de cuja CIM está indicado na tabela 05, na qual observa-se que a maioria dos indivíduos pertencentes a esta família apresentou resistência a ambos os metais, porém são mais susceptíveis ao cádmio. Apenas, dois indivíduos não apresentaram crescimento em meio contendo chumbo (*Bacillus* Grupo *subtilis* (2085.06); *Lysinibacillus fusiformis* (2118.10)); em cádmio *Bacillus* Grupo *subtilis* (2070.01) não cresceu e outros dois não cresceram em nenhum dos metais testados (*B. Grupo subtilis* (2070.20); *Bacillus* Grupo *cereus* (2086.19)) (tabela 05).

Espécies como *B. Grupo cereus* (2070.06) e *B. Grupo subtilis* (2070.08), além da resistência elevada aos metais de chumbo e cádmio, apresentaram alterações na forma e cor da colônia, destacando-se o tom vivo da colônia apresentado pelo *B. Grupo cereus* (2070.06) em concentração de 1050µg/mL de chumbo (fig. 84 – XXIV, anexo). Estas alterações fenotípicas ocorreram em resposta ao aumento de, principalmente, metais de chumbo no meio de cultura.

O comportamento destas espécies pode ser visualizado nas figuras 59 – 86 do anexo, seguindo tabela de orientação que os antecede.

Tabela 05: CIM das espécies de *Bacillus*, *Exiguobacterium* e *Lysinibacillus* em chumbo e cádmio. *Não houve crescimento da bactéria durante os testes.

Espécies de bactérias	Identificação das espécies em foto no anexo	Plantas de origem	CIM chumbo (µg/mL)	CIM cádmio (µg/mL)
<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2070.10)	A19	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1600	50
<i>B. Grupo subtilis</i> (2070.20)	A31	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	*	*
<i>B. Grupo subtilis</i> (2085.02)	B15	<i>Ricinus comunis</i> L. (Euphorbiaceae)	1400	100
<i>B. Grupo subtilis</i>	A01	<i>Cecropia pachystachya</i>	1050	*

(2070.01)		Trécul (Moraceae)		
B. Grupo subtilis (2070.08)	A13	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1050	50
B. Grupo subtilis (2085.06)	B19	<i>Ricinus comunis</i> L. (Euphorbiaceae)	*	50
B. Grupo subtilis (2086.04)	A18	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1050	50
Bacillus nealsonii (2086.10)	B03	<i>Ricinus comunis</i> L. (Euphorbiaceae)	1050	400
B. nealsonii (2114.06)	C04	Poaceae	1050	50
Bacillus Grupo cereus (2086.25)	D14	<i>Psidium guajava</i> L. (Myrtaceae)	1400	800
B. Grupo cereus (2114.01)	A03	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1400	100
B. Grupo cereus (2117.22)	Lud03	<i>Ludwigia</i> sp. (Onagraceae)	1400	200
B. Grupo cereus (2103.32)	D13	<i>Psidium guajava</i> L. (Myrtaceae)	1400	800
B. Grupo cereus (2086.19)	D04	<i>Psidium guajava</i> L. (Myrtaceae)	*	*
B. Grupo cereus (2086.21)	D07	<i>Psidium guajava</i> L. (Myrtaceae)	1400	200
B. Grupo cereus (2086.13)	B06	<i>Ricinus comunis</i> L. (Euphorbiaceae)	1400	400
B. Grupo cereus (2086.22)	D09	<i>Psidium guajava</i> L. (Myrtaceae)	< 3,2	100
B. Grupo cereus (2103.30)	3737.8	<i>Croton</i> sp. (Euphorbiaceae)	800	< 3,2
B. Grupo cereus (2085.10)	RUB01	Rubiaceae	1400	200
B. Grupo cereus (2118.09)	HP03	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.)Kuntze (Lamiaceae)	1400	200
B. Grupo cereus (2118.08)	HP02	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.)Kuntze (Lamiaceae)	1400	200
B. Grupo cereus (2114.21)	3738.4	<i>Hyptis</i> sp. (Lamiaceae)	1400	200
B. Grupo cereus	A10	<i>Cecropia pachystachya</i>	1400	100

(2070.06)		Trécul (Moraceae)		
B. Grupo cereus (2070.15)	A23	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1400	100
<i>Exiguobacterium acetylicum-indicum</i> (2085.01)	B11	<i>Ricinus comunis</i> L. (Euphorbiaceae)	1400	100
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (2085.11)	RUB02	<i>Borreria</i> sp. (Rubiaceae)	1050	100
<i>L. fusiformis</i> (2114.09)	D20	<i>Psidium guajava</i> L. (Myrtaceae)	1050	100
<i>L. fusiformis</i> (2086.18)	D02	<i>Psidium guajava</i> L. (Myrtaceae)	1400	200
<i>L. fusiformis</i> (2118.10)	HP04	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.)Kuntze (Lamiaceae)	*	100
<i>L. fusiformis</i> (2120.02)	PIP02	<i>Peperomia pellucida</i> (L.) Kunth (Piperaceae)	1400	100
<i>Lysinibacillus macroides-boronitolerans</i> (2114.12)	Po01	Poaceae	1050	200
<i>L. macroides-boronitolerans</i> (2114.13)	Po02	Poaceae	1050	200
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> (2117.13)	3741.1	Asteraceae	1050	50
<i>L. sphaericus</i> (2117.20)	LUD01	<i>Ludwigia</i> sp. (Onagraceae)	1050	50
<i>L. sphaericus</i> (2117.21)	LUD02	<i>Ludwigia</i> sp. (Onagraceae)	1050	50
<i>L. sphaericus</i> (2117.24)	STA04	<i>Stachytarpheta</i> sp. (Verbenaceae)	1050	100
<i>L. sphaericus</i> (2085.12)	MCID01	<i>Sida</i> L. (Malvaceae)	1050	50
<i>L. sphaericus</i> (2118.12)	MCID02	<i>Sida</i> L. (Malvaceae)	1050	50

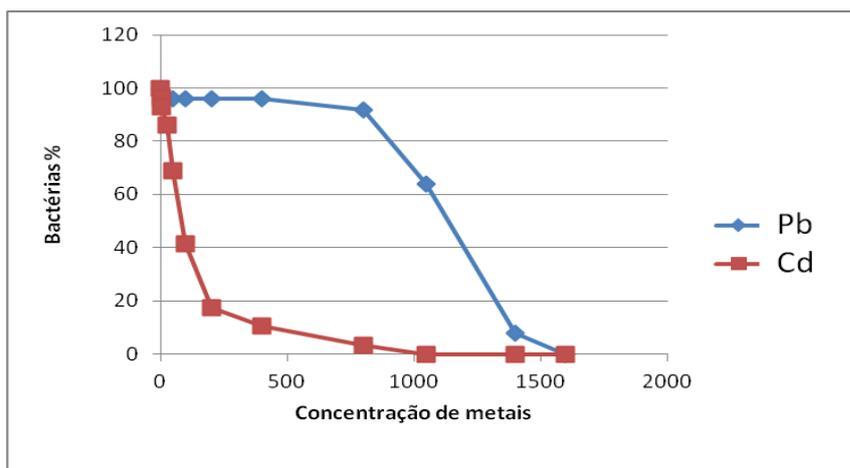


Figura 87: Crescimento de bactérias da família Bacillaceae em meios contendo diferentes concentrações de chumbo (gráfico azul) e cádmio (gráfico vermelho).

5.6.3 Brucellaceae

A espécie obtida neste trabalho *Pseudochrobactrum saccharolyticum/asaccharolyticum* (2117.05) apresentou resistência a ambos os metais pesados testados, com CIM em chumbo de 1400µg/mL e em cádmio de 100µg/mL (tabela 06).

O comportamento destas espécies pode ser visualizado em figuras (59 – 86) no anexo, seguindo tabela de orientação que os antecede.

Tabela 06: CIM da espécie de *Pseudochrobactrum* em chumbo e cádmio.

Espécies de bactérias	Identificação das espécies em fotos no anexo	Planta de origem	CIM chumbo (µg/mL)	CIM cádmio (µg/mL)
<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum-asaccharolyticum</i> (2117.05)	3736.1	Asteraceae	1400	100

5.6.4 Comamonadaceae

A espécie obtida neste trabalho *Comamonas testosteroni* (2117.16) não cresceu durante os testes com os metais pesados de chumbo e cádmio (tabela 07).

O comportamento destas espécies pode ser visualizado em figuras (59 – 86) no anexo, seguindo tabela de orientação que os antecede.

Tabela 07: *Não houve crescimento da espécie *Comamonas testosteroni* 2117.16 em cádmio e chumbo durante os testes.

Espécies de bactérias	Planta de origem	CIM chumbo (µg/mL)	CIM cádmio (µg/mL)
<i>Comamonas testosteroni</i> (2117.16)	Asteraceae	*	*

5.6.5 Enterobacteriaceae (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Providencia* e *Serratia*)

Para a família Enterobacteriaceae foram obtidas 38 espécies, pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pantoea*, *Providencia* e *Serratia*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) destas bactérias está indicada na tabela 08 e mostrada na figura 88. No gráfico observa-se que a maioria dos microrganismos desta família apresenta resistência a ambos os metais, porém mais bem adaptados ao Pb que ao Cd. Contudo, alguns microrganismos não cresceram em chumbo (*Enterobacter kobei* (2120.04), *Serratia* sp.7 (2085.16), *Serratia* sp.3 (2117.11)) ou em cádmio (*Enterobacter* sp.2 (2114.08), *Enterobacter cancerogenus* (2086.16), *Enterobacter* sp.3 (2246.02), *Enterobacter* sp.11 (2103.23), *Enterobacter* sp.9 (2118.13), *Enterobacter* sp.12 (2114.10), *Enterobacter* sp.5 (2070.07), *Enterobacter* sp.10 (2086.14), *Enterobacter* sp.10 (2246.07), *Enterobacter* sp. nov.1 (2117.14), *Enterobacter* sp. nov.1 (2117.04), *Enterobacter* sp.2 (2085.07), *Enterobacter* sp.2 (2246.08), *Citrobacter* cf. *werkmanii* (2103.17), *Citrobacter* sp.4 (2246.04), *Citrobacter* sp.4 (2117.02), *Escherichia coli* (2103.20), *Pantoea eucrina* (2086.06), *Pantoea eucrina* (2086.08), *Pantoea eucrina* (2086.02), *Pantoea* sp.1 (2086.03), *Serratia* sp.1 (2246.05), *Serratia nematodiphila* (2246.03), *Providencia* sp.1 (2117.03), *Providencia alcalifaciens-rustigianii* (2118.07)).

O comportamento destas espécies pode ser visualizado em figuras (59 – 86) no anexo, seguindo tabela de orientação que os antecede.

Tabela 08: CIM das espécies de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia* e *Providencia* em chumbo e cádmio. *Não houve crescimento da bactéria durante os testes.

Espécies de bactérias	Identificação da espécie em foto no anexo	Plantas de origem	CIM chumbo (µg/mL)	CIM cádmio (µg/mL)
<i>Enterobacter</i> sp.1 (2114.04)	B14	<i>Ricinus comunis</i> L. (Euphorbiaceae)	1400	400
<i>Enterobacter</i> sp.2 (2086.05)	A22	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1400	200
<i>Enterobacter</i> sp.2 (2114.08)	D12	<i>Psidium guajava</i> L. (Myrtaceae)	1400	*
<i>Enterobacter</i> sp.2 (2246.08)	T02	<i>Indigofera spicata</i> Forssk. (Leguminosae)	1400	*
<i>Enterobacter</i> sp.2 (2114.05)	C03	Poaceae	1400	200
<i>Enterobacter</i> sp.2 (2086.28)	D19	<i>Psidium guajava</i> L. (Myrtaceae)	1400	1600
<i>Enterobacter</i> sp.2 (2085.07)	C05	Poaceae	1400	*
<i>Enterobacter</i> sp.3 (2246.02)	E03	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anarcadiaceae)	1400	*
<i>Enterobacter</i> sp.3 (2086.23)	D11	<i>Psidium guajava</i> L. (Myrtaceae)	1400	200
<i>Enterobacter</i> sp.4 (2114.14)	3733.1	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.) Kuntze (Lamiaceae)	1600	200
<i>Enterobacter</i> sp.5 (2070.07)	A11	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1600	*
<i>Enterobacter</i> sp.6 (2085.08)	C06	Poaceae	1400	50

<i>Enterobacter</i> sp.7 (2070.09)	A15	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1400	200
<i>Enterobacter</i> sp.8 (2086.01)	A08	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1400	400
<i>Enterobacter</i> sp.9 (2118.13)	PIP01	<i>Peperomia pellucida</i> (L.) Kunth (Piperaceae)	1400	*
<i>Enterobacter</i> sp.10 (2086.14)	B07	<i>Ricinus communis</i> L. (Euphorbiaceae)	1050	*
<i>Enterobacter</i> sp.10 (2246.07)	O03	<i>Ocimum selloi</i> Benth. (Lamiaceae)	1400	*
<i>Enterobacter</i> sp.11 (2103.23)	3737.1	<i>Croton</i> sp. (Euphorbiaceae)	1400	*
<i>Enterobacter</i> sp.12 (2114.10)	M01	<i>Mimosa pigra</i> L. (Lamiaceae)	1400	*
<i>Enterobacter cancerogenus</i> (2086.16)	B09	<i>Ricinus communis</i> L. (Euphorbiaceae)	1400	*
<i>Enterobacter kobei</i> (2120.04)	AROx02	Asteraceae	*	400
<i>Enterobacter hormaechei</i> (2117.23)	A06	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1400	100
<i>Enterobacter hormaechei</i> (2086.15)	B08	<i>Ricinus communis</i> L. (Euphorbiaceae)	1400	200
<i>Enterobacter hormaechei</i> (2086.11)	B04	<i>Ricinus communis</i> L. (Euphorbiaceae)	1400	400
<i>Enterobacter hormaechei</i> (2086.26)	D17	<i>Psidium guajava</i> L. (Myrtaceae)	1400	800
<i>Enterobacter</i> sp. nov.1 (2117.04)	3734.4	<i>Peperomia pellucida</i> (L.) Kunth (Piperaceae)	1600	*
<i>Enterobacter</i> sp. nov.1 (2117.14)	*	Asteraceae	1050	*

<i>Citrobacter</i> sp.2 (2103.28)	3737.6	<i>Croton</i> sp. (Euphorbiaceae)	1600	100
<i>Citrobacter</i> sp.3 (2118.11)	LEO02	<i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) R. Br. (Lamiaceae)	1400	400
<i>Citrobacter</i> sp.3 (2118.04)	AROX01	Asteraceae	1400	400
<i>Citrobacter</i> sp.3 (2086.36)	LEO01	<i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) R. Br. (Lamiaceae)	1400	400
<i>Citrobacter</i> sp.4 (2117.18)	3741.6	Asteraceae	1400	200
<i>Citrobacter</i> sp.4 (2246.04)	J01	<i>Justicia</i> sp. (Acanthaceae)	1400	*
<i>Citrobacter</i> sp.4 (2114.16)	3733.03	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.) Kuntze (Lamiaceae)	1600	200
<i>Citrobacter</i> sp.4 (2117.02)	3734.2	<i>Peperomia pellucida</i> (L.) Kunth (Piperaceae)	1600	*
<i>Citrobacter amalonaticus- farmeri</i> (2086.27)	D18	<i>Psidium guajava</i> L. (Myrtaceae)	1400	200
<i>Citrobacter</i> cf. <i>werkmanii</i> (2103.17)	9OU6.4	Scrophulariaceae	1400	*
<i>Escherichia coli</i> (2103.20)	3707.3	<i>Borreria</i> sp. (Rubiaceae)	1600	*
<i>Klebsiella</i> cf. <i>variicola</i> (2085.15)	J02	<i>Justicia</i> sp. (Acanthaceae)	1400	400
<i>Klebsiella</i> cf. <i>variicola</i> (2086.20)	D06	<i>Psidium guajava</i> L. (Myrtaceae)	1400	800
<i>Pantoea</i> sp.1 (2086.03)	A14	<i>Cecropia pachystac hya</i> Trécul (Moraceae)	1050	*
<i>Pantoea eucrina</i> (2086.06)	A26	<i>Cecropia pachystac hya</i> Trécul (Moraceae)	1050	*
<i>Pantoea eucrina</i>	A30	<i>Cecropia pachystac hya</i> Trécul	1050	*

(2086.08)		(Moraceae)		
<i>Pantoea eucrina</i> (2086.02)	A12	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1400	*
<i>Serratia sp.1</i> (2086.30)	H01	<i>Ipomoea asarifolia</i> Roem. & Schult. (Convolvulaceae)	1400	1600
<i>Serratia sp.1</i> (2246.05)	H03	<i>Ipomoea asarifolia</i> Roem. & Schult. (Convolvulaceae)	1400	*
<i>Serratia sp.1</i> (2103.15)	9ou6.2	Scrophulariaceae	1600	400
<i>Serratia sp.2</i> (2114.24)	3739.4	<i>Heliotropium sp.</i> (Boraginaceae)	1400	100
<i>Serratia sp.2</i> (2117.07)	3736.3	Asteraceae	1600	1600
<i>Serratia sp.3</i> (2117.11)	3740.1	Campanulaceae	*	1600
<i>Serratia sp.3</i> (2103.19)	3707.2	<i>Borreria sp.</i> (Rubiaceae)	1600	1600
<i>Serratia sp.4</i> (2114.22)	3739.1	<i>Heliotropium sp.</i> (Boraginaceae)	1400	100
<i>Serratia sp.5</i> (2117.09)	3738.2	<i>Hyptis sp.</i> (Lamiaceae)	1400	1600
<i>Serratia sp.6</i> (2070.16)	A24	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1400	400
<i>Serratia sp.6</i> (2086.07)	A28	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1400	400
<i>Serratia sp.6</i> (2070.19)	A29	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1400	1600
<i>Serratia sp.6</i> (2070.03)	A04	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	3200	400
<i>Serratia sp.7</i> (2114.23)	3739.2	<i>Heliotropium sp.</i> (Boraginaceae)	1400	100
<i>Serratia sp.7</i>	H04	<i>Ipomoea asarifolia</i> Roem. & Schult.	1400	1600

(2086.32)		(Convolvulaceae)		
<i>Serratia sp.7</i> (2086.29)	E01	<i>Schinus terebinthifolius</i> (Anarcadiaceae)	1400	1600
<i>Serratia sp.7</i> (2085.13)	EM01	<i>Cecropia pachystac hya</i> Trécul (Moraceae)	1400	1600
<i>Serratia sp.7</i> (2086.35)	STA02	<i>Stachytarpheta</i> (Verbenaceae)	1400	1600
<i>Serratia sp.7</i> (2114.19)	3738.1	<i>Hyptis sp.</i> (Lamiaceae)	1400	1600
<i>Serratia sp.7</i> (2103.24)	3737.2	<i>Croton sp.</i> (Euphorbiaceae)	1600	1600
<i>Serratia sp.7</i> (2103.22)	3707.5	<i>Borreria sp.</i> (Rubiaceae)	1600	1600
<i>Serratia sp.7</i> (2117.12)	3740.2	Campanulaceae	1600	1600
<i>Serratia sp.7</i> (2085.16)	STA03	<i>Stachytarpheta</i> (Verbenaceae)	*	1600
<i>Serratia sp.7</i> (2086.34)	STA01	<i>Stachytarpheta</i> (Verbenaceae)	1400	1600
<i>Serratia sp.7</i> (2103.21)	3707.4	<i>Borreria sp.</i> (Rubiaceae)	1600	1600
<i>Serratia nematodiphila</i> (2114.20)	3738.3	<i>Hyptis sp.</i> (Lamiaceae)	1400	1600
<i>Serratia nematodiphila</i> (2118.14)	T01	<i>Indigofera spicata</i> Forssk. (Leguminosae)	1400	1600
<i>Serratia nematodiphila</i> (2246.03)	EM02	<i>Cecropia pachystac hya</i> Trécul (Moraceae)	1400	*
<i>Providencia sp.1</i> (2117.03)	3734.3	<i>Peperomia pellucida</i> (L.) Kunth (Piperaceae)	1400	*
<i>Providencia sp.2</i> (2118.03)	AA02	Asteraceae	1400	1600
<i>Providencia sp.2</i> (2103.29)	3737.7	<i>Croton sp.</i> (Euphorbiaceae)	1400	1600

<i>Providencia</i> (sp.2) 2103.27	3737.5	<i>Croton</i> sp. (Euphorbiaceae)	1400	1600
<i>Providencia alcalifaciens-rustigianii</i> (2118.07)	HP01	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.) Kuntze (Lamiaceae)	1400	*

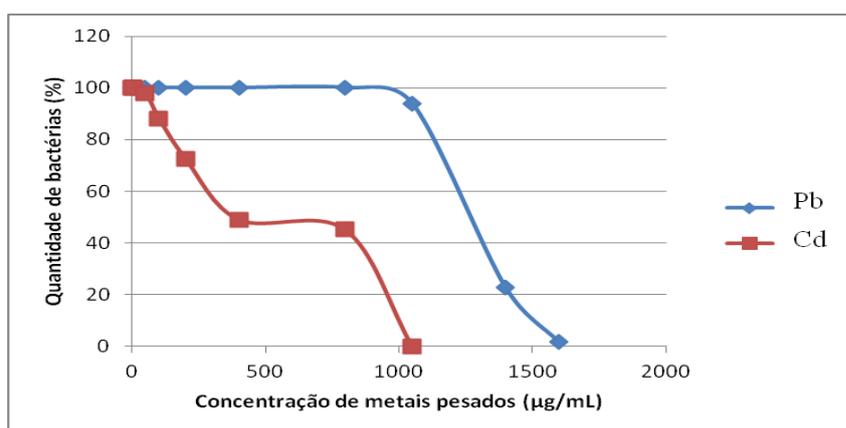


Figura 88: Crescimento de microrganismos da família Enterobacteriaceae em meios contendo diferentes concentrações de chumbo (linha azul) e cádmio (linha vermelha).

O crescimento em meios contendo chumbo ou cádmio de algumas bactérias desta família pode ser observado nas figuras do anexo (fig. 59–86). Destaca-se as bactérias *Serratia* sp.1 (2103.15), *Citrobacter amalonaticus-farmeri* (2086.27), *Enterobacter hormaechei* (2117.23), *Enterobacter* sp. nov.1 (2117.04) em chumbo, no qual essas quatro bactérias apresentaram alterações na forma, biomassa e principalmente na cor das colônias, enquanto que em cádmio somente *Serratia* sp.1 (2103.15) apresentou alteração de cor, como observado na figura do anexo (seguir tabela de orientação que o antecede).

5.6.6 Enterococcaceae

A espécie *Enterococcus gallinarum-casseliflavus* (2085.05) apresentou tolerância a ambos os metais pesados testados, com CIM em chumbo de 1050 µg/mL e em cádmio de 100 µg/mL (tabela 09). Quanto a espécie *Enterococcus gallinarum-casseliflavus* (2085.09) não cresceu no controle negativo mesmo após 5 dias em estufa a 28°C.

O comportamento destas espécies pode ser visualizado em figuras (59 – 86) no anexo, seguindo tabela de orientação que os antecede.

Tabela 09: CIM das espécies de *Enterococcus* em chumbo e cádmio. *Não houve crescimento da bactéria durante os testes.

Espécies de bactérias	Identificação da espécie em foto no anexo	Planta de origem	CIM chumbo (µg/mL)	CIM cádmio (µg/mL)
<i>Enterococcus gallinarum-casseliflavus</i> (2085.05)	B18	<i>Ricinus comunis</i> L. (Euphorbiaceae)	1050	100
<i>Enterococcus gallinarum-casseliflavus</i> (2085.09)	C07	Poaceae	*	*

5.6.7 Microbacteriaceae

As espécies *Leucobacter* aff. *chromiireducens* (2114.07) e *Microbacterium* sp.1 (2085.03) apresentaram tolerância a ambos os metais pesados testados, ambas com CIM em chumbo de 1050 µg/mL e em cádmio a primeira apresentou CIM de 200µg/mL, enquanto a segunda foi de 100µg/mL (tabela 10). Quanto a espécie *Microbacterium* sp.2 (2086.17) apresentou CIM de 800µg/mL em chumbo, porém não cresceu no controle negativo durante os experimentos com o metal de cádmio, mesmo após 5 dias em estufa a 28°C.

É observado o crescimento da bactéria *Leucobacter* aff. *chromiireducens* (2114.07) em diferentes concentrações de chumbo e cádmio (fig. 59–86, anexo). Em chumbo, a colônia apresenta uma leve alteração na coloração quando comparada ao controle negativo, enquanto que no cádmio, à medida que aumenta sua concentração, a alteração mais visível é a redução de biomassa, não apresentando mudança em sua coloração.

Tabela 10: CIM das espécies de *Leucobacter* e *Microbacterium* em chumbo e cádmio. *Não houve crescimento da bactéria durante os testes.

Espécies de bactérias	Identificação da espécie na foto do anexo	Planta de origem	CIM chumbo (µg/mL)	CIM cádmio (µg/mL)
<i>Leucobacter aff. chromiireducens</i> (2114.07)	D08	<i>Psidium guajava</i> L. (Myrtaceae)	1050	200
<i>Microbacterium sp.1</i> (2085.03)	B16	<i>Ricinus comunis</i> L. (Euphorbiaceae)	1050	100
<i>Microbacterium sp.2</i> (2086.17)	B10	<i>Ricinus comunis</i> L. (Euphorbiaceae)	800	*

5.6.8 Micrococcaceae

A espécie *Arthrobacter sp.1* (2070.04) apresentou CIM em meio contendo chumbo igual a 1050µg/mL e não cresceram durante os teste com o cádmio, enquanto que *Arthrobacter sp.1* (2070.11) e *Arthrobacter sp.1* (2070.12) apresentaram CIM no chumbo de 1400µg/mL (tabela 11) e no cádmio de 25µg/mL. Quanto ao Microrganismo *Arthrobacter sp.2* (2085.04) não cresceu desde o começo dos testes.

O comportamento destas espécies pode ser visualizado em figuras (59 – 86) no anexo, seguindo tabela de orientação que os antecede.

Tabela 11: CIM das espécies de *Arthrobacter* em chumbo e cádmio. *Não houve crescimento da bactéria durante os testes.

Espécies de bactérias	Identificação da espécie em foto no anexo	Planta de origem	CIM chumbo (µg/mL)	CIM cádmio (µg/mL)
<i>Arthrobacter</i> sp.1 (2070.04)	A05	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1050	*
<i>Arthrobacter</i> sp.1 (2070.11)	A20	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1400	25
<i>Arthrobacter</i> sp.1 (2070.12)	A21	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1400	25
<i>Arthrobacter</i> sp.2 (2085.04)	B17	<i>Ricinus comunis</i> L. (Euphorbiaceae)	*	*

O crescimento de *Arthrobacter* sp.1 (2070.04) e *Arthrobacter* sp.1 (2070.11) em meio de cultura contendo diferentes concentrações de metal pesado pode ser visto nas figuras 59 a 86, do anexo (seguindo tabela de orientação que os antecede). Nestas, observou-se que à medida que se aumentava a concentração de chumbo, os microrganismos apresentaram morfologias distintas, o que não é observado em cádmio.

5.6.9 Moraxellaceae

As espécies de *Acinetobacter* cf. *calcoaceticus* (2086.09) e *Acinetobacter* sp.1 (2114.15) apresentaram crescimento tanto em chumbo quanto em cádmio com CIM igual a 1050µg/mL e 100µg/mL, respectivamente enquanto que *Acinetobacter* cf. *calcoaceticus* (2118.01) teve CIM em chumbo de 800µg/mL e em cádmio de 6µg/mL (tabela 12). Por sua vez, as bactérias *Acinetobacter* cf. *calcoaceticus* (2070.02) e *Acinetobacter* cf. *calcoaceticus* (2070.05) apresentaram CIM em meio contendo chumbo igual a 1050µg/mL, enquanto *Acinetobacter* cf. *calcoaceticus* (2114.11) e *Acinetobacter* cf. *calcoaceticus* (2246.01) igual a 800 e 1400 µg/mL, respectivamente (tabela 12). Estes últimos microrganismos não cresceram em meio com cádmio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Tabela 12: CIM das espécies de *Acinetobacter* em chumbo e cádmio. *Não houve crescimento da bactéria durante os testes.

Espécies de bactérias	Identificação da espécie em foto no anexo	Planta de origem	CIM chumbo (µg/mL)	CIM cádmio (µg/mL)
<i>Acinetobacter</i> sp.1 (2114.15)	3733.2	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.) Kuntze (Lamiaceae)	1050	100
<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2086.09)	B02	<i>Ricinus comunis</i> L. (Euphorbiaceae)	1050	100
<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2070.02)	A02	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1050	*
<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2070.05)	A09	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	1050	*
<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2114.11)	O04	<i>Ocimum selloi</i> Benth. (Lamiaceae)	800	*
<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2118.01)	A16	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Moraceae)	800	6
<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2246.01)	E02	<i>Schinus terebinthifolia</i> (Anarcadiaceae)	1400	*

O comportamento destas espécies pode ser visualizado em figuras (59 – 86) no anexo, seguindo tabela de orientação que os antecede.

5.6.10 Planococcaceae

A espécie *Kurthia* sp. nov.1 (2103.26) apresentou CIM em meio contendo chumbo igual a 1050µg/mL, enquanto que em cádmio foi menor que 3,2µg/mL (tabela 13). Por sua vez, *Kurthia* sp. nov.1 (2103.25) não cresceu durante os testes com os metais sob avaliação.

Tabela 13: CIM das espécies de *Kurthia* em chumbo e cádmio. *Não houve crescimento da bactéria durante os testes.

Espécies de bactérias	Identificação da espécie em foto no anexo	Planta de origem	CIM chumbo (µg/mL)	CIM cádmio (µg/mL)
<i>Kurthia</i> sp. nov.1 (2103.25)	3737.3	<i>Croton</i> sp. (Euphorbiaceae)	*	*
<i>Kurthia</i> sp. nov.1 (2103.26)	3737.4	<i>Croton</i> sp. (Euphorbiaceae)	1050	< 3,2

O comportamento da espécie pode ser visualizado nas figuras 59 – 86 no anexo, seguindo tabela de orientação que os antecede.

5.6.11 Pseudomonadaceae

As espécies de *Pseudomonas* sp.2 (2114.18) e *P.* sp.2 (2117.06) apresentaram crescimento tanto em chumbo quanto em cádmio com CIM igual a 1050µg/mL e 50µg/mL, respectivamente, enquanto que *Pseudomonas* sp.1 (2114.03), *P.* sp.3 (2117.01) e *Pseudomonas* cf. *mosselii* (2117.19) tiveram CIM em chumbo de 1050µg/mL e em cádmio somente a primeira cresceu, com CIM de 100µg/mL (tabela 14). A bactéria *P.* cf. *mosselii* (2114.17) apresentou CIM em meio contendo chumbo igual a 1400µg/mL, não crescendo durante os testes com cádmio.

Por sua vez, *Pseudomonas aeruginosa* (2117.10) não cresceu durante os testes com chumbo e cádmio (tabela 14).

Tabela 14: CIM das espécies de *Pseudomonas* em chumbo e cádmio. *Não houve crescimento da bactéria durante os testes.

Espécies de bactérias	Identificação da espécie em foto do anexo	Planta de origem	CIM chumbo (µg/mL)	CIM cádmio (µg/mL)
<i>Pseudomonas</i> sp.1 (2114.03)	B12	<i>Ricinus comunis</i> L. (Euphorbiaceae)	1050	100

<i>Pseudomonas</i> sp.2 (2117.06)	3736.2	Asteraceae	1050	50
<i>Pseudomonas</i> sp.2 (2114.18)	3736.4	Asteraceae	1050	50
<i>Pseudomonas</i> sp.3 (2117.01)	3734.1	<i>Peperomia pellucida</i> (L.) Kunth (Piperaceae)	1050	400
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2117.10)	3739.3	<i>Heliotropium</i> sp. (Boraginaceae)	*	*
<i>Pseudomonas</i> cf. <i>mosselii</i> (2114.17)	3733.4	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.) Kuntze (Lamiaceae)	1400	*
<i>Pseudomonas</i> cf. <i>mosselii</i> (2117.19)	3741.7	Asteraceae	1050	*

Exemplificando o comportamento do gênero *Pseudomonas* em diferentes concentrações de metais pesados, tem-se as cepas em chumbo e cádmio (fig. 59–86, em anexo). Nas figuras do anexo, as bactérias *Pseudomonas* sp.1 (2114.03) e *Pseudomonas* sp.3 (2117.01) apresentam maior tolerância a chumbo que cádmio e, interessante notar, o aparecimento de luminescência amarelo-esverdeada na bactéria *P.* sp.3 (2117.01) durante o seu desenvolvimento em concentração de chumbo igual a 800µg/mL.

5.6.12 Staphylococcaceae

A espécie *Staphylococcus warnerii* (2086.12) apresentou CIM em meio contendo cádmio igual a 100µg/mL, enquanto que em chumbo sua concentração foi menor que 3,2µg/mL (tabela 15).

Tabela 15: CIM das espécies de *Staphylococcus* em chumbo e cádmio. *Não houve crescimento da bactéria durante os testes.

Espécies de bactérias	Identificação da espécie em foto do anexo	Planta de origem	CIM chumbo (µg/mL)	CIM cádmio (µg/mL)
<i>Staphylococcus warnerii</i> (2086.12)	B05	<i>Ricinus comunis</i> L. (Euphorbiaceae)	< 3,2	100

Esta espécie cresceu em meio com cádmio, cessando seu crescimento em 200 µg/mL, mesmo após 5 dias de incubação. Em 100 µg/mL, essa espécie cresceu somente após 5 dias de incubação a 28°C.

O comportamento destas espécies pode ser visualizado em figuras (59 – 86) no anexo, seguindo tabela de orientação que os antecede.

5.6.13 Streptococcaceae

As espécies de *Lactococcus garvieae* (2086.38), *L. garvieae* (2087.37) e *Lactococcus lactis* (2086.41) apresentaram CIM em chumbo de 1050µg/mL e em cádmio somente as duas primeiras espécies cresceram com CIM de 25 e 100 µg/mL, respectivamente (tabela 16). Por sua vez, *L. garvieae* (2086.39) e *L. garvieae* (2086.42) tiveram CIM em chumbo de 1400µg/mL e cádmio iguais a 100 e 400 µg/mL, respectivamente, enquanto que *L. lactis* (2086.43) apresentou tolerância somente ao chumbo de 1600µg/mL, não crescendo durante os testes com cádmio (tabela 16).

Tabela 16: CIM das espécies de *Lactococcus* em chumbo e cádmio. *Não houve crescimento da bactéria durante os testes.

Espécies de bactérias	Identificação da espécie em foto do anexo	Planta de origem	CIM chumbo (µg/mL)	CIM cádmio (µg/mL)
<i>Lactococcus garvieae</i> (2086.38)	LEG01	Leguminosae	1050	25

<i>L. garvieae</i> (2086.37)	LOB01	<i>Lobelia organenses</i> Gardner (Campanulaceae)	1050	100
<i>L. garvieae</i> (2086.39)	CU01	<i>Cuphea</i> sp. (Lythraceae)	1400	100
<i>L. garvieae</i> (2086.42)	AC01	Acanthaceae	1400	400
<i>Lactococcus lactis</i> (2086.43)	CONV01	Convolvulaceae	1600	*
<i>L. lactis</i> (2086.41)	SC01	Scrophulariaceae	1050	*

Exemplificando o comportamento do gênero *Lactococcus* em diferentes concentrações de metais pesados, tem-se as cepas *L. garvieae* (2086.38) e *L. lactis* (2086.43) em chumbo e cádmio (fig. 59–86, em anexo). É interessante notar o escurecimento da coloração da cepa *L. lactis* (2086.43) durante o seu desenvolvimento em distintas concentrações de chumbo.

5.6.14 Xanthomonadaceae

As espécies *Stenotrophomonas* cf. *pavanii-maltophilia* (2117.08) e *S. cf. pavanii-maltophilia* (2103.18) apresentaram CIM em chumbo de 1050µg/mL e em cádmio o primeiro cresceu com CIM de 50µg/mL (tabela 17) e o segundo não apresentou viabilidade celular durante os testes.

Tabela 17: CIM das espécies de *Stenotrophomonas* em chumbo e cádmio. *Não houve crescimento da bactéria durante os testes.

Espécies de bactérias	Identificação da espécie em foto do anexo	Planta de origem	CIM chumbo (µg/mL)	CIM cádmio (µg/mL)
<i>Stenotrophomonas</i> <i>cf. pavanii-maltophilia</i> (2117.08)	3736.5	Asteraceae	1050	50
<i>Stenotrophomonas</i> <i>cf. pavanii-maltophilia</i> (2103.18)	3707.1	<i>Borreria</i> sp. (Rubiaceae)	1050	*

Stenotrophomonas cf. pavanii-maltophilia (2103.18) e *Stenotrophomonas cf. pavanii-maltophilia* (2117.08), em concentração de chumbo de 1050µg/mL, apresentaram crescimento somente após 5 dias de incubação, sendo que o primeiro microrganismo apresentou acentuada redução de sua biomassa. Em concentração de 1400µg/mL, essas bactérias não cresceram mesmo após os 5 dias em estufa.

Por sua vez, *S. cf. pavanii-maltophilia* (2117.08) apresentou em cádmio crescimento em concentrações de 50 e 100 µg/mL somente após 5 dias de incubação, não crescendo após esse mesmo período em concentrações de 200µg/mL deste mesmo metal.

O comportamento destas espécies pode ser visualizado em figuras (59 – 86) no anexo, seguindo tabela de orientação que os antecede.

5.7 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A Concentração Inibitória Mínima das espécies de bactérias identificadas com base na região 16S se apresentaram em relação as concentrações de chumbo e cádmio segundo as figuras 89 e 90, respectivamente:

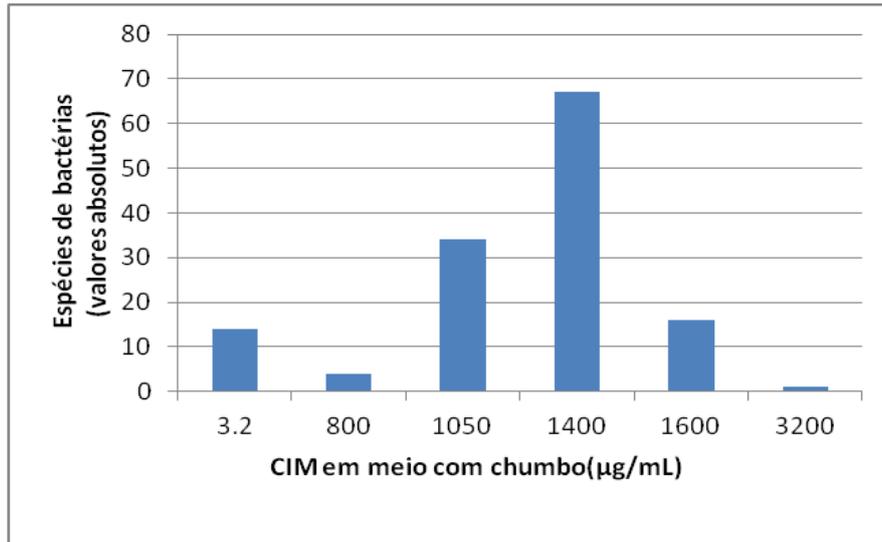


Figura 89: Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio com chumbo e a quantidade de espécies de bactérias para cada uma das concentrações.

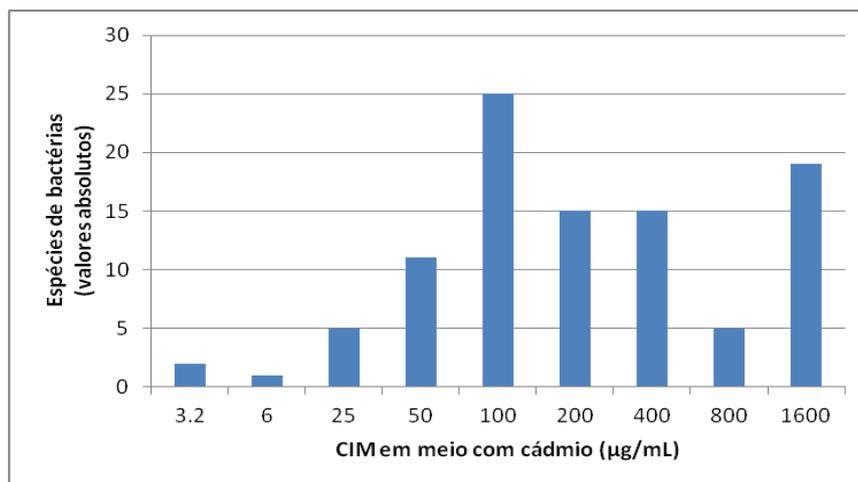


Figura 90: Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio com cádmio e a quantidade de espécies de bactérias em cada uma das concentrações.

5.8 DISTRIBUIÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS EM MAMONA (*RICINUS COMUNIS* L.) E EMBAÚBA (*CECROPIA PACHYSTACHYA* TRÉCUL)

Foram isoladas as bactérias da rizosfera de 35 espécies de plantas, das quais se destacaram em relação a quantidade de espécies de bactérias isoladas a mamona e a embaúba. O total de bactérias isoladas da rizosfera destas duas espécies de plantas representou cerca de 37% do total de espécies de bactérias neste estudo. Entretanto, há uma forte divergência na

composição de cada uma delas (embaúba e mamona) quanto a composição de bactérias Gram positivas e Gram negativas (fig. 91) isoladas nestas rizosferas. Em embaúba foram encontradas 78,6% de Gram negativas e 21,4% de Gram positivas, em contraste, na mamona foi isolada 40% de Gram negativas e 60% de Gram positivas.

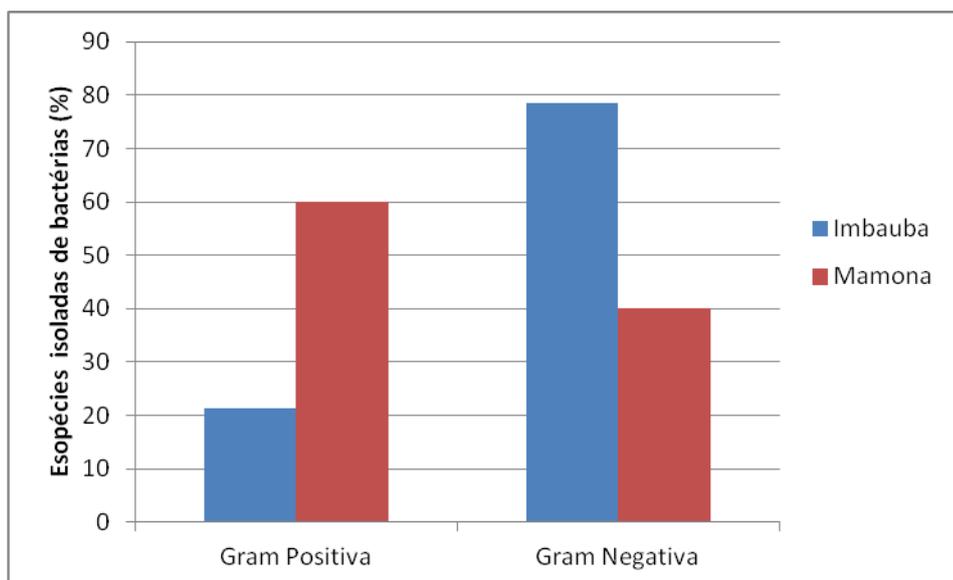


Figura 91: Distribuição de bactérias Gram positivas e Gram negativas em mamona e embaúba extraídos em área contaminada por metais pesados.

5.9 ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS EM GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS EM CHUMBO E CÁDMIO

Foram observadas mudanças morfológicas entre as bactérias Gram positivas e Gram negativas desenvolvidas em meio com chumbo e cádmio quando comparadas ao controle negativo, i.e. bactérias que cresceram em meio ágar nutriente sem adição dos metais.

Dentre as bactérias Gram negativas, 87% apresentaram alterações morfológicas conspícuas em chumbo, enquanto que para as Gram positivas estas alterações representaram apenas 38%. Dentre estas alterações, destacam-se a mudança na cor e textura das colônias, sendo que as colônias adquirem tons vivos, principalmente quando expostas a determinadas concentrações de chumbo, como observado, por exemplo, nas espécies *Serratia* sp.7 (2114.19) (fig. 79 – XII e XIII), *Bacillus* Grupo *cereus* (2070.06) (fig. 78 – II) e *Pseudomonas* sp.3 (2117.01) (fig. 76 – XVII). Nota-se que as bactérias que mais apresentaram alterações morfológicas em chumbo foram as Gram negativas (fig. 92a),

enquanto que poucas colônias de bactérias Gram positivas apresentaram tais alterações (fig.92a). Por sua vez, a maioria das bactérias, independente do Gram, cultivadas em meios com cádmio, não apresentaram diferenças morfológicas durante seu desenvolvimento (fig. 92b).

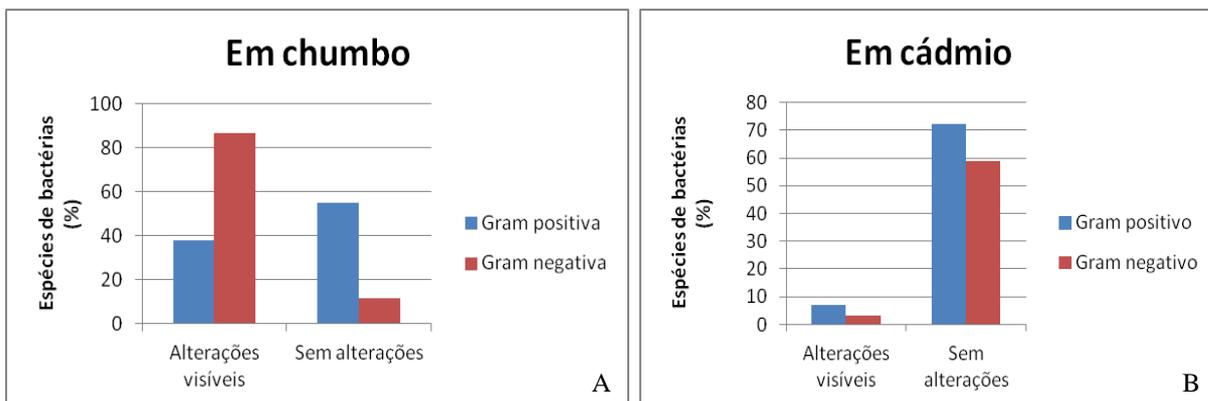


Figura 92: Alterações morfológicas visíveis em bactérias gram positivas e gram negativas crescidas em meio contendo chumbo (A) e cádmio (B).

6. DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO

O solo da região de Santo Amaro é denominado Massapê, característico de todo Recôncavo Baiano e sul da Bahia. É um solo muito argiloso, escuro e rico em húmus, oriundo da decomposição de rochas sedimentares, como os folhelhos (rocha argilosa em finas camadas) formados no período cretáceo.

No solo de Santo Amaro, com significativa quantidade de matéria orgânica e com pH levemente alcalino, é sugerido que íons divalentes como o chumbo e cádmio, apresentem afinidade com as substâncias húmicas do solo, formando compostos orgânicos estáveis e insolúveis, como apontado no trabalho de Olson e Skogerboe (1975). Além disso, o Pb pode ser imobilizado por processos de troca iônica com óxidos e hidróxidos de ferro e manganês e tem tendência para complexar e precipitar (Olson e Skogerboe, 1975). Desta forma, sugere-se que o solo argiloso é um forte aliado às bactérias tolerantes no processo de imobilização de chumbo e cádmio.

6.2 ANÁLISE MOLECULAR COM A REGIÃO 16S rRNA

A região escolhida para identificar as cepas de bactérias isoladas do solo de Santo Amaro foi a região intragenômica 16S rRNA. Esta região é a mais utilizada para estabelecer relações de parentesco entre microrganismos e identificação e por isso é considerada o “*gold standard*” da filogenia (Case *et al.* 2007). Além disso, segundo Links *et al.* (2012), muitos autores consideram esta região eficaz para o *barcoding* ou ‘código de barras’, ou seja, um marcador único que permitiria a identificação de bactérias.

Este trabalho avaliou o uso do 16S em grupos não relacionados de bactérias, resultando na discriminação específica de apenas 20% dos isolados enquanto que para o restante foi indicado apenas o gênero ou grupos infragenéricos (tabela 03 – nos resultados).

Existem vários fatores que contribuíram para esta relativamente baixa capacidade de discriminação de bactérias com base na análise do 16S como a presença de cópias parálogas, inacurada identificação taxonômica das sequências submetidas ao Genbank, delimitação taxonômica complexa das espécies, como também a falta de informação suficiente na região 16S.

Em algumas análises onde as bactérias se encontram na denominada, neste trabalho, de ‘Associação Direta Parafilética’ que reuniu 7% das espécies de bactérias, é possível presumir que houve equívoco na identificação taxonômica da espécie depositada no GB ou houve problemas na própria delimitação da espécie. Em alguns casos este tipo de associação tem fortes indícios de serem resultados da análise de cópias parálogas. Cópias parálogas são, segundo Gevers *et al.* (2006), genes homólogos dentro de um mesmo genoma, originadas em eventos de duplicação ao acaso ou em resposta a uma pressão seletiva e que a partir deste evento passam a ter evolução independente nos seus descendentes. Segundo Case *et al.* (2007), tal duplicação, pode alterar a filogenia, pois depende da cópia escolhida (cópias não homólogas), dificultando, assim a interpretação dos dados.

Desta forma, foi verificado que houve a inclusão de cópias não homólogas em algumas das análises e isso impediu que o resultado fosse acurado, pois a atração dos diferentes grupos de cópias homólogas (o que representa a ‘filogenia dos eventos de duplicação’) na análise conflita com a atração de espécies próximas, que seria a filogenia das espécies. O resultado desta competição de sinais filogenéticos tende a ser o colapsamento dos clados que deveriam informar as relações de similaridade entre espécies. Este artefato de cópias parálogas foi facilmente detectado e se apresentou comum em cerca de 53% ‘espécies’ que não estavam associadas a nenhum grupo ou espécie de bactérias. Como exemplo temos as espécies do gênero *Citrobacter* (família Enterobacteriaceae) estudadas onde esta condição se encontra bem caracterizada (fig. 93). Logo, somente a utilização do 16S como marcador não é suficiente para discriminar e classificar os organismos dentro destes grupos.

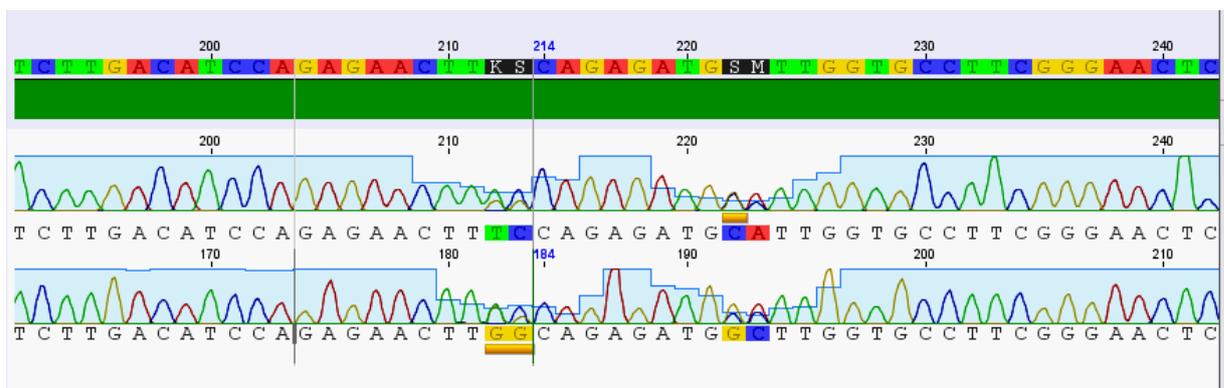


Figura 93: Cópias parálogas em espécie do gênero *Citrobacter*.

Por último, a falta de informação contida no 16S também foi um dos fatores que contribuem para sua ineficiência em discriminar espécies que se apresentaram em Associação

Direta de Grupo. Para as espécies do gênero *Bacillus* a região 16S é incapaz de discriminar as espécies em sua maioria, sendo que estas encontram-se apenas identificadas como pertencentes a grupos de espécies. Este problema é reportado também em Bavykin *et al.* (2008) que sugerem que para discriminação de bactérias dentro do gênero *Bacillus*, é necessária a utilização, além da região 16S, da região 23S em conjunto com as sequências do gene *gyrB*. Já para o ‘grupo *Bacillus subtilis*’, Wang *et al.* (2007) sugerem o uso somente do gene *gyrB* que seria suficiente para identificar suas espécies.

Desta forma a região do 16S é considerada aqui inviável como único marcador tipo *barcoding* de espécies, o que suporta as conclusões alcançadas em Links *et al.* (2012). Entretanto, a região 16S se mostrou útil para determinar gêneros, em alguns casos, diferentes tipos de Associação infragenéricas e, mais raramente, para determinar a espécie de bactérias. Desta forma, propomos nessa Dissertação que o marcador 16S juntamente às metodologias aqui usadas com base em análises de distância e parcimônia sejam os primeiros passos na identificação de bactérias cultivadas. Com base nestes resultados do 16S, esperamos que sejam feitas outras abordagens metodológicas de acordo com o grupo taxonômico em questão para uma identificação específica.

6.3 RELAÇÃO DAS BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E NEGATIVAS COM AS PLANTAS DE SANTO AMARO E SUAS TOLERÂNCIAS AOS METAIS DE CHUMBO E CÁDMIO

Do total de espécies isoladas do solo contaminado de Santo Amaro, 72,3% são Gram negativas e 27,7%, Gram positivas. Ambos os grupos de bactérias foram isoladas principalmente da rizosfera de embaúba (21,5% do total) e mamona (23%) (ver tabela completa 19, em anexo). Estas plantas possuem em comum o hábito arbustivo até arvoreta e são consideradas colonizadoras de áreas perturbadas (Pastore, comm. pess.), o que pode estar relacionado com a expressiva quantidade de bactérias isoladas.

Dentre as bactérias isoladas em embaúba, a maioria é Gram negativa (78,6%), enquanto que Gram positivas representaram 21,4%. Em contraste, na mamona foi isolada 40% de Gram negativa e 60% Gram positiva. Desta maneira, estes dados sugerem que grupos de bactérias com diferentes paredes celulares (Gram) preferencialmente colonizam a rizosfera em diferentes plantas, como visto nos gráficos da figura 91. Além disso, estes dados também sugerem que o hábito perene das plantas deve resultar em um número maior de espécies de

bactérias em sua região rizosférica, em comparação com as plantas anuais. Porém, estas correlações deverão ser melhor avaliadas em estudos posteriores

Todas as bactérias isoladas apresentaram maior resistência ao chumbo que ao cádmio como pode ser visto nos gráficos das figuras 89 e 90. Este fato coincide com a constatação de diversos trabalhos geoquímicos realizados em Santo Amaro que apontam maior incidência de chumbo que cádmio no solo (Anjos, 2003; Machado *et al.*, 2004). Sugere-se, portanto, que as bactérias já adaptadas a elevadas concentrações de chumbo, foi também capaz de crescer em meio de cultura com elevada concentração deste mesmo metal (Jordan e Lechevalier, 1975; Duxbury e Bicknell, 1982).

Além da elevada resistência, em chumbo a maioria (87%) das bactérias Gram negativas apresentaram alteração na coloração de suas colônias, ao contrário das Gram positivas em que este comportamento foi apresentado somente (38%) das espécies (sendo elas *Bacillus* Grupo *subtilis*, *Kurthia* sp. nov.1, *Lactococcus lactis* e *Lysinibacillus macroides-boronitolerans*) (fig. 92). Por sua vez, em meio contendo cádmio não houve alterações morfológicas conspícuas para a maioria das espécies de ambos os grupos, exceção feita para algumas Gram negativas: *Serratia* sp.7 e *Serratia* sp.1.

Tais alterações morfológicas sugerem que as bactérias são tolerantes aos metais devido a sua capacidade de reduzir e incorporar os metais por suas células, seja por absorção ou adsorção (Cruz-Vega *et al.*, 2012). Segundo Silver (1998), a maioria dos microrganismos codificam os mecanismos responsáveis pela tolerância nos plasmídeos, o que facilita a transferência horizontal desta característica de célula para célula. Em outros microrganismos, os genes se encontram no cromossomo (Silver, 1998), como se estivessem em sua forma latente, agindo somente quando houvesse um estímulo externo para ser ativado. Porém, seja no cromossomo seja no plasmídeo, os genes parecem ativar diferentes mecanismos a depender se Gram positivo ou Gram negativo o microrganismo, os quais conferem tolerância aos metais (Silver, 1998).

Foi constatado por Boyanov *et al.* (2003) que o pH do ambiente exercia forte influencia sobre a ativação de determinados sítios destes mecanismos. Eles estudaram a adsorção de cádmio em *Bacillus subtilis* por técnicas de espectroscopia e raio-X e descobriram que havia uma relação direta com o pH. Ele constatou que abaixo de pH 4.4, o Cd liga-se predominantemente aos grupos fosforila, ao passo que com pH mais elevados, a adsorção aos grupos carboxila é mais significativa.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta é uma primeira abordagem a cerca da interação entre bactérias associadas a plantas tolerantes a metais pesados para a região de Santo Amaro (Bahia), uma área altamente impactada por metais pesados, predominantemente cádmio e chumbo.

Neste primeiro trabalho que explora a microbiota rizosférica das plantas mais representativas da área, foram isoladas bactérias tolerantes aos metais pesados. Tanto as bactérias Gram positivas quanto as Gram negativas apresentaram maior resistência ao chumbo que ao cádmio seguindo o padrão de contaminação do solo de Santo Amaro. Com base nas observações das conspícuas mudanças morfológicas nos testes de resistência entre bactérias submetidas aos metais, inferimos que devem existir mecanismos de tolerância diferentes em bactérias gram-positivas e gram-negativas. Outro ponto importante sugerido neste trabalho entre as bactérias destes dois grandes grupos, foi a preferência destes por plantas de hábitos arbustivo e arvoreta.

Dentre as bactérias Gram positivas e Gram negativas, observou-se predominância das famílias Enterobacteriaceae, destacando as espécies *Enterobacter*, e Bacillaceae, destacando-se *Lysinibacillus* e *Bacillus*.

Ficou demonstrado com este trabalho que solos, como o de Santo Amaro, abrigam plantas e bactérias resistentes a elevadas concentrações de metais, principalmente chumbo, representando uma fonte rica para futuros processos de biorremediação.

Estudos futuros são necessários para investigar os mecanismos que conferem tolerância aos metais a estas bactérias para então otimizá-los para sua utilização em processos de biosensoriamento e biorremediação em áreas impactadas. Esperamos que estes resultados sejam úteis no desenvolvimento de uma metodologia para descontaminar ambientes contaminados por metal pesado, como Santo Amaro, que há mais de 30 anos sofre com a poluição.

8 REFERENCIA

Abdelatey, L.M.; Khalil, W.K.B.; Ali, T.A.; Mahrous, K.F. (2011). **Heavy metal resistance and gene expression analysis of metal resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria present in Egyptian soils.** Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation, v.6, n.2, p.201–211.

Abd-Elnaby, H.; Abou-Elala, G.M.; El-Sersy, N.A. (2011). **Cadmium resisting bacteria in Alexandria Eastern Harbor (Egypt) and optimization of cadmium bioaccumulation by *Vibrio harveyi*.** African Journal of Biotechnology, v.10, n.17, p.3412–3423.

Abou-Shanab, R.A.I.; Berkum, P.van; Angle, J.S. (2007). **Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*.** Chemosphere, v.68, p.360–367.

Assessoria de Comunicação Social da Secretaria da Saúde do Estado da Bahia. Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/noticias/noticia.asp?NOTICIA=11555>>. Acesso em: 02 maio 2010.

Ahemad, M.; Malik, A. (2012). **Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater.** Bacteriology Journal, v.2, n.1, p.12–21.

Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. (1997). **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program.** Nucleic Acids Research, v.25, n.17, p.3389–3402.

Anjos, J.A.S.A. dos. (2003). **Avaliação da eficiência de uma zona alagadiça (*wetland*) no controle da poluição por metais pesados: o caso da Plumbum em Santo Amaro/Ba.** 328f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Bavykin, S.G.; Mikhailovich, V.M.; Zakharyev, V.M.; Lysov, Y.P.; Kelly, J.J.; Alferov, O.S.; Gavin, I.M.; Kukhtin, A.V.; Jackman, J.; Stahl, D.A.; Chandler, D.; Mirzabekov, A.D. (2008). **Discrimination of *Bacillus anthracis* and closely related microorganisms by analysis of 16S and 23S rRNA with oligonucleotide microarray.** *Chemico-Biological Interactions*, v.171, p.212–235.

Belikova, V.L.; Cherevach, N.V.; Baryshnikova, L.M.; Kalakutskii, L.V. (1980). **Morphologic, physiologic and biochemical characteristics of *Kurthia zopfii*.** *Microbiology*, v.49, p.51–55.

Belliveau, B.H.; Starodub, M.E.; Cotter, C.; Trevors, J.T. (1987). **Metal resistance and accumulation in bacteria.** *Biotechnology Advances*, v.5, p.101–127.

Beveridge, A.; Pickering, W.F. (1983). **The influence of surfactants on the adsorption of heavy metal ions by clays.** *Water Research*, v.17, p.215–225.

Biondi, C.M. (2010). **Teores naturais de metais pesados nos solos de referência do estado de Pernambuco.** 70f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco.

Boopathy, R. (2000). **Factors limiting bioremediation technologies.** *Bioresource Technology*, v.74, p.63–70.

Boyanov, M.I.; Kelly, S.D.; Kemner, K.M.; Bunker, B.A.; Fein, J.B.; Fowle, D.A. (2003). **Adsorption of cadmium to *Bacillus subtilis* bacterial cell wall: A pH-dependent X-ray absorption fine structure spectroscopy study.** *Geochimica et cosmochimica Acta*, v.67, n.18, p.3299–3311.

Braud, A.; Jézéquel, K.; Bazot, S.; Lebeau, T. (2009). **Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr-, Hg- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore producing bacteria.** *Chemosphere*, v.74, n.2, p.280–286.

Brenner, D.J.; Staley, J.T.; Krieg, N.R. (2005). **Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation.** *In:* Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T.; Garrity, G.M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 ed., v.2, p.27–32.

Carvalho, F.M.; Silvany-Neto, A.M.; Tavares, Y.M.; Lima, M.E.C.; Waldron, H.A. (1985). **Lead poisoning among children from Santo Amaro, Brazil.** *Paho Bulletin*, v.19, n.2, p.165–175.

Carvalho, F.M.; Neto, A.M.S.; Peres, M.F.T.; Gonçalves, H.R.; Guimarães, G.C.; Amorim, C.J.B.; Silva-Jr, J.A.S.; Tavares, T.M. (1996). **Intoxicação pelo chumbo: zinco protoporfirina no sangue de crianças de Santo Amaro e de Salvador, BA.** *Jornal de Pediatria*, v.72, n.5, p.295–298.

Carvalho, F.M.; Neto, A.M.S.; Tavares, T.M.; Costa, A.C.A.; Chaves, C.R.C.; Nascimento, L.D.; Reis, M.A. (2001). **A persistência de níveis elevados de chumbo no sangue de crianças de Santo Amaro.** *In:* Seminário Contaminação por metais pesados em Santo Amaro. Santo Amaro-BA. p.37–51.

Carvalho, F.M.; Neto, A.M.S.; Tavares, T.M.; Costa, A.C.A.; Chaves, C.R.C.; Nascimento, L.D.; Reis, M.A. (2003). **Chumbo no sangue de crianças e passivo ambiental de uma fundição de chumbo no Brasil.** *Revista Panamericana de Salud Publica*, v.13, n.1, p.19–24.

Case, R.J.; Boucher, Y.; Dahllorf, I.; Holmstrom, C.; Doolittle, W.F.; Kjelleberg, S. (2007). **Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, n.1, p.278–288.

Castro-Silva, M.A.; Lima, A.O.S.; Gerchenski, A.V.; Jaques, D.B.; Rodrigues, A.L.; Souza, P.L.; Rorig, L.R. (2003). **Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, n.1, p.45–47.

Charrier, T.; Durand, M.J.; Affi, M.; Jouanneau, S.; Gezekel, H.; Thouand, G. (2010). **Bacterial bioluminescent biosensor characterisation for on-line monitoring of heavy metal pollutions in waste water treatment plant effluents.** *In:* Serra, P.A. *Biosensors*, p.179–206.

CETESB. Amostragem do solo. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/anexos/download/6300.pdf>. Acesso em: 14 fev 2013.

Chaturvedi, P.; Shivaji, S. (2006). ***Exiguobacterium indicum* sp. nov., a psychrophilic bacterium from the Hamta glacier of the Himalayan mountain ranges of India.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.56, p.2765–2770.

Chovanová, K.; Sládeková, D.; Kmet, V.; Prosksová, M.; Harichová, J.; Puskárová, A.; Polek, B.; Ferianc, P. (2004). **Identification and characterization of eight cadmium resistant bacterial isolates from a cadmium-contaminated sewage sludge.** Biologia, v.59, n.6, p.817–827.

Clarridge, J.E. (2004). **Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases.** Clinical Microbiology Reviews, v.17, n.4, p.840–862.

Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. (2003). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically - Approved Standard.** Documento CLSI, 6 ed., v.23, n.2, p.1–53.

Cruz-Vega, D.; Cervantes-González, E.; Ammons, D.; Rojas-Avelizapa, L.I.; García-Mena, J.; Pless, R.C.; Rojas-Avelizapa, N.G. **Tolerance and removal of metals by microorganisms isolated from a pitch lake.** Disponível em: <<http://www.srcosmos.gr/srcosmos/showpub.aspx?aa=13041>>. Acesso em: 10 jan 2013.

Dimkpa, C.O.; Svatos, A.; Dabrowska, P.; Schmidt, A.; Boland, W.; Kothe, E. (2008). **Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp.** Chemosphere, v.74, n.1, p.19–25.

Djelouadji, Z.; Raoult, D.; Daffé, M.; Drancourt, M. (2008). **A single-step sequencing method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species.** Plos Neglected Tropical Diseases, v.2, n.6, p.e253.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. (1990). **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. *Focus*, v.12, p.13–15.

Drummond, A.J.; Ashton, B.; Buxton, S.; Cheung, M.; Cooper, A.; Duran, C.; Field, M.; Heled, J.; Kearse, M.; Markowitz, S.; Moir, R.; Stones-Havas, S.; Sturrock, S.; Thierer, T.; Wilson, A. (2011). **Geneious v5.4**. Disponível em: <<http://www.geneious.com>>. Acesso em: 30 jan 2012.

D'Souza, S.F. (2001). **Microbial biosensor**. *Biosensors and Bioelectronics*, v.16, p.337–353.

Dube, A.; Zbytniewski, R.; Kowalkowski, T.; Cukrowska, E.; Buszewski, B. (2001). **Adsorption and migration of heavy metal in soil**. *Polish Journal of Environmental Studies*, v.10, n.1, p.1–10.

Duxbury, T.; Bicknell, B. (1983). **Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils**. *Soil Biology and Biochemistry*, v.15, n.3, p.243–250.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). 1999. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: EMBRAPA. 370p.;

Evtushenko, L.I.; Takeuchi, M. (2003). **The family Microbacteriaceae**. *In*: Rosenberg, E.; Stackebrandt, E.; Thompson, F.; Lory, S.; DeLong, E. *The Prokaryotes*, 3ed., v.3, p.1020–1098.

Garbisu, C.; Alkorta, I. (2003). **Basic concepts on heavy metal soil bioremediation**. *The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection*, v.3, n.1, p.58–66.

Gerhardt, K.E.; Greenberg, B.M.; Click, B.R. (2006). **The role of ACC deaminase in facilitating the phytoremediation of organics, metal and salt**. *Current Trends in Microbiology*, v.2, p.62–73.

Gevers, D.; Dawyndt, P.; Vandamme, P.; Willems, A.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; de Vos, P. (2006). **Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy.** Philosophical Transactions of the Royal Society B, v. 361, p.1911–1916.

Gummersheimer, B.S.; Giblin, T. (2003). **Identification of lead resistant bacteria from a heavily contaminated site.** Bios, v.74, n.2, p.48–54.

Harmsen, D.; Karch, H. **16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. Analysing rRNA genes through the use of high-quality reference databanks provides a powerful method for identifying microorganisms.** Disponível em: <<http://forms.asm.org/CIMrobe/index.asp?bid=24040>>. Acesso em: 20 nov 2012.

Head, I.M. (1998). **Bioremediation: towards a credible technology.** Microbiology, v.144, p.599–608.

Hernandez, A.; Mellado, R.P.; Martinez, J.L. (1998). **Metal accumulation and vanadium-induced multidrug resistance by environmental isolates of *Escherichia hermannii* and *Enterobacter cloacae*.** Applied and Environmental Microbiology, v.64, p.4317–4320.

Hong, S.H.; Ryu, H.W.; Kim, J.; Cho, K.S. (2010). **Rhizoremediation of diesel-contaminated soil using the plant growth-promoting rhizobacterium *Gordonia* sp. S2RP-17.** Biodegradation, v.22, p.593–601.

Huang, X.D.; El-Alawi, Y.; Gurska, J.; Glick, B.R.; Greenberg, B.M. (2005). **A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils.** Microchemical Journal, v.81, p.139–147.

Hunt, D.E.; Klepac-Ceraj, V.; Acinas, S.G.; Gautier, C.; Bertilsson, S.; Polz, M.F. (2006). **Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity.** Applied and Environmental Microbiology, v.72, n.3, p.2221–2225.

Janda, J.M.; Abbot, S.L. (2002). **Bacterial identification for publication: when is enough enough?** Journal of Clinical Microbiology, v.40, n.6, p.1887–1891.

Janda, J.M.; Abbot, S.L. (2007). **16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils and pitfalls.** *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, n.9, p.2761–2764.

Jordan, M.J.; Lechevalier, M.P. (1975). **Effects of zinc-smelter emissions on forest soil microflora.** *Canadian Journal of Microbiology*, v.21, p.1855–1865.

Kampfer, P.; Rosselló-Mora, R.; Scholz, H.C.; Welinder-Olsson, C.; Falsen, E.; Busse, H.-J. (2006). **Description of *Pseudochrobactrum* gen. nov., with the two species *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* sp. nov. and *Pseudochrobactrum saccharolyticum* sp. nov.** *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*, v.56, p.1823–1829.

Kermani, A.J.N.; Ghasemi, M.F.; Khosravan, A.; Farahmand, A.; Shakibaie, M.R. (2010). **Cadmium bioremediation by metal-resistant mutated bacteria isolated from active sludge of industrial effluent.** *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*, v.10, n.4, p.279–286.

Kohler, S.; Belkin, S.; Schmid, R.D. (2000). **Reporter gene bioassays in environmental analysis.** *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v.366, p.769–779.

Koneman, E.W.; Winn, W.; Ellen, S.; Janda, W.; Procop, G.; Schreckenberger, P.; Woods, G. (2008). **Koneman: diagnostico microbiológico texto e atlas colorido.** 6 ed., v.8. 1565p.

Kuiper, I.; Lagendijk, E.L.; Bloemberg, G.V.; Lugtenberg, J.J. (2004). **Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction.** *The American Phytopathological Society*, v.17, p.6–15.

Lee, S.W.; Glickmann, E.; Cooksey, D.A. (2001). **Chromosomal locus for cadmium resistance in *Pseudomonas putida* consisting of a cadmium-transporting ATPase and a MerR family response regulator.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, n.4, p.1437–1444.

Leyval, C.; Turnau, K.; Haselwandter, K. (1997). **Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects.** *Mycorrhiza*, v.7, n.3, p.139–153.

Lima, L.R.A.; Bernadez, L.A. (2010). **Characterization of the lead smelter slag in Santo Amaro, Bahia, Brazil.** *Journal of Hazardous Materials*, v.189, p.692–699.

Links, M.G.; Dumonceaux, T.J.; Hemmingsen, S.M.; Hill, J.E. (2012). **The chaperonin-60 universal target is a barcode for bacteria that enables *de novo* assembly of metagenomic sequence data.** *Plos One*, v.7, n.11, p.e49755.

List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature – LBSN. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/>>. Acesso em: 30 jan 2013.

Machado, S.L.; Ribeiro, L.D.; Kiperstok, A.; Botelho, M.A.B.; Carvalho, M.F. (2004). **Diagnóstico da contaminação por metais pesados em Santo Amaro - BA.** *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.9, n.2, p.140–155.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M. (2010). **Brock Biology of Microorganisms.** 11 ed. 608p.

Magrisso, S.; Ylgal, E.; Belkin, S. (2008). **Microbial reporters of metal bioavailability.** *Microbial Biotechnology*, v.1, n.4, p.320–330.

Malik, A.; Jaiswal, R. (2000). **Metal resistance in Pseudomonas strains isolated from soil treated with industrial wastewater.** *World Journal of Microbiology e Biotechnology*, v.16, p.177–182.

Mignard, S.; Flandrois, J.P. (2006). **16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment.** *Journal of Microbiological Methods*, v.67, p.574–581.

Miller, R.M. (1995). **Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils.** *Environmental Health Perspectives*, v.103, n.1, p.59–62.

Moriwaki, C.; Mazzer, C.; Pazzetto, R.; Matioli, G. (2009). **Avaliação de métodos para manutenção e preservação de bactéria esporulada produtora da enzima CGTase.** *Acta Scientiarum Health Science*, v.31, n.2, p.113–118.

Olson, K.W.; Skogerboe, R.K. (1975). **Identification of soil lead compounds from automotive sources.** *Environmental Science and Technology*, v.9, n.3, p.227–230.

Ostrosky, E.A.; Mizumoto, M.K.; Lima, M.E.L.; Kaneko, T.M.; Nishikawa, S.O.; Freitas, B.R. (2008). **Método para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.2, p.301–307.

Pei, A.; Nossa, C.W.; Chokshi, P.; Blaser, M.J.; Yang, L.; Rosmarin, D.M.; Pei, Z. (2009). **Diversity of 23S rRNA genes within individual prokaryotic genomes.** *Plos One*, v.4, n.5, p.e5437.

Pellegrini, M. (2012). **Mineradora que contaminou cidade de Caetano e Bethânia continua ativa.** *Revista Carta Capital*. Disponível em: <<http://www.cartacapital.com.br/sociedade/mineradora-que-contaminou-cidade-de-caetano-e-bethania-continua-ativa/>>. Acesso em: 20 dez 2012.

Portella, R. B.; Guedes, J.F.C.; Carvalho, I.G.A.; Machado, S.L.; Guimarães, R.B. (2009). **Desativação de uma metalúrgica em Santo Amaro-Ba: passivo ambiental e déficit institucional.** *In: VIII Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica (ECOECO)*. Cuiabá, Mato Grosso. p.1–21.

Rajkumar, M.; Freitas, H. (2008). **Effects of inoculation of plant-growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard.** *Bioresource Technology*, v.99, p.3491–3498.

Rajkumar, M.; Ae, N.; Prasad, M.N.V.; Freitas, H. (2010). **Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction.** *Trends in Biotechnology*, v.28, p.142–149.

Rajkumar, M.; Sandhya, S.; Prasad, M.N.V.; Freitas, H. (2012). **Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation.** *Biotechnology Advances*, v.30, p.1562–1574.

Rathnayake, I.V.N.; Megharaj, M.; Bolan, N.; Naidu, R. (2009). **Tolerance of heavy metal by Gram positive soil bacteria.** *World Academy of Science, Engineering and Technology*, v.53, p.1185–1189.

Ribeiro, L.P.; Volkoff, B.; Melfi, A.J. (1991). **Evolução mineralógica das argilas em solos vérticos do Recôncavo Baiano.** *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v.14, p.263–268.

Ron, E.Z.; Minz, D.; Finkelstein, N.P.; Rosenberg, E. (1992). **Interactions of bacteria with cadmium.** *Biodegradation*, v.3, p.161–170.

Roque, M.R.A.; Melo, I.S. (2000). **Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron.** *Scientia Agricola*, v.57, n.4, p.723–728.

Schleifer, K.H. (2009). **Classification of *Bacteria* and *Archae*: past, present and future.** *Systematic and Applied Microbiology*, v.32, p.533–542.

Silhavy, T.J.; Kahne, D.; Walker, S. (2010). **The bacterial cell envelope.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v.2, n.5, p.1–16.

Silva-Estenico, M.E.; Pacheco, F.T.H.; Rodrigues, J.L.M.; Carrilho, E.; Tsai, S.M. (2005). **Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions.** *Microbiological Research*, v.160, p.429–436.

Silver, S. (1998). **Genes for all metals - a bacterial view of Periodic Table. The 1996 Thom award lecture.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.20, p.1–12.

Sinha, S.; Mukherjee, S.K. (2008). **Cadmium-induced siderophore production by a high Cd-resistant bacterial strain relieved Cd toxicity in plants through root colonization.** *Current Microbiology*, v.56, p.55–60.

Sobral, L.G.S. **Santo Amaro**. Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/santo_amaro>. Acesso em: 17 dez 2012.

Swofford, D. L. (2000). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Disponível em: <<http://paup.csit.fsu.edu/>>. Acesso em: 30 ago 2012.

Tauriainen, S.M.; Virta, M.P.J.; Karp, M.T. (2000). **Detecting bioavailable toxic metals and metalloids from natural water samples using luminescent sensor bacteria**. Water Research, v.34, n.10, p.2661–2666.

Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; de Vos, P.; Kersters, K.; Swings, J. (1996). **Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic**. Microbiological Reviews, v.60, n.2, p.407–438.

Walter, B.M.T.; Cavalcanti, T.B. (2005). **Herbário e coleta de germoplasma**. In: Walter, B.M.T.; Cavalcanti, T.B. Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal, 1 ed., p.217–240.

Wang, L.-T.; Lee, F.-L.; Tai, C.-J.; Kasai, H. (2007). **Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.57, p.1846–1850.

Woese, C. R. (1987). **Bacterial evolution**. Microbiology Reviews, v.51, p.221–271.

Woese, C. R.; Stackebrandt, E.; Macke, T.J.; Fox, G.E. (1985). **A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa**. Systematic and Applied Microbiology, v.6, p.143–151.

Yan-de, J.; Zhen-li, H.; Xiao-e, Y. (2006). **Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils**. Journal of Zhejiang University, v.8, n.3, p.192–207.

Yoon, J.-H.; Weiss, N.; Kang, K.H.; Oh, T.-K.; Park, Y.-H. (2003). ***Planococcus maritimus* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat in Korea**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.53, p.2013–2017.

Youssef, N.; Sheik, C.S.; Krumholz, L.R.; Najar, F.Z.; Roe, B.A.; Elshahed, M.S. (2009). **Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.75, p.5227–5236.

Zeng, X.; Tang, J.; Yin, H.; Liu, X.; Jiang, P.; Liu, H. (2010). **Isolation, identification and cadmium adsorption of high cadmium-resistant *Paecilomyces lilacinus*.** *African Journal of Biotechnology*, v.9, n.27, p.6525–6533.

9 ANEXO

9.1 ORIENTAÇÃO PARA AS FOTOS

Família	Espécie	Código da foto	N da foto Controle	N da foto Pb	N da foto Cd
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i> sp.1 (2103.16)	9ou6.3	59(VII); 62(XXIX)	80(XXI); 80(XXIII); 80(XXVI); 83(XI); 86(X)	70(XXI); 72(XIX); 74(IX)
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i> sp.2 (2086.31)	H2	60(XVI); 62(XXXII)	76(XIII); 78(VII); 83(XII)	69(IX); 71(IX)
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i> sp.2 (2086.33)	H5	62(XXX)	78(VII); 80(XXV); 83(XII); 82(XVII)	69(IX); 71(IX); 74(IV); 77(IV)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2070.06)	A10	59(IV)	64(III); 75(II); 78(II); 84(XXIV); 85(II)	69(I); 73(XX)
Bacillaceae	<i>Bacillu</i> Grupo <i>cereus</i> (2070.15)	A23	63(XXXVII)	64(IV); 75(III); 81(XXVIII); 81(XXXIX); 84(XIX); 85(III)	69(II); 73(XXI)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2085.10)	RUB1		Sem foto	70(XVI); 72(XIII); 74(X); 77(VII)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2086.13)	B6	63(XXXVIII)	64(I); 75(IV); 81(XXX); 83(X); 84(XXI); 85(IV)	69(IV); 71(II); 73(XXII); 74(X); 77(VII)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2086.19)	D4	62(XXX); 63(XXXIX)	75(VII); 75(VIII); 76(XII); 78(V); 79(XV); 80(XXV); 81(XXXI); 82(I); 82(XVII); 84(XXII); 85(VI); 86(XI); 86(XIII)	Sem foto
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2086.21)	D7	60(XII)	75(VII); 75(VIII); 78(V); 79(XV); 82(I); 85(VII)	69(X); 71(V)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2086.22)	D9	62(XXX); 63(XXXIX)	75(VII); 75(VIII); 76(XII); 78(V);	sem foto

				79(XV); 80(XXV); 81(XXXI); 82(I); 82(XVII); 84(XXII); 85(VI); 86(XI); 86(XIII)	
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2086.25)	D14	62(XXX)	75(IX); 78(IV); 80(XIX); 80(XXV); 82(II); 82(XVII); 85(VII); 86(XI)	69(V); 71(VI); 74(I); 77(I)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2103.30)	3737.8	59(II); 62(XXXVI)	76(XIX); 78(VIII); 79(XII); 82(VI); 84(XXV)	65(IV); 66(V); 67(V); 68(V); 70(XIX)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2103.32)	D13	59(VIII)	75(IX); 78(IV); 80(XIX); 82(II); 85(VII)	69(V); 71(VI); 74(I); 77(I)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2114.01)	A3	59(III)	64(II); 75(I); 78(I); 85(I)	69(I)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2114.21)	3738.4	59(V)	76(XVI); 79(X); 82(VII); 82(VIII); 86(XVI)	70(XX); 72(XVIII)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2117.22)	LUD3		76(XIV); 79(XVI); 79(XVII); 82(IV)	69(IX); 71(IX)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2118.08)	HP2	63(XXXIX)	76(XII); 81(XXXI); 84(XXII); 86(XIII)	69(XI); 72(X)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2118.09)	HP3	63(XXXIX)	76(XII); 81(XXXI); 84(XXII); 86(XIII)	69(XI); 72(X)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2070.01)	A1	59(III)	64(II); 75(I); 78(I); 84(XXVI); 85(I)	65(I); 66(I); 67(I); 68(I); 69(I)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2070.08)	A13	59(IV)	64(III); 75(II); 78(II); 84(XXIV); 85(II)	65(I); 66(I); 67(I); 68(I); 69(II); 73(XX)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2070.10)	A19		64(IV); 75(III); 85(III)	65(II); 66(II); 67(II); 68(II); 69(II); 73(XXI)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i>	A31		64(I);	69(IV);

	(2070.20)			64(V); 75(IV); 85(IV)	71(II); 73(XXII)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2085.02)	B15	62(XXVIII)	75(V); 80(XXVII); 84(XX); 85(V)	69(V); 71(VI)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2085.06)	B19		75(VI); 78(III); 78(VI)	65(III); 66(III); 67(III); 68(III); 69(VI); 71(IV)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2086.04)	A18	59(IV)	64(III); 75(II); 78(II); 84(XXIV); 85(II)	65(II); 66(II); 67(II); 68(II); 69(II); 73(XX)
Bacillaceae	<i>Bacillus nealsonii</i> (2086.10)	B3	63(XXXVIII)	64(I); 64(V); 75(IV); 81(XXX); 83(X); 84(XXI); 85(IV)	73(XXII); 74(X); 77(VIII)
Bacillaceae	<i>Bacillus nealsonii</i> (2114.06)	C4	59(VII)	80(XXI); 80(XXIII); 80(XXVI); 83(XI); 86(X)	65(III); 66(III); 67(III); 68(III); 69(VI); 71(IV)
Bacillaceae	<i>Exiguobacterium acetylicum-indicum</i> (2085.01)	B11	62(XXVIII)	75(V); 80(XXVII); 84(XX); 85(V)	69(V); 71(VI)
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (2085.11)	RUB2	62(XXXIII)	80(XXIV); 83(XIV)	70(XVI); 72(XIII)
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (2086.18)	D2	60(XI)	75(VII); 75(VIII); 78(V); 79(XV); 82(I); 85(VI)	69(X); 71(V)
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (2114.09)	D20	60(XIV)	75(IX); 78(IV); 80(XIX); 82(II); 85(VII)	69(X); 71(VI)
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (2118.10)	HP4		Sem foto	69(XI); 72(X); 77(IV)
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (2120.02)	PIP2	62(XXXIII)	80(XXIV); 83(XIV)	69(XII); 72(XII)
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus macroides-boronitolerans</i> (2114.12)	PO1	60(XVIII)	79(XVIII); 82(III); 85(VIII)	69(XII); 72(XII)
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus macroides-boronitolerans</i> (2114.13)	PO2	60(XVIII)	79(XVIII); 82(III); 85(VIII)	69(XII); 72(XII)
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (2085.12)	MCID1	62(XXXIII)	80(XXIV); 83(XIV)	65(V); 66(IV); 67(IV); 68(IV);

					70(XVI); 72(XIII)
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (2117.20)	LUD1	Sem foto	76(XIV); 79(XVI); 82(IV)	65(III); 66(III); 67(III); 68(III); 69(IX); 71(IX)
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (2117.21)	LUD2	Sem foto	76(XIV); 79(XVI); 82(IV)	65(V); 66(IV); 67(IV); 68(IV); 69(IX); 71(IX)
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (2117.24)	STA4	62(XXXIII)	80(XXIV); 83(XIV)	70(XVI); 72(XIII)
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (2118.12)	MCID2	62(XXXIII)	80(XXIV); 83(XIV)	65(V); 66(IV); 67(IV); 68(IV); 70(XVI); 72(XIII)
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> (2117.13)	3741.1	59(VI)	76(X); 76(XI); 80(XX); 82(IX); 86(XII)	65(IV); 66(V); 67(V); 68(V); 70(XXI); 72(XIX)
Brucellaceae	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum-asaccharolyticum</i> (2117.05)	3736.1	Sem foto	76(XV); 80(XXII); 83(XVIII)	70(XVIII); 72(XVII)
Comamonadaceae	<i>Comamonas testosteroni</i> (2117.16)	3741.4	59(VI); 62(XXXIII); 63(XL)	76(X); 76(XI); 76(XIII); 80(XX); 80(XXIV); 82(IX); 83(XIV); 86(XII); 86(XV)	70(XVIII); 72(XVII)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.1 (2114.04)	B14	62(XXVIII)	75(V); 80(XXVII); 84(XX); 85(V)	69(V); 71(VI)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.10 (2086.14)	B7	63(XXXVIII)	64(I); 64(V); 75(IV); 81(XXX); 83(X); 84(XXI); 85(IV)	65(III); 66(III); 67(III); 68(III); 73(XXII)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.10 (2246.07)	O3	63(XL)	84(XXIII); 86(XIV)	sem foto
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.11 (2103.23)	3737.1	61(XXII)	78(VII); 83(XII)	70(XIX)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.12 (2114.10)	M1	61(XXI)	78(VII); 83(XII)	70(XVII); 72(XVI); 74(IV); 74(VI)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.2 (2246.08)	T2	62(XXXI)	84(XXIII); 86(XIV)	70(XVII); 71(VII); 72(XVI); 74(VI)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.3 (2086.23)	D11	59(IX)	75(VII); 75(VIII);	69(X); 71(V)

				78(V); 79(XV); 82(I); 85(VI)	
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.3 (2246.02)	E3	62(XXXI)	84(XXIII); 86(XIV)	74(IV)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.4 (2114.14)	3733.1	59(I)	76(XVII); 76(XVIII); 78(IX); 79(XIV); 82(V); 85(IX); 86(XVIII)	69(X); 71(V)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.5 (2070.07)	A11	59(IV)	64(III); 75(II); 78(II); 84(XXIV); 85(II)	66(I); 67(I); 68(I); 69(I); 73(XX)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.6 (2085.08)	C6	59(VII); 62(XXIX)	80(XXI); 80(XXIII); 80(XXVI); 83(XI); 86(X)	65(III); 66(III); 67(III); 68(III); 69(VI); 71(IV)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.7 (2070.09)	A15	59(IV)	64(III); 75(II); 78(II); 84(XXIV); 85(II)	73(XX)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.8 (2086.01)	A8	59(III)	64(II); 75(I); 78(I); 84(XXVI); 85(I)	sem foto
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.9 (2118.13)	PIP1	61(XXVI)	79(XVIII); 82(III); 85(VIII)	69(XII); 72(XII); 72(XIV); 74(IV)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp. nov.1 (2117.04)	3734.4	59(I)	76(XVII); 76(XVIII); 78(IX); 79(XIV); 82(V); 85(IX); 86(XVIII)	
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter cancerogenus</i> (2086.16)	B9	63(XXXVIII)	75(V); 81(XXX); 83(X); 84(XXI); 85(V)	71(VII); 74(IX)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter cf. cloacae</i> (2085.07)	C5	59(VII); 62(XXIX)	80(XXI); 80(XXIII); 80(XXVI); 83(XI); 86(X)	65(III); 66(III); 67(III); 68(III); 69(VI); 71(IV)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter cf. cloacae</i> (2086.05)	A22	63(XXXVII)	64(IV); 75(III); 81(XXVIII); 81(XXIX); 84(XIX); 85(III)	73(XXI)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter cf. cloacae</i> (2086.28)	D19	60(XIV)	75(IX); 78(IV); 80(XIX); 82(II); 85(VII)	69(V); 69(VIII); 71(VI); 71(VII);

					77(VI)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter cf. cloacae</i> (2114.05)	C3	59(VII); 62(XXIX)	80(XXI); 80(XXIII); 80(XXVI); 83(XI); 86(X)	69(VI); 71(IV)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter cf. cloacae</i> (2114.08)	D12	59(IX)	75(VII); 75(VIII); 78(V); 79(XV); 82(I); 85(VI)	71(VII)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter hormaechei</i> (2086.11)	B4	63(XXXVIII)	64(I); 64(V); 75(IV); 81(XXX); 83(X); 84(XXI); 85(IV)	69(IV); 71(II); 73(XXII); 74(X); 77(VIII)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter hormaechei</i> (2086.15)	B8	63(XXXVIII)	75(V); 81(XXX); 83(X); 84(XXI); 85(V)	69(IV); 71(II)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter hormaechei</i> (2086.26)	D17	60(XV)	75(IX); 78(IV); 80(XIX); 82(II); 85(VII)	69(V); 71(VI); 74(I); 77(I)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter hormaechei</i> (2117.23)	A6	59(III)	64(II); 75(I); 78(I); 84(XXVI); 85(I)	69(I)
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter kobei</i> (2120.04)	ARO2			70(XIV); 71(VIII); 74(I); 77(I); 77(IV)
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> sp.2 (2103.28)	3737.6	59(II); 62(XXXVI)	76(XIX); 78(VIII); 79(XII); 82(VI); 84(XXV); 86(XVII)	70(XIX)
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> sp.3 (2086.36)	LEO1	60(XVII)	75(IX); 78(IV); 80(XIX); 82(II); 85(VII)	70(XV); 72(XI); 74(III); 77(II)
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> sp.3 (2118.04)	ARO1	61(XXIII)	79(XVIII); 82(III); 85(VIII)	70(XIV); 71(VIII); 74(I); 77(I)
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> sp.3 (2118.11)	LEO2	61(XXIII)	79(XVIII); 82(III); 85(VIII)	70(XV); 72(XI); 74(III); 77(II)
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> sp.4 (2117.02)	3734.2	59(I)	76(XVII); 76(XVIII); 78(IX); 79(XIV); 82(V); 85(IX); 86(XVIII)	sem foto
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> sp.4	3741.6	59(VI)	76(X);	70(XXI);

e	(2117.18)			76(XI); 80(XX); 82(IX); 86(XII)	72(XIX)
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> sp.4 (2114.16)	3733.3	59(I)	76(XVII); 76(XVIII); 78(IX); 79(XIV); 82(V); 85(IX); 86(XVIII)	sem foto
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> sp.4 (2246.04)	J1	62(XXXI)	84(XXIII); 86(XIV)	69(VII)
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter amalonaticus-farmeri</i> (2086.27)	D18	60(XV)	75(IX); 78(IV); 80(XIX); 82(II); 85(VII)	69(V); 71(VI)
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> cf. <i>werkmanii</i> (2103.17)	9OU6.4	62(XXXV)	76(XIII); 83(XIII); 83(XVI)	70(XIII); 70(XXI); 72(XIV); 72(XIX); 74(IX)
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i> (2103.20)	3707.3	62(XXXVI)	76(XIV); 79(XVI); 82(IV); 86(XVII)	65(V); 66(IV); 67(IV); 68(IV); 70(XV); 72(XI)
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i> cf. <i>variicola</i> (2085.15)	J2	61(XXI)	78(VII); 83(XII)	71(III); 74(VII)
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i> cf. <i>variicola</i> (2086.20)	D6	60(XII)	75(VII); 75(VIII); 78(V); 79(XV); 82(I); 85(VI)	69(X); 71(V); 74(V)
Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i> cf. <i>anthophila-aglomerans</i> (2086.03)	A14	59(IV); 62(XXXII)	64(III); 75(II); 78(II); 84(XXIV); 85(II)	66(I); 67(I); 68(I); 69(II); 73(XX)
Enterobacteriaceae	<i>Pantoea eucrina</i> (2086.02)	A12	59(IV)	64(III); 75(II); 78(II); 84(XXIV); 85(II)	66(I); 67(I); 68(I); 69(II); 73(XX)
Enterobacteriaceae	<i>Pantoea eucrina</i> (2086.06)	A26	63(XXXVII)	64(IV); 75(III); 81(XXXVIII); 81(XXIX); 84(XIX); 85(III)	69(III); 69(VI); 71(I); 71(IV); 73(XXI)
Enterobacteriaceae	<i>Pantoea eucrina</i> (2086.08)	A30	62(XXVIII)	64(I); 64(V); 75(IV); 80(XXVII); 84(XX); 84(XXVI); 85(IV)	69(IV); 71(II); 73(XXII)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.1 (2103.15)	9ou6.2	59(VII); 62(XXIX)	80(XXI); 80(XXIII); 80(XXVI); 83(XI); 86(X)	70(XXI); 72(XIX); 74(I); 77(I)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.1 (2246.05)	H3	63(XL)	84(XXIII);	sem foto

e				86(XIV)	
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.1(2086.30)	H1	60(XVI)	78(VII); 83(XII)	69(IX); 71(IX); 74(III); 77(II)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.2 (2114.24)	3739.4	59(V)	76(XVI); 79(X); 82(VII); 82(VIII); 86(XVI)	70(XX); 72(XVIII)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.2 (2117.07)	3736.3	62(XXXVI)	76(XV); 80(XXII); 83(XVIII); 86(XVII)	70(XVIII); 72(XVII); 74(X); 77(VIII)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.3 (2117.11)	3740.1	61(XXVII)	79(XVIII); 82(III); 85(VIII)	70(XIV); 71(VIII); 74(VII); 77(VII)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.3 (2103.19)	3707.2	62(XXXVI)	76(XIV); 79(XVI); 79(XVII); 82(IV); 86(XVII)	70(XV); 72(XI); 74(VII); 77(VII)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.4 (2114.22)	3739.1	59(V)	76(XVI); 79(X); 82(VII); 82(VIII); 86(XVI)	70(XX); 72(XVIII)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.5 (2117.09)	3738.2	59(V)	76(XVI); 79(X); 79(XI); 82(VII); 82(VIII); 86(XVI)	70(XX); 72(XVIII); 74(VII); 77(VII)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.6 (2070.16)	A24	63(XXXVII)	64(IV); 75(III); 81(XXVIII); 81(XXIX); 84(XIX); 85(III)	73(XXI)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.6 (2086.07)	A28	63(XXXVII)	64(IV); 75(III); 81(XXVIII); 81(XXIX); 84(XIX); 85(III)	73(XXI)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.6 (2070.03)	A4	59(III)	64(II); 75(I); 78(I); 84(XXVI); 85(I)	74(II); 77(III)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.6 (2070.19)	A29	63(XXXVII)	64(I); 64(V); 75(IV); 81(XXVIII); 81(XXIX); 84(XIX); 85(IV)	69(III); 71(I); 73(XXII); 74(V); 77(VII)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.7 (2085.13)	EM1	61(XX)	75(VI); 78(III); 78(VI); 83(XIII); 83(XVI); 86(XV)	69(XII); 72(XII); 74(I); 74(V); 77(I); 77(VII)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.7 (2103.21)	3707.4	62(XXXVI)	76(XIV); 79(XVI);	70(XV); 72(XI);

				82(IV); 86(XVII)	74(II); 74(VII); 77(III); 77(VII)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.7 (2085.16)	STA3	Sem foto	Sem foto	70(XVI); 72(XIII); 74(III); 74(V); 77(II); 77(IV); 77(V)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.7 (2086.29)	E1	62(XXXII); 61(XXII)	78(VII)	69(XI); 72(X); 74(II); 77(III)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.7 (2086.32)	H4	61(XIX)	78(VII); 83(XII)	69(IX); 71(IX); 74(III); 77(II)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.7 (2086.34)	STA1	62(XXXIII)	80(XXIV); 83(XIV); 83(XV)	70(XVI); 72(XIII); 74(III); 74(V); 77(II); 77(V)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.7 (2086.35)	STA2	62(XXXIII)	80(XXIV); 83(XIV); 83(XV)	70(XVI); 72(XIII); 74(III); 74(V); 77(II); 77(V)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.7 (2103.22)	3707.5	62(XXXVI)	76(XIV); 79(XVI); 82(IV); 86(XVII)	70(XV); 72(XI); 74(II); 74(VII); 77(III); 77(VII)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.7 (2103.24)	3737.2	59(II); 62(XXXVI)	76(XIX); 78(VIII); 79(XII); 79(XIII); 82(VI); 84(XXV); 86(XVII)	69(VII); 70(XIX); 71(III); 74(II); 77(III)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.7 (2114.19)	3738.1	59(V)	76(XVI); 79(X); 79(XI); 82(VII); 82(VIII); 86(XVI)	70(XX); 72(XVIII); 74(VII); 77(VII)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.7 (2114.23)	3739.2	59(V)	76(XVI); 79(X); 82(VII); 82(VIII); 86(XVI)	70(XX); 72(XVIII)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.7 (2117.12)	3740.2	59(II)	76(XIX); 78(VIII); 79(XII); 79(XIII); 82(VI); 84(XXV); 86(XVII)	70(XIV); 71(VIII); 74(II); 77(III)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia nematodiphila</i> (2114.20)	3738.3	59(V)	76(XVI); 79(X); 82(VII); 82(VIII);	70(XX); 72(XVIII); 74(IX); 77(VII)

				86(XVI)	
Enterobacteriaceae	<i>Serratia nematodiphila</i> (2118.14)	T1	61(XXIV); 62(XXXV)	75(VI); 78(III); 78(VI); 83(XIII); 83(XVI)	69(XII); 72(XII); 74(V); 77(VII)
Enterobacteriaceae	<i>Serratia nematodiphila</i> (2246.03)	EM2	61(XX); 62(XXXII)	75(VI); 78(III); 78(VI); 83(XIII); 83(XVI); 86(XV)	71(VIII)
Enterobacteriaceae	<i>Providencia</i> sp.2 (2103.27)	3737.5	59(II)	76(XIX); 78(VIII); 79(XII); 82(VI); 84(XXV)	70(XIX); 74(II); 77(III)
Enterobacteriaceae	<i>Providencia</i> sp.1 (2117.03)	3734.3	59(I)	76(XVII); 76(XVIII); 78(IX); 79(XIV); 82(V); 85(IX); 86(XVIII)	69(VII); 71(III)
Enterobacteriaceae	<i>Providencia</i> sp.2 (2103.29)	3737.7	59(II)	76(XIX); 78(VIII); 79(XII); 82(VI); 84(XXV)	70(XIX); 74(II); 77(III)
Enterobacteriaceae	<i>Providencia</i> sp.2 (2118.03)	AA2	63(XXXIX)	76(XII); 81(XXXI); 84(XXII); 86(XIII)	69(XI); 72(X); 74(III); 77(II)
Enterobacteriaceae	<i>Providencia alcalifaciens-rustigianii</i> (2118.07)	HP1	63(XXXIX)	76(XII); 81(XXXI); 84(XXII); 86(XIII)	69(XI); 72(X); 72(XIV); 74(IX)
Enterococcaceae	<i>Enterococcus gallinarum-casseliflavus</i> (2085.05)	B18	61(XXV); 62(XXVIII); 62(XXX)	75(VI); 78(III); 78(VI); 80(XXVII); 84(XX); 86(XI)	69(VI); 71(IV)
Enterococcaceae	<i>Enterococcus gallinarum-casseliflavus</i> (2085.09)	C7	59(VII)	80(XXI); 80(XXIII); 80(XXVI); 83(XI); 86(X)	sem foto
Microbacteriaceae	<i>Leucobacter aff. chromiireducens</i> (2114.07)	D8	60(XIII)	75(VII); 75(VIII); 78(V); 79(XV); 82(I); 85(VI)	69(X); 71(V)
Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i> sp.1 (2085.03)	B16	60(X); 62(XXVIII); 62(XXX)	78(III); 78(VI); 80(XXVII); 84(XX); 86(XI)	69(VII); 69(VIII); 71(III); 71(VII)
Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i> sp.2 (2086.17)	B10	62(XXVIII); 62(XXX); 63(XL)	75(V); 80(XXVII); 84(XX); 85(V); 86(XI)	69(XII); 71(VII); 72(XII); 74(IX)
Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i> sp.1 (2070.04)	A5	59(III)	64(II); 75(I);	65(I); 66(I);

				78(I); 84(XXVI); 85(I)	67(I); 68(I); 69(I)
Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i> sp.1 (2070.11)	A20	63(XXXVII)	64(IV); 75(III); 81(XXVIII); 81(XXIX); 84(XIX); 85(III)	65(II); 66(II); 67(II); 68(II); 73(XXI)
Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i> sp.1 (2070.12)	A21	63(XXXVII)	64(IV); 75(III); 81(XXVIII); 81(XXIX); 84(XIX); 85(III)	65(II); 66(II); 67(II); 68(II); 69(II); 73(XXI)
Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i> sp.2 (2085.04)	B17		75(VI); 78(III); 78(VI)	sem foto
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> sp.1 (2114.15)	3733.2	59(I)	76(XVII); 76(XVIII); 78(IX); 79(XIV); 82(V); 85(IX); 86(XVIII)	sem foto
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2070.02)	A2	59(III)	64(II); 75(I); 78(I); 84(XXVI); 85(I)	66(I); 67(I); 68(I); 69(I)
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2070.05)	A9	59(III)	64(II); 75(I); 78(I); 84(XXVI); 85(I)	66(I); 67(I); 68(I); 69(I)
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2086.09)	B2	63(XXXVIII)	64(I); 64(V); 75(IV); 81(XXX); 83(X); 84(XXI); 85(IV)	69(IV); 71(II); 73(XXII)
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2114.11)	O4	59(VI); 62(XXXIV)	76(X); 76(XI); 80(XX); 82(IX); 86(XII)	69(XI); 72(X)
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2118.01)	A16	59(IV)	64(III); 75(II); 78(II); 84(XXIV); 85(II)	65(II); 69(II); 73(XX)
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2246.01)	E2	62(XXXI)	84(XXIII); 86(XIV)	74(IV)
Planococcaceae	<i>Kurthia</i> sp. nov.1 (2103.25)	3737.3	59(II); 62(XXXII)	76(XIII); 76(XIX); 78(VIII); 79(XII); 80(XXV); 82(VI); 82(XVII); 84(XXV); 86(XV)	70(XIX)
Planococcaceae	<i>Kurthia</i> sp. nov.1) (2103.26)	3737.4	59(II)	76(XIX); 78(VIII); 79(XII);	65(IV); 66(V); 67(V);

				82(VI); 84(XXV)	68(V); 70(XIX)
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.1 (2114.03)	B12	62(XXVIII)	75(V); 80(XXVII); 84(XX); 85(V)	69(V); 71(VI)
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.2 (2114.18)	3736.4		76(XV); 80(XXII); 83(XVIII)	65(V); 66(IV); 67(IV); 68(IV); 70(XVIII); 72(XVII)
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.2 (2117.06)	3736.2		76(XV); 80(XXII); 83(XVIII)	65(V); 66(IV); 67(IV); 68(IV); 70(XVIII); 72(XVII)
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.3 (2117.01)	3734.1	59(I)	76(XVII); 76(XVIII); 78(IX); 79(XIV); 82(V); 85(IX); 86(XVIII)	69(X); 71(V); 74(VII)
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2117.10)	3739.3	59(V); 62(XXXII)	76(XIII); 76(XVI); 79(X); 80(XXV); 82(VII); 82(VIII); 82(XVII); 86(XV); 86(XVI)	70(XX); 72(XVIII)
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> cf. <i>mosselii</i> (2114.17)	3733.4	59(I); 62(XXXII)	76(XIII); 76(XVII); 76(XVIII); 78(IX); 79(XIV); 80(XXV); 82(V); 82(XVII); 85(IX); 86(XV); 86(XVIII)	70(XIII); 70(XVII); 72(XV); 72(XVI); 74(VI); 74(VIII); 77(VI)
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> cf. <i>mosselii</i> (2117.19)	3741.7	59(VI)	76(X); 76(XI); 80(XX); 82(IX); 86(XII)	70(XVIII); 72(XVII)
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus warnerii</i> (2086.12)	B5	62(XXX); 63(XXXVIII); 63(XL)	75(V); 81(XXX); 83(X); 84(XXI); 85(V); 86(XI)	69(IV); 71(II)
Streptococcaceae	<i>Lactococcus garvieae</i> (2086.37)	LOB1	61(XXVI); 62(XXXIV)	79(XVIII); 82(III); 85(VIII)	69(VII); 71(III)
Streptococcaceae	<i>Lactococcus garvieae</i> (2086.38)	LEG1	60(XVII)	75(IX); 78(IV); 80(XIX); 82(II); 85(VII)	65(III); 66(III); 67(III); 68(III); 69(XI); 72(X)
Streptococcaceae	<i>Lactococcus garvieae</i> (2086.39)	CU1		76(XV); 80(XXII);	69(VII); 70(XIII);

				83(XVIII)	71(III); 72(XIV)
Streptococcaceae	<i>Lactococcus garvieae</i> (2086.42)	AC1		76(XV); 80(XXII); 83(XVIII)	69(VII); 71(III)
Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i> (2086.41)	SC1	61(XXVII)	79(XVIII); 82(III); 85(VIII)	70(XVII); 72(XIV); 72(XVI); 74(IV); 74(VI)
Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i> (2086.43)	CONV1		76(XV); 80(XXII); 83(XVIII)	69(VII); 70(XIII); 71(III); 72(XIV); 74(IV); 77(VI)
Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas cf. pavanii-maltophilia</i> (2103.18)	3707.1	Sem foto	76(XIV); 79(XVI); 79(XVII); 82(IV)	70(XV); 72(XI); 72(XIV)
Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas cf. pavanii-maltophilia</i> (2117.08)	3736.5	Sem foto	76(XV); 80(XXII); 83(XVIII)	70(XVIII)
Sem identificação Molecular	Sem identificação Molecular	3740.3	62(XXXVI)	Sem foto	sem foto
Sem identificação Molecular	Sem identificação Molecular	3741.2	59(VI); 62(XXXII)	76(X); 76(XI); 80(XX); 80(XXV); 82(IX); 82(XVII); 86(XII); 86(XV)	70(XVII); 70(XXI); 72(XVI); 72(XIX); 74(VI)
Sem identificação Molecular	Sem identificação Molecular	3741.3	59(VI); 63(XL)	76(X); 76(XI); 76(XIII); 80(XX); 82(IX); 86(XII); 86(XV)	70(XVIII); 72(XVII)
Sem identificação Molecular	Sem identificação Molecular	3741.5	59(VI)	76(X); 76(XI); 80(XX); 82(IX); 86(XII)	70(XXI); 72(XIX); 74(X); 77(VIII)
Sem identificação Molecular	Sem identificação Molecular	9ou6.1	59(VII); 62(XXIX)	80(XXI); 80(XXIII); 80(XXVI); 83(XI); 86(X)	70(XXI); 72(XIV); 72(XIX); 74(IX)
Sem identificação Molecular	Sem identificação Molecular	A17	63(XXXIX)	76(XII); 81(XXXI); 84(XXII); 86(XIII)	69(VI); 71(IV); 71(VII); 74(IX)
Sem identificação Molecular	Sem identificação Molecular	AA1	Sem foto	Sem foto	70(XIV); 71(VIII); 74(I); 77(I); 77(IV)
Sem identificação Molecular	Sem identificação Molecular	AROX3	Sem foto	Sem foto	70(XIV); 71(VIII)
Sem identificação Molecular	Sem identificação Molecular	GO1	63(XXXIX)	76(XII); 81(XXXI); 84(XXII); 86(XIII)	65(V); 66(IV); 67(IV); 68(IV); 70(XIV); 71(VIII)
Sem identificação Molecular	Sem identificação Molecular	GO2	Sem foto	Sem foto	65(V); 66(IV); 67(IV); 68(IV);

					70(XIV); 71(VIII); 77(IV)
Sem identificação Molecular	Sem identificação Molecular	LEO3	Sem foto	Sem foto	65(III); 66(III); 67(III); 68(III); 70(XV); 72(XI)
Sem identificação Molecular	Sem identificação Molecular	M2	62(XXXI)	84(XXIII); 86(XIV)	70(XVII); 72(XVI); 74(IV); 74(VI)
Sem identificação Molecular	Sem identificação Molecular	O1	63(XL)	84(XXIII); 86(XIV)	sem foto
Sem identificação Molecular	Sem identificação Molecular	O2	63(XL)	Sem foto	70(XVII); 72(XVI); 74(VI)
Sem identificação Molecular	Sem identificação Molecular	T3	61(XXIV); 62(XXXV)	75(VI); 78(III); 78(VI); 83(XIII); 83(XVI)	69(XII); 72(XII)



Figura 59: Bactérias em controle negativo.



Figura 60: Bactérias em controle negativo.



Figura 61: Bactérias em controle negativo.



Figura 62: Bactérias em controle negativo.

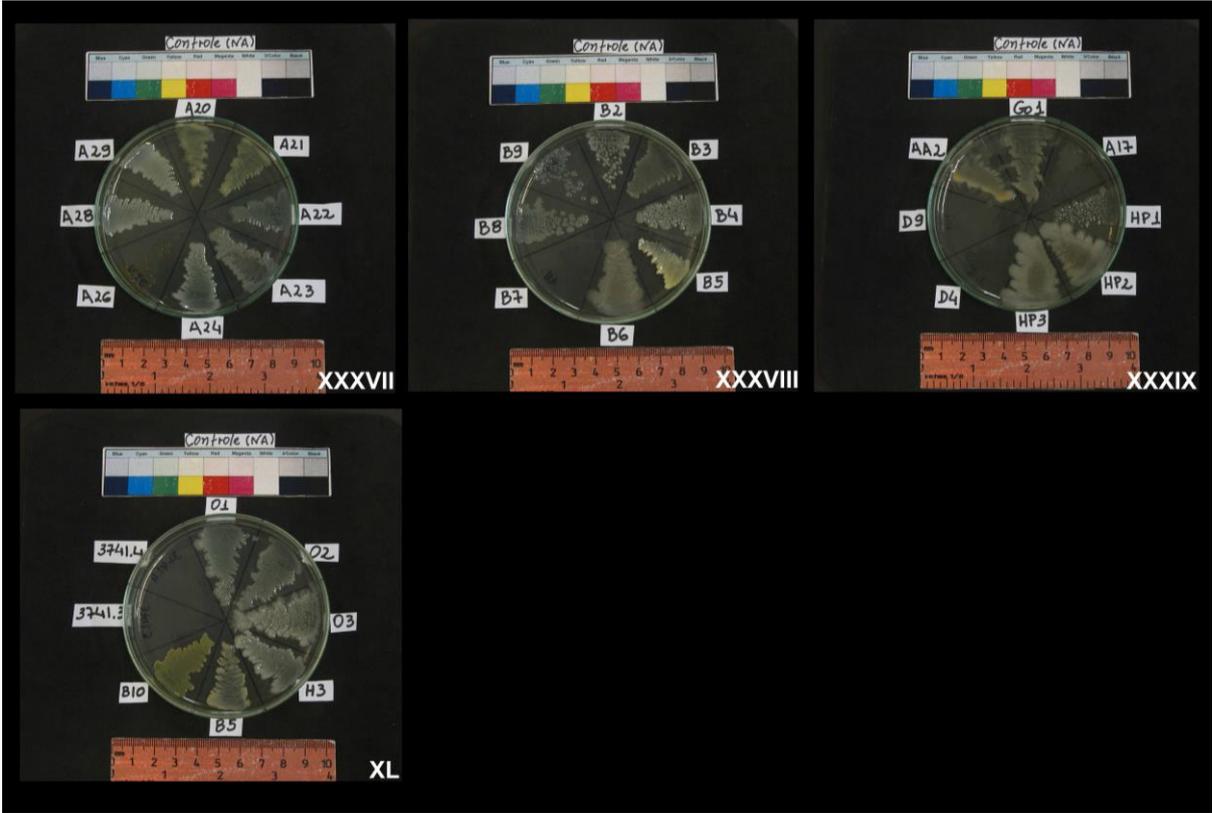


Figura 63: Bactérias em controle negativo.



Figura 64: Bactérias em meio com concentração 3,2 de chumbo.

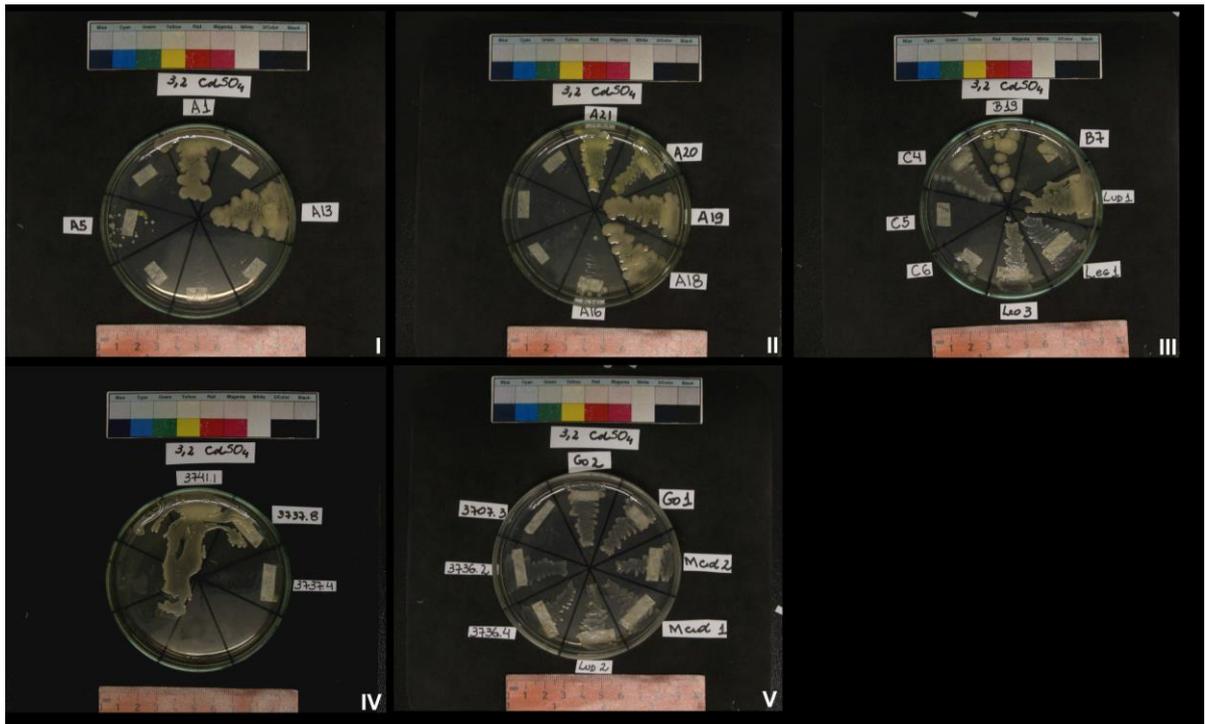


Figura 65: Bactérias em meio com concentração 3,2 de cádmio.

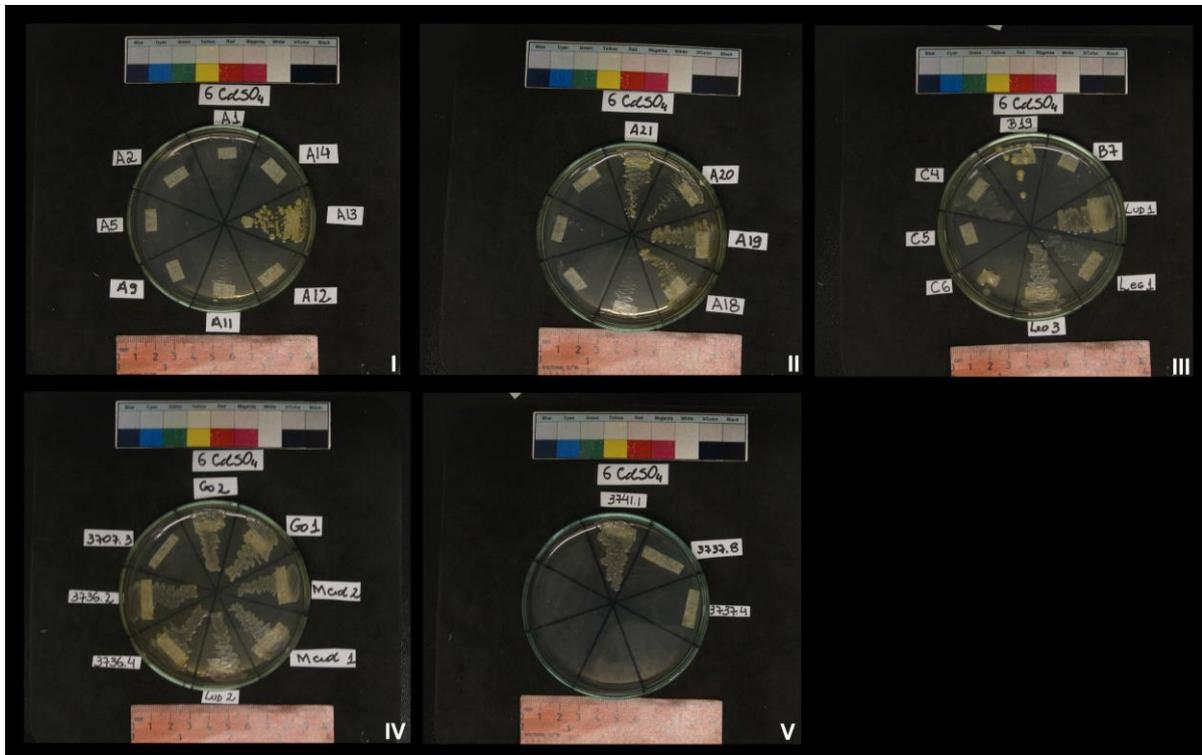


Figura 66: Bactérias em meio com concentração 6 de cádmio.

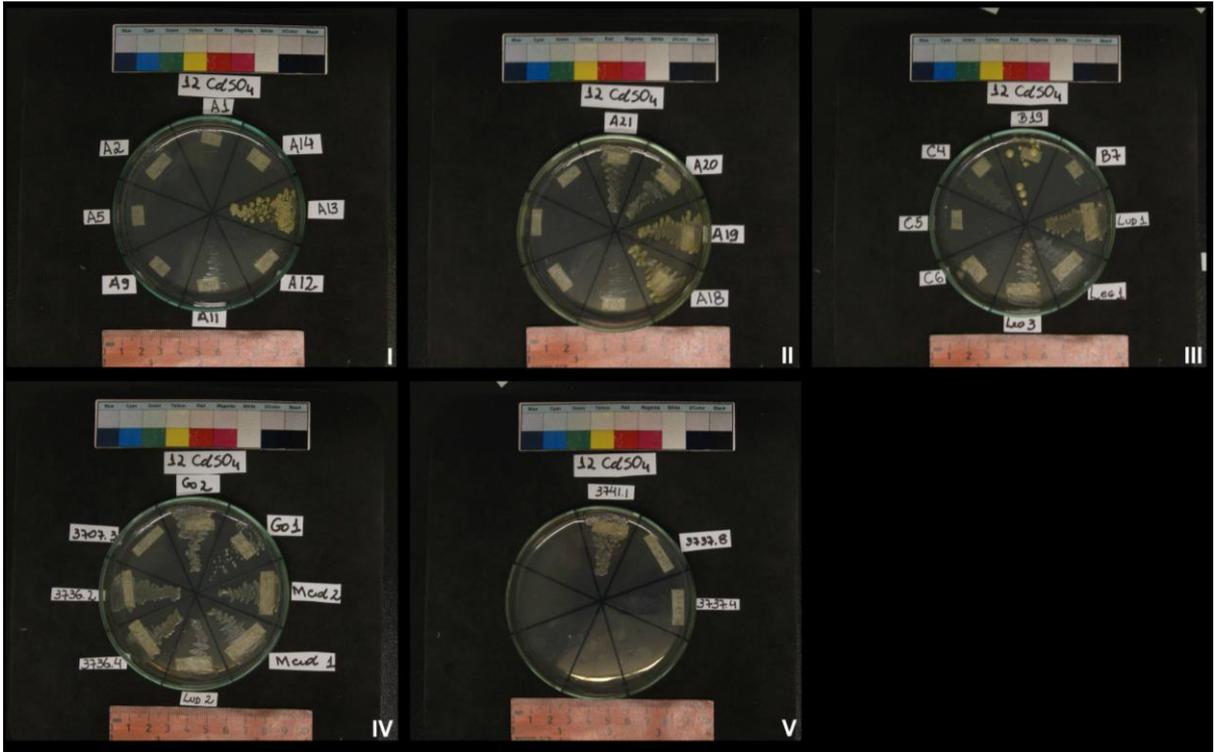


Figura 67: Bactérias em meio com concentração 12 de cádmio.

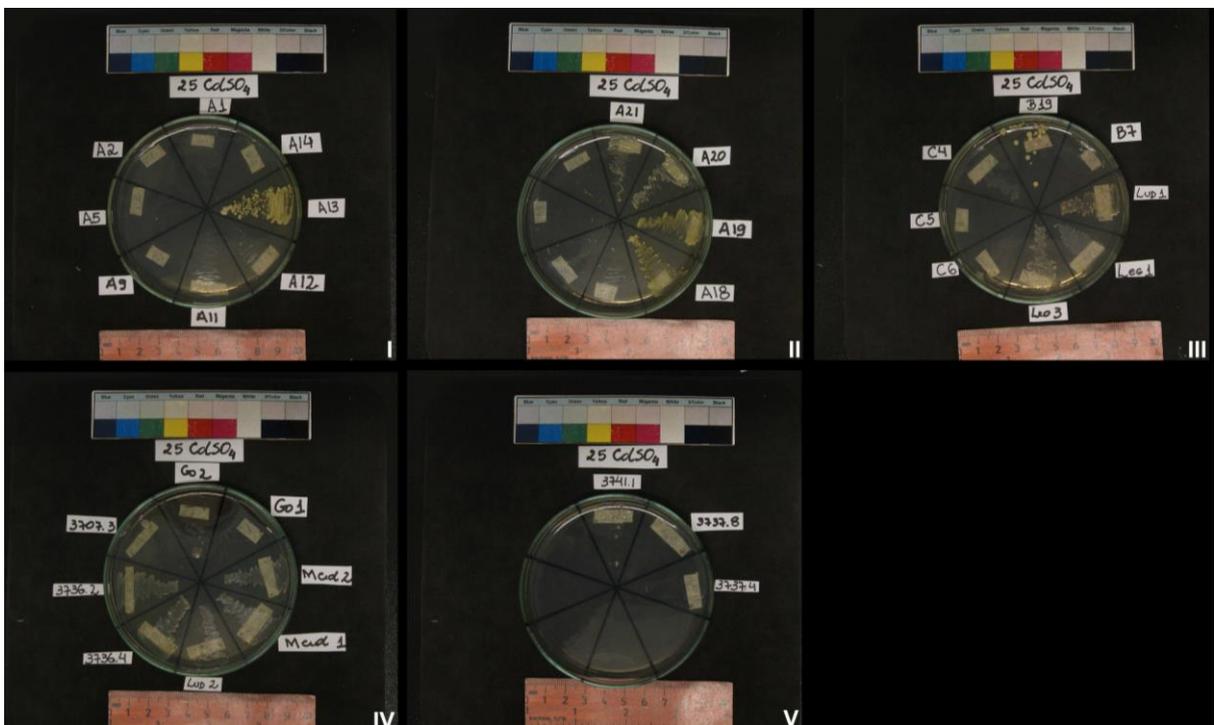


Figura 68: Bactérias em meio com concentração 25 de cádmio.



Figura 69: Bactérias em meio com concentração 50 de cádmio.



Figura 70: Bactérias em meio com concentração 50 de cádmio.

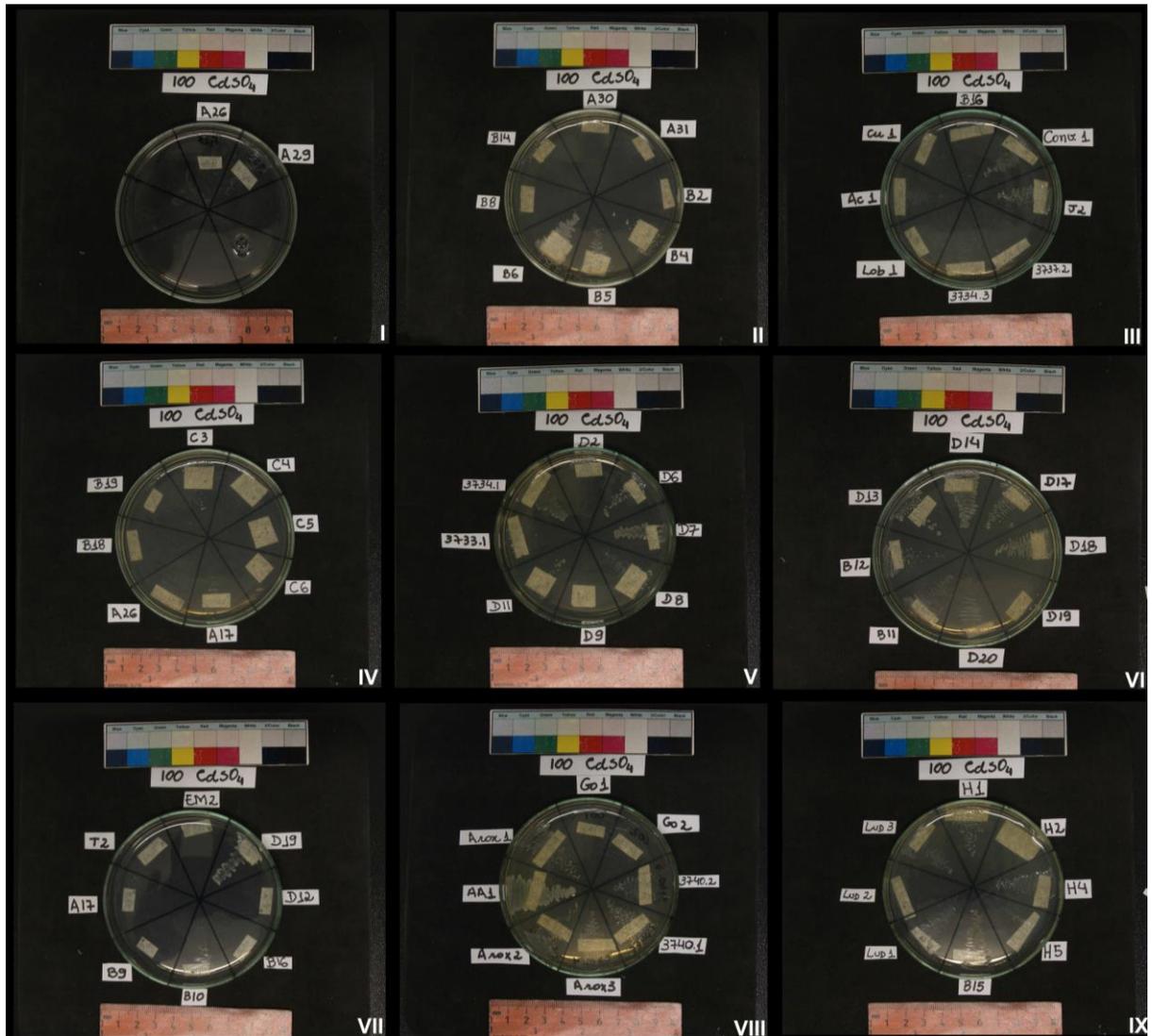


Figura 71: Bactérias em meio com concentração 100 de cádmio.



Figura 72: Bactérias em meio com concentração 100 de cádmio.

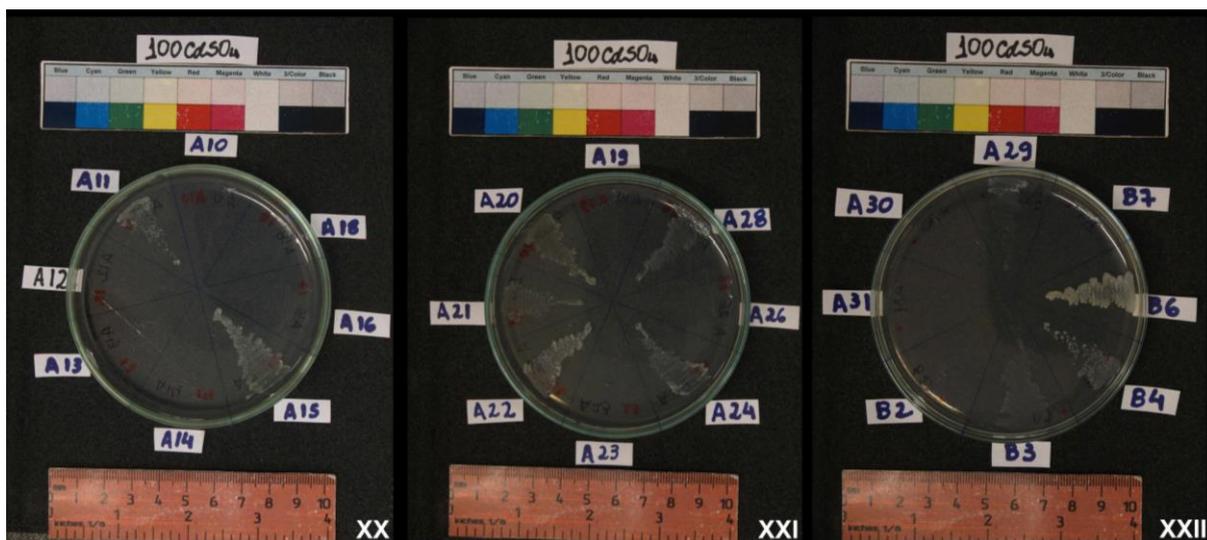


Figura 73: Bactérias em meio com concentração 100 de cádmio.

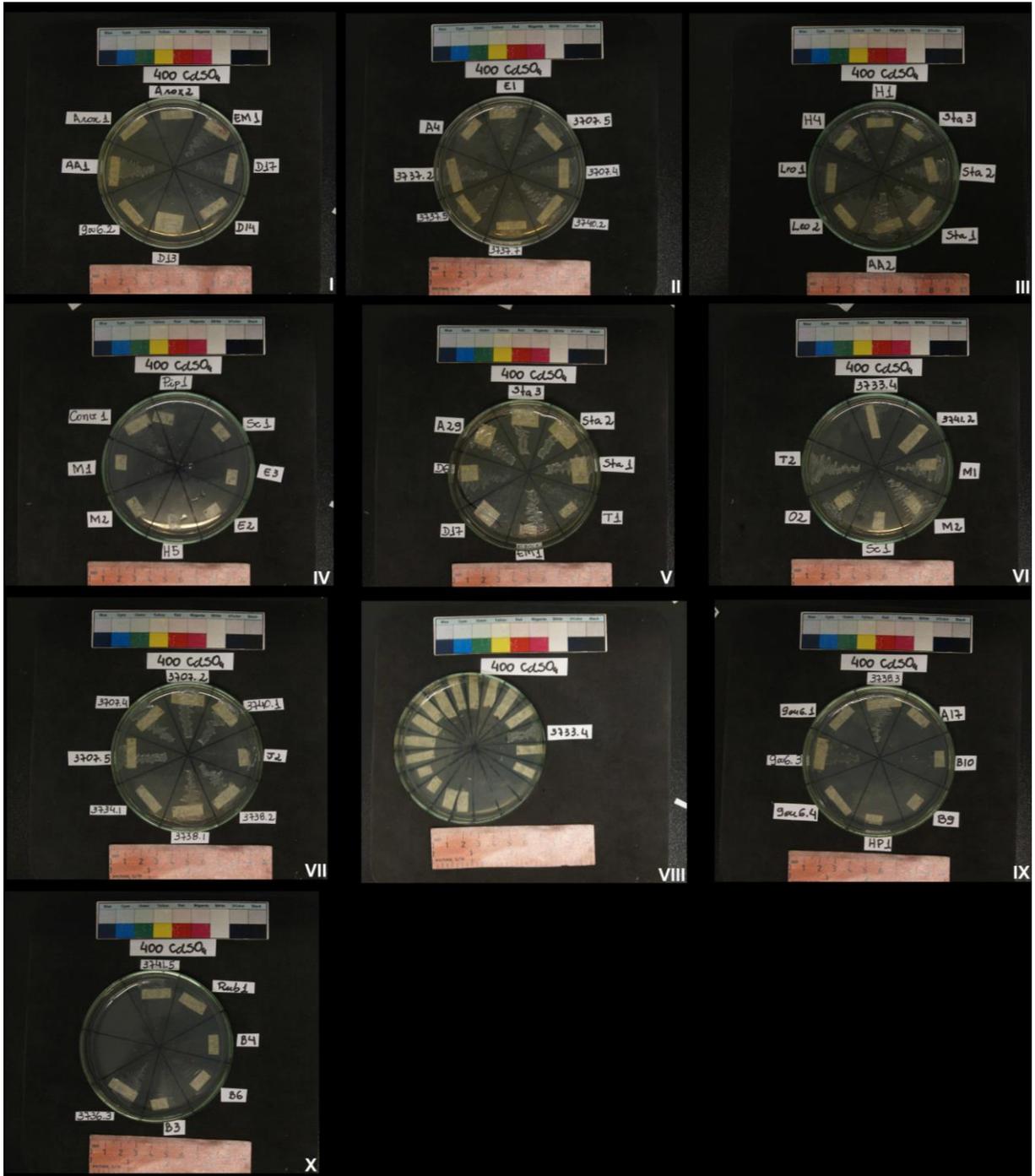


Figura 74: Bactérias em meio com concentração 400 de cádmio.

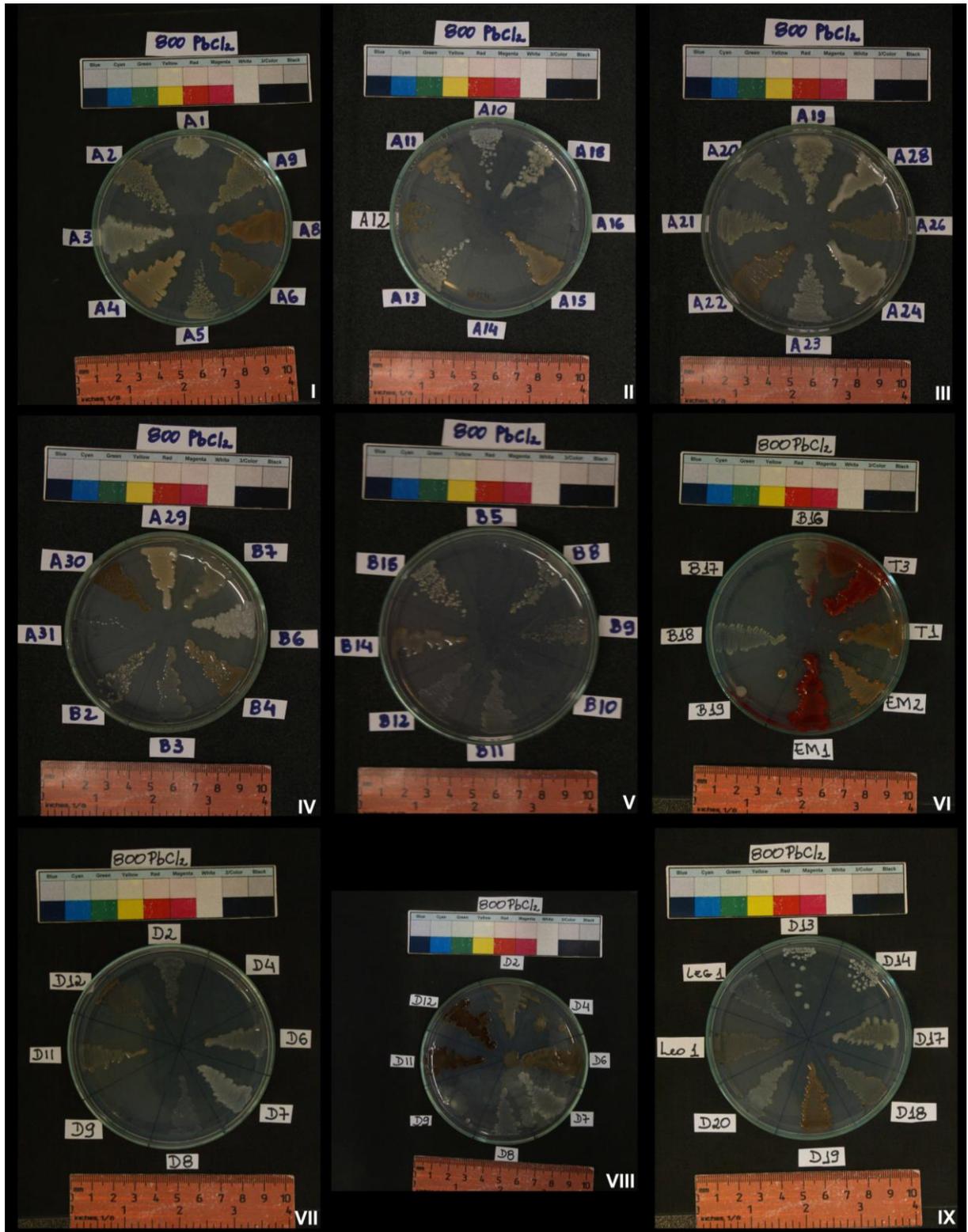


Figura 75: Bactérias em meio com concentração 800 de chumbo.

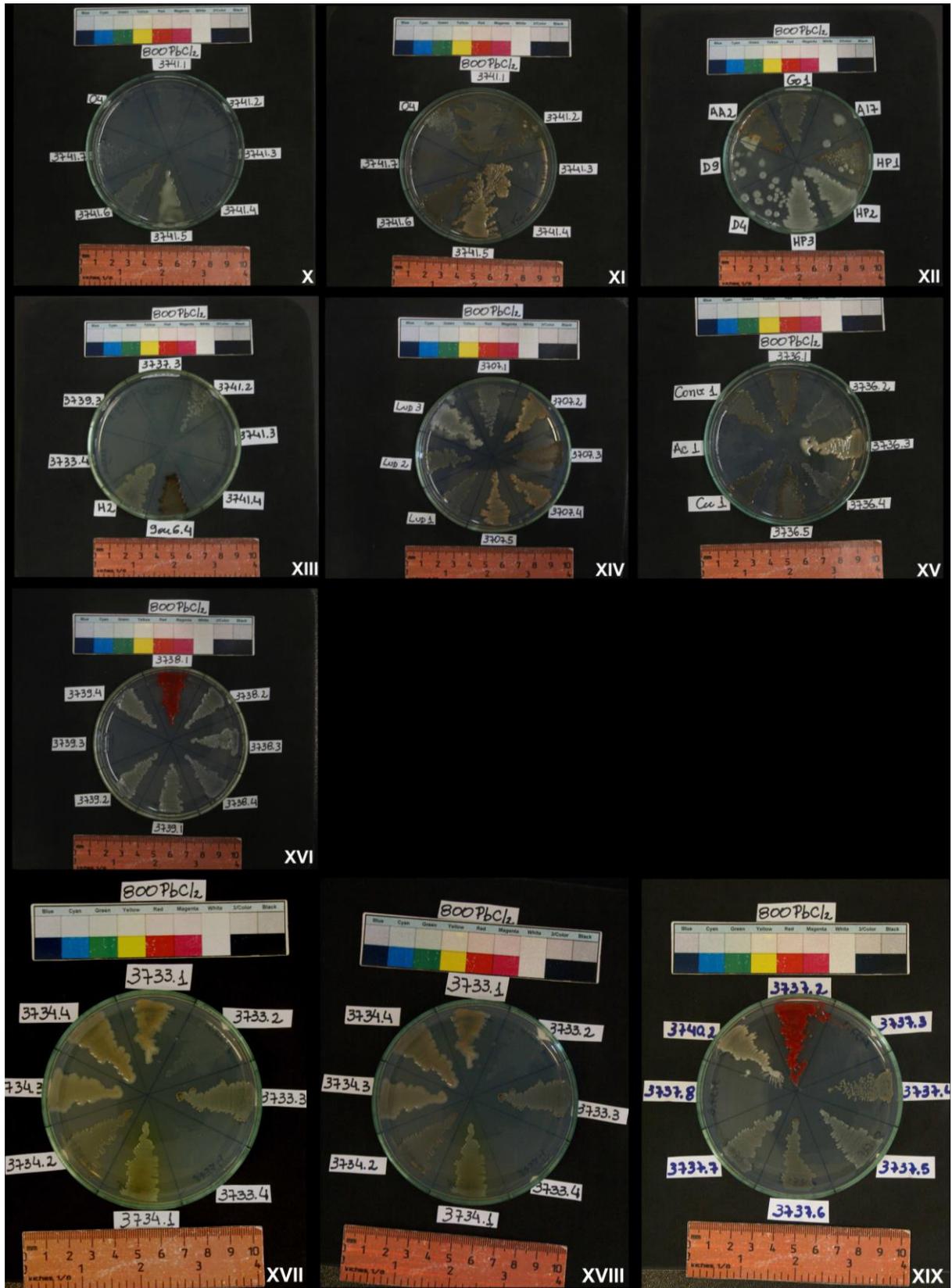


Figura 76: Bactérias em meio com concentração 800 de chumbo.

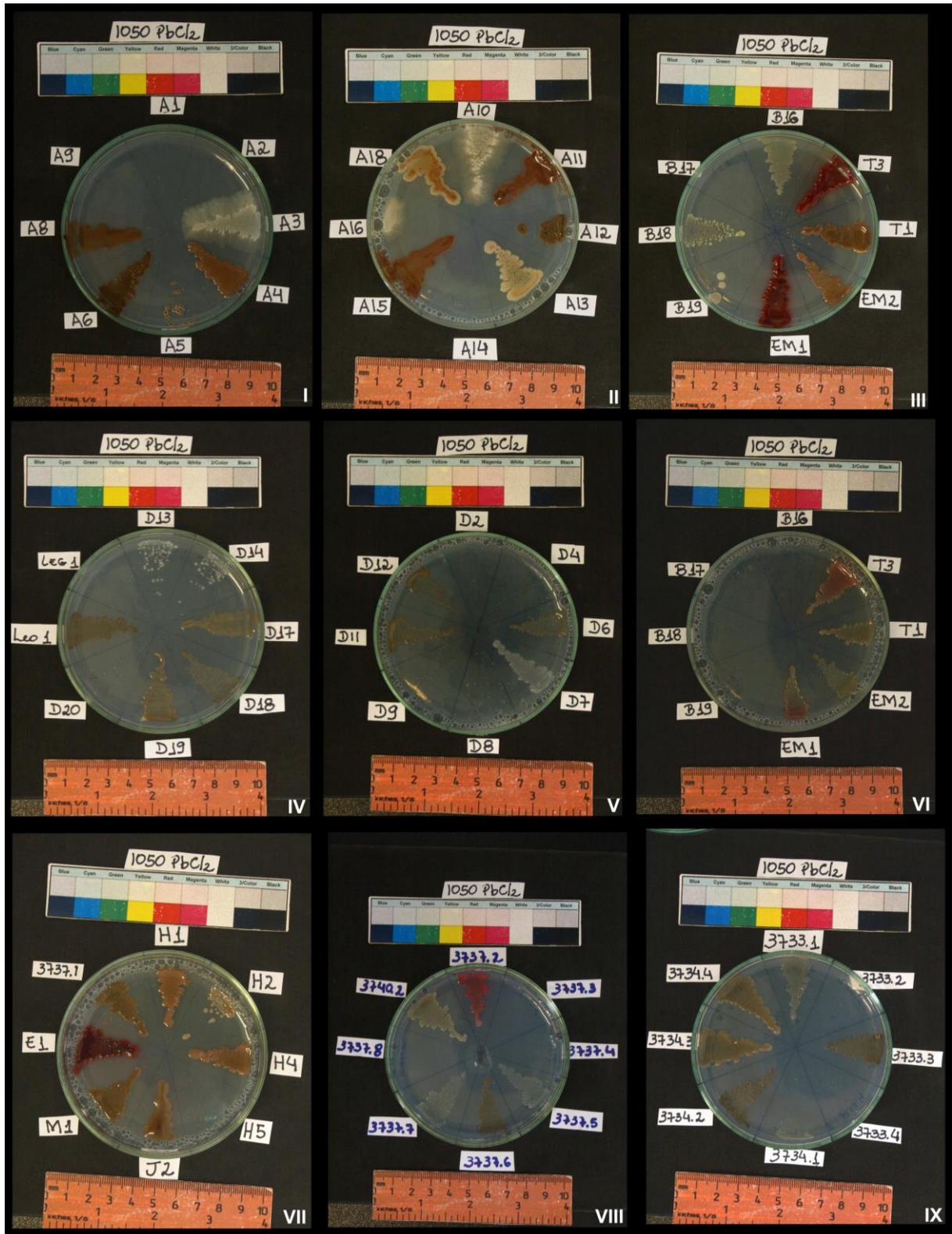


Figura 78: Bactérias em meio com concentração 1050 de chumbo.

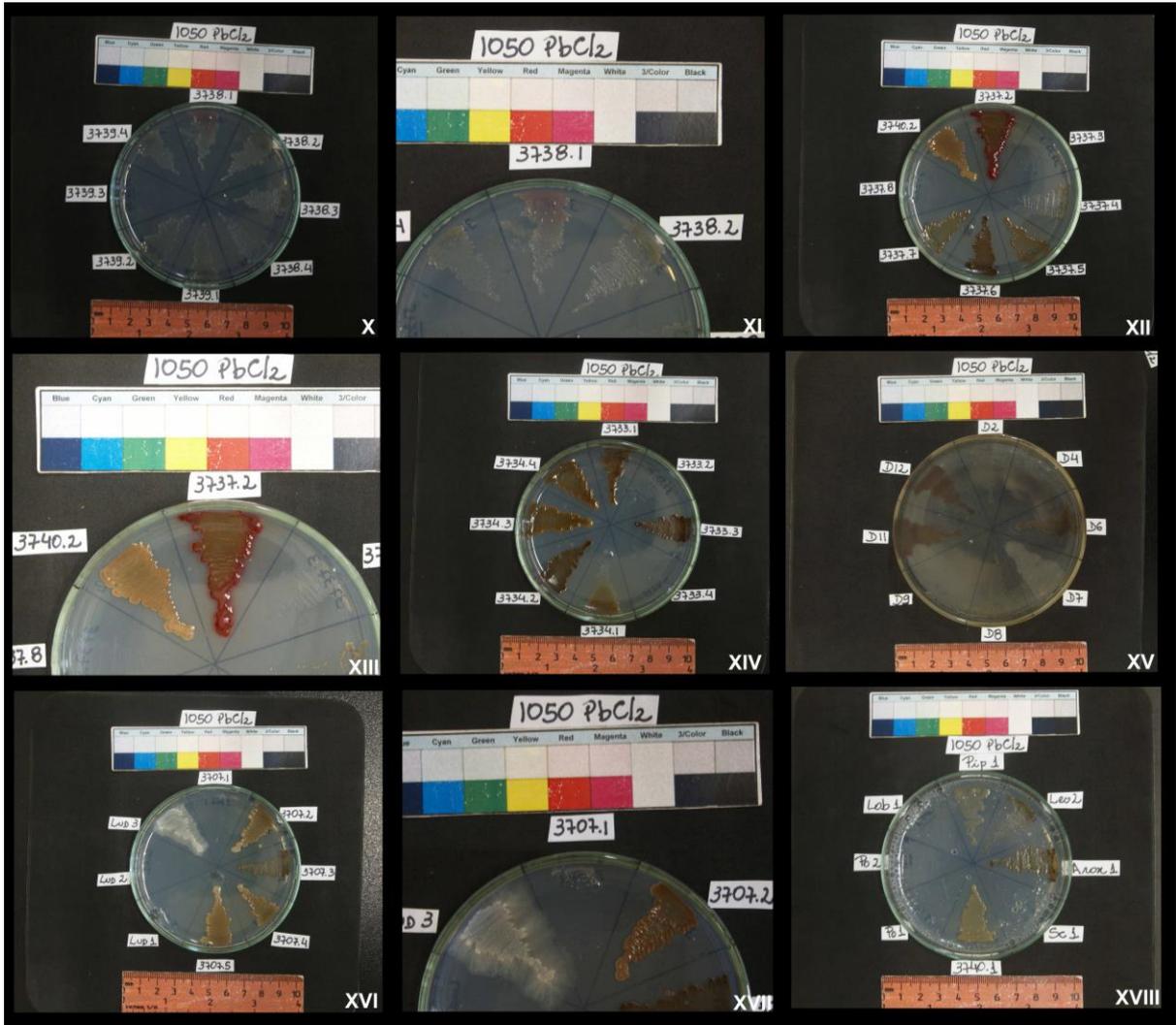


Figura 79: Bactérias em meio com concentração 1050 de chumbo.

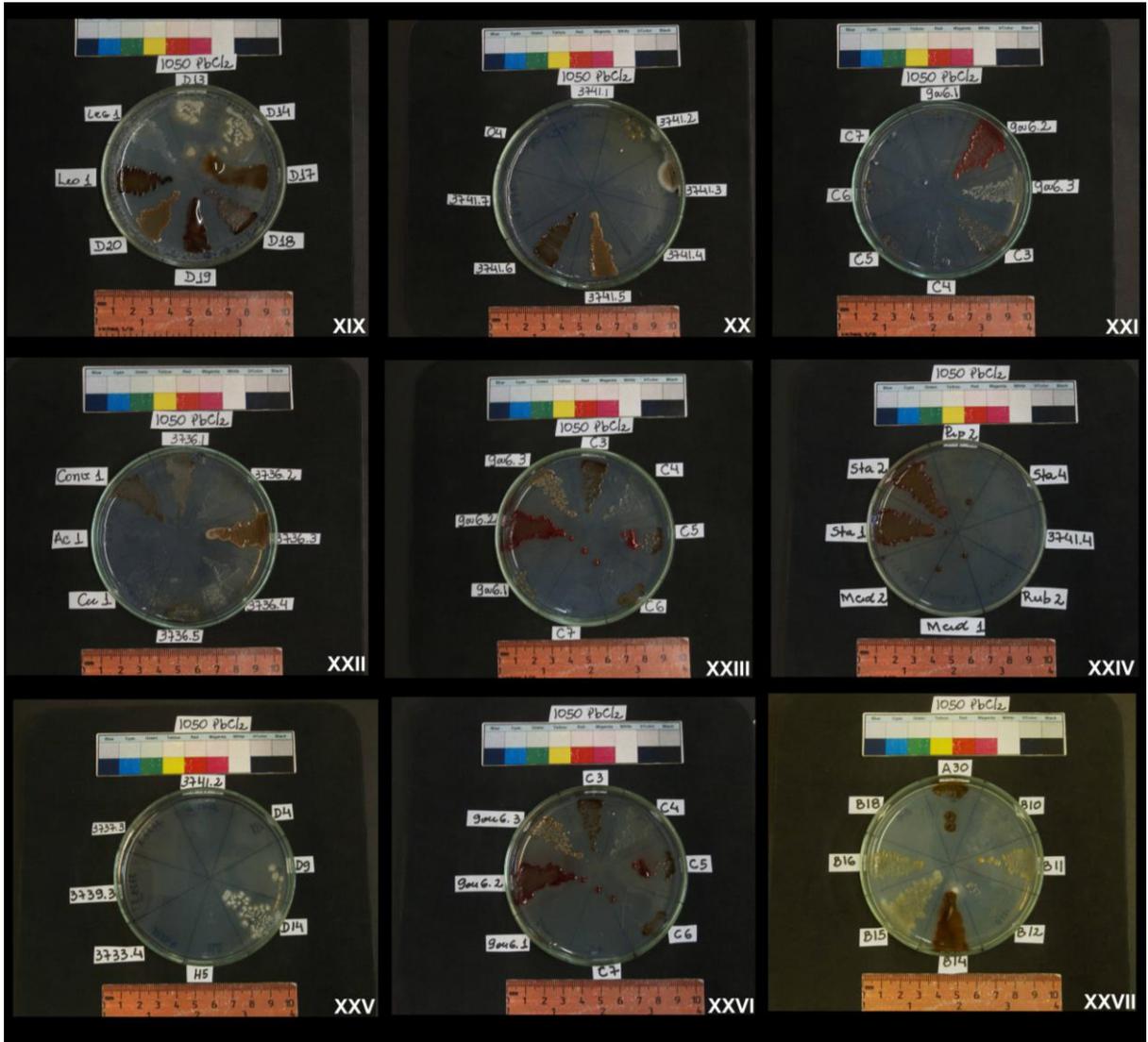


Figura 80: Bactérias em meio com concentração 1050 de chumbo.

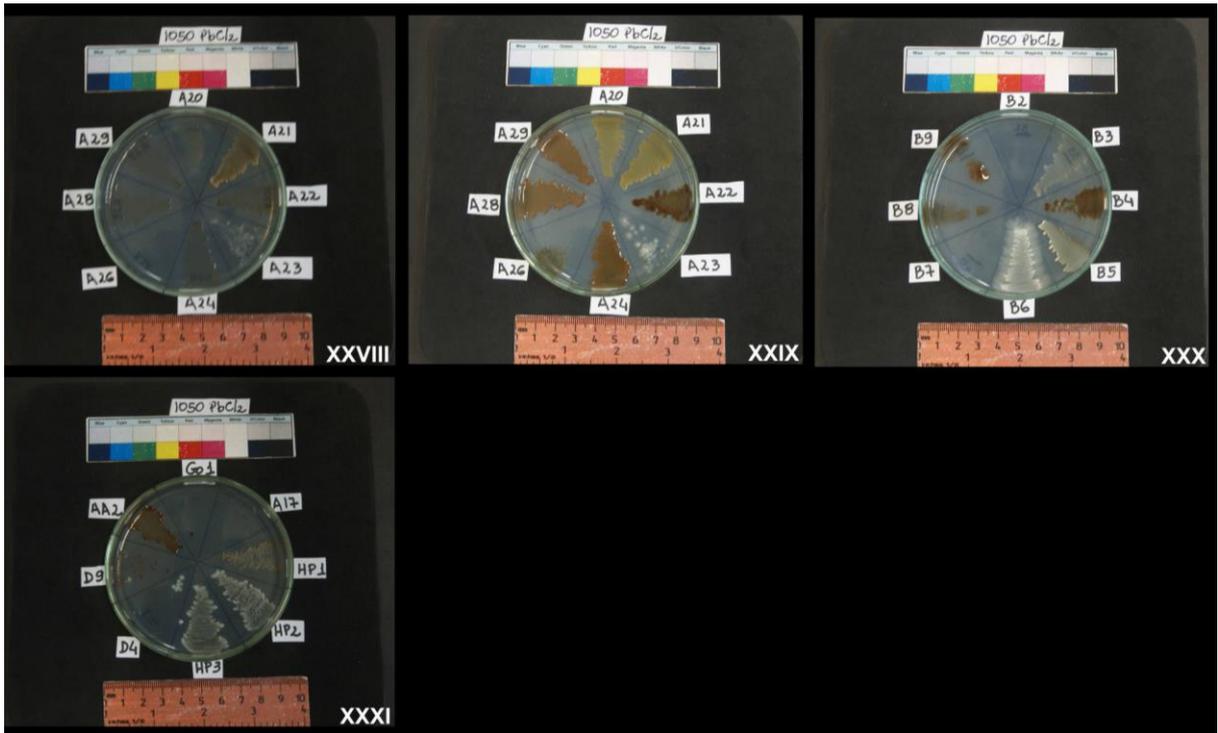


Figura 81: Bactérias em meio com concentração 1050 de chumbo.



Figura 82: Bactérias em meio com concentração 1400 de chumbo.

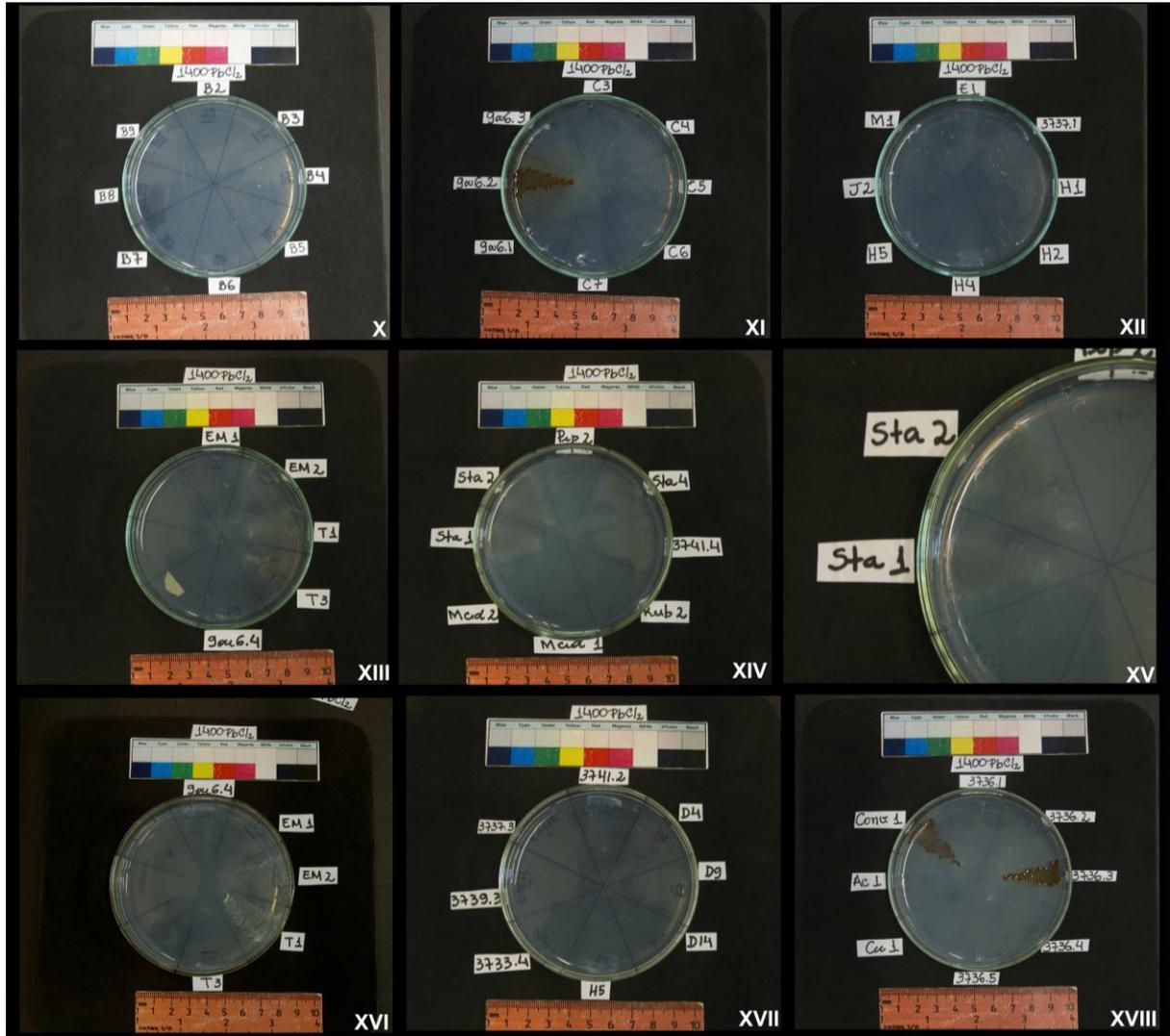


Figura 83: Bactérias em meio com concentração 1400 de chumbo.

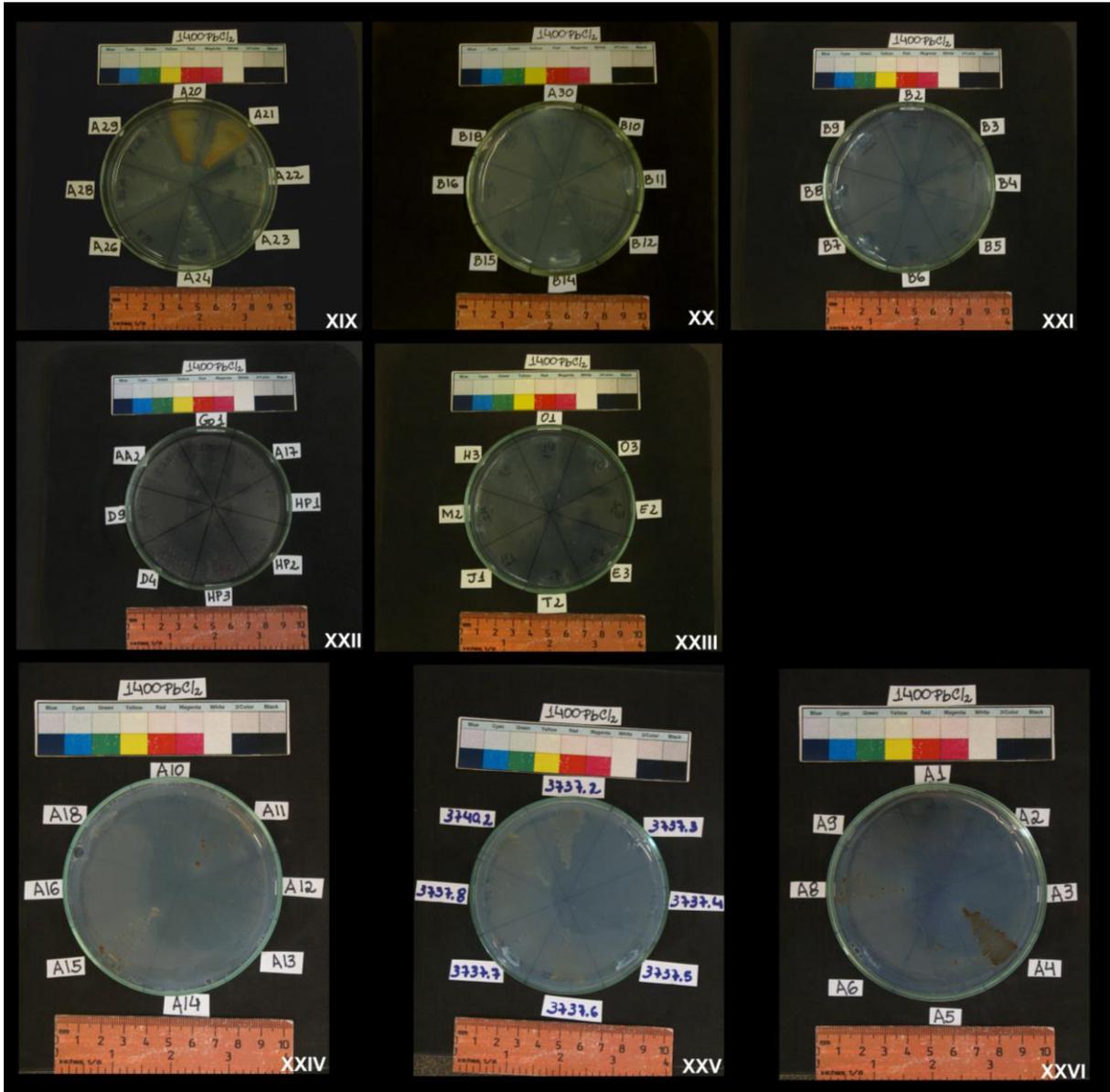


Figura 84: Bactérias em meio com concentração 1400 de chumbo.

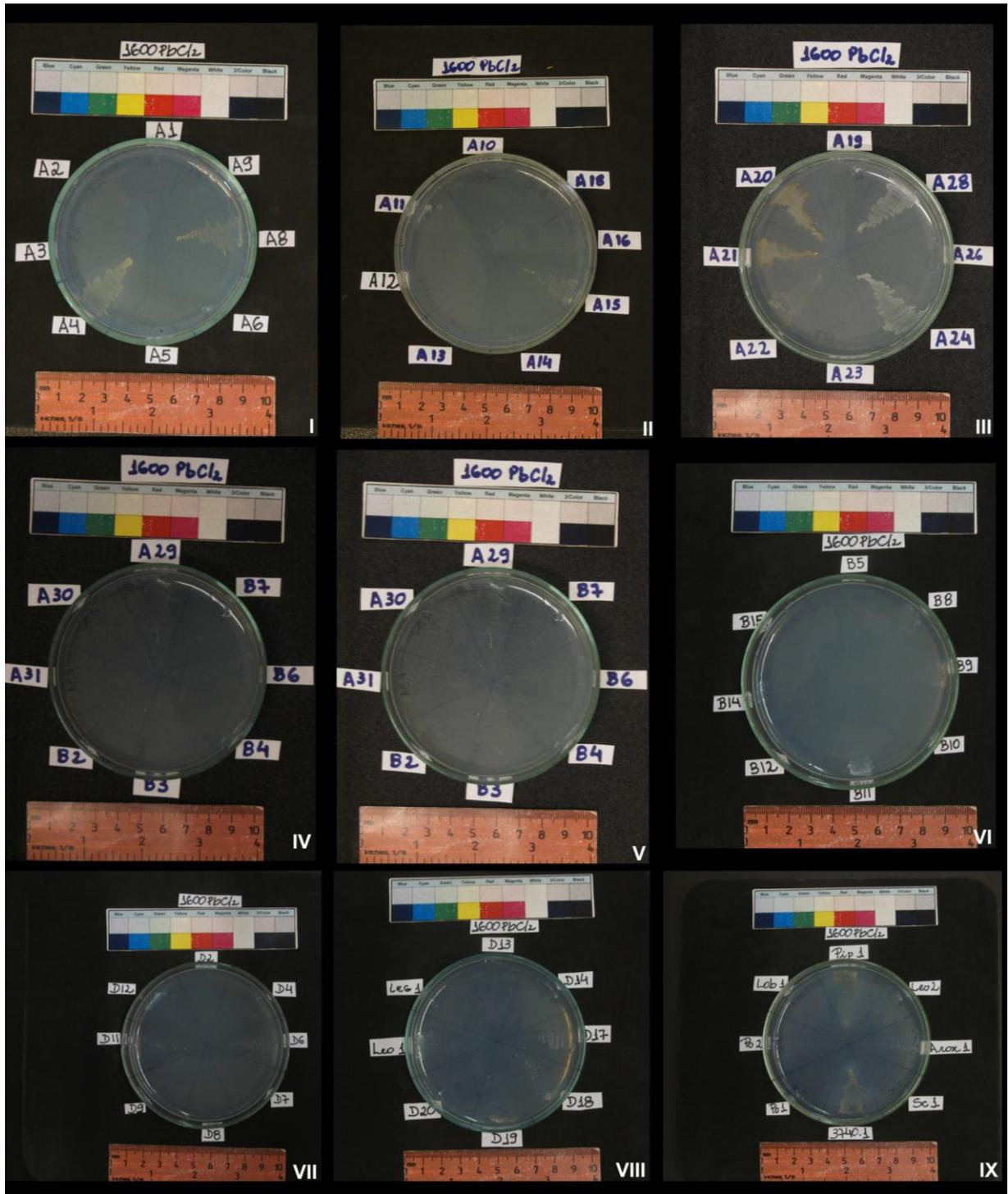


Figura 85: Bactérias em meio com concentração 1600 de chumbo.

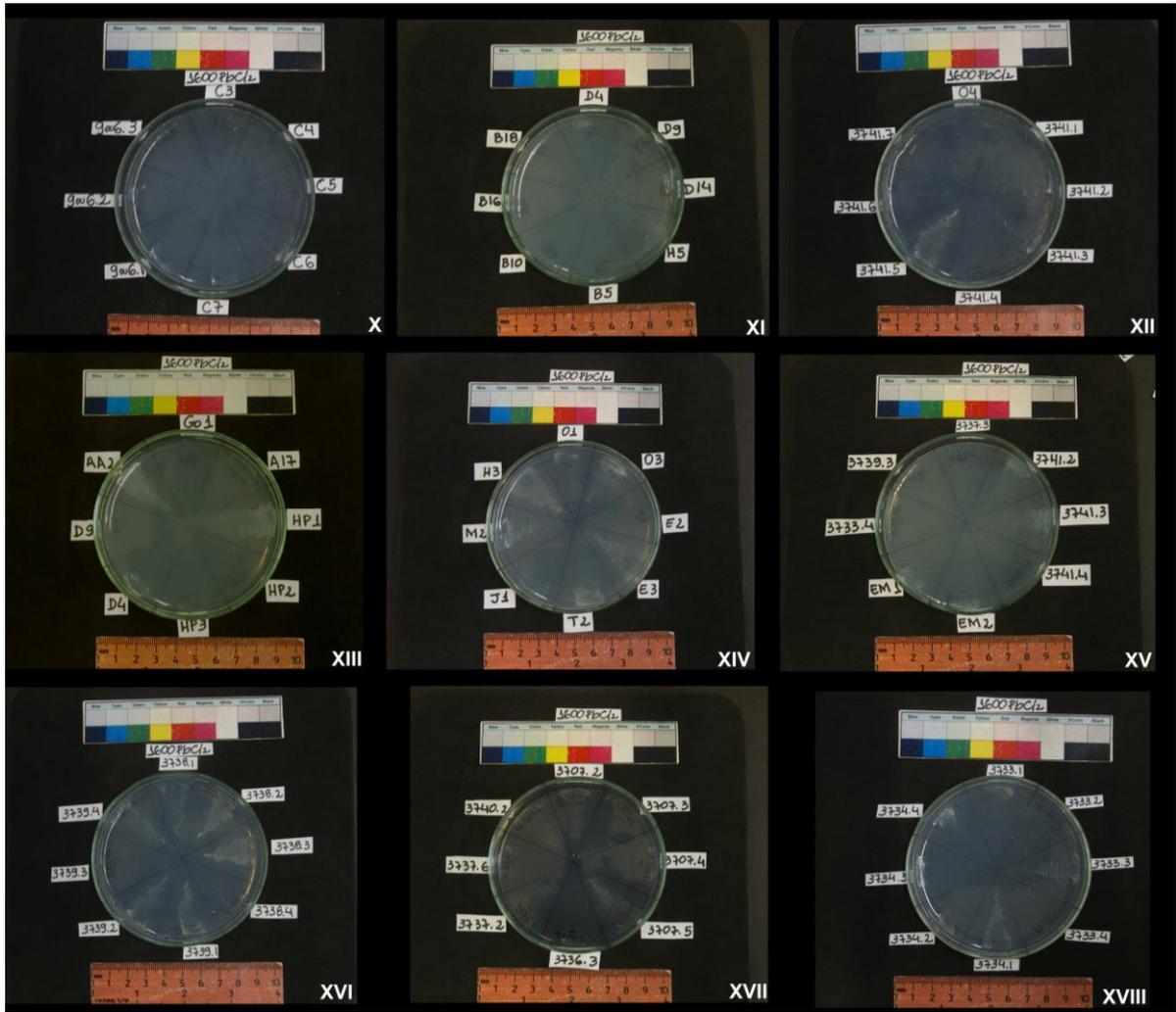


Figura 86: Bactérias em meio com concentração 1600 de chumbo.

9.2 RESUMO DA DISSERTAÇÃO (por ordem de 'Espécie bactérias após 16S')

Família Bacteria	Espécie bactéria após 16S	Identificação antes da extração	Tipo de Associação nas árvores	Gram coloração	N de extração	Planta de origem	Família	Hábito da planta	N Herbario HUEFS	CIM Pb (µg/mL)	CIM Cd (µg/mL)
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> sp.1 (2114.15)	JFP3733.2	*	Negativo	2114.15	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.) Kuntze	Lamiaceae	erva	184667	1050	100
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2070.02)	A02	A.D.P.	Negativo	2070.02	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1050	*
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2070.05)	A09	A.D.P.	Negativo	2070.05	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1050	*
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2086.09)	B02	A.D.P.	Negativo	2086.09	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	arbusto-arvoreta 3m	sem voucher	1050	100
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> 2114.11	O4	A.D.P.	Negativo	2114.11	<i>Ocimum selloi</i> Benth.	Lamiaceae	erva	184469	800	*
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2118.01)	A16	A.D.P.	Negativo	2118.01	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	800	6
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> cf. <i>calcoaceticus</i> (2246.01)	E02	A.D.P.	Negativo	2246.01	<i>Erithrina velutina</i>	Fabaceae	Muda de 1 palmo	sem voucher	1400	*
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i> sp.1 (2103.16)	9OU6.3	*	Negativo	2103.16	Scrophulariaceae	Scrophulariaceae	erva	185065	1400	800
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i> sp.2 (2086.31)	H02	*	Negativo	2086.31	<i>Ipomoea asarifolia</i> Roem. & Schult.	Convolvulaceae	erva	184471	1050	*
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i> sp.2 (2086.33)	H05	*	Negativo	2086.33	<i>Ipomoea asarifolia</i> Roem. & Schult.	Convolvulaceae	erva	184471	*	*
Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i> sp.1 (2070.04)	A05	*	Positivo	2070.04	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1050	*
Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i> sp.1 (2070.11)	A20	*	Positivo	2070.11	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1400	25
Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i> sp.1 (2070.12)	A21	*	Positivo	2070.12	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1400	25

Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i> sp.2 (2085.04)	B17	*	Positivo	2085.04	<i>Ricinus comunis</i> L.	Euphorbiaceae	arbusto-arvoreta 3m	sem voucher	*	*
Bacillaceae	<i>Bacillus Grupo cereus</i> (2070.06)	A10	A.D.G.	Positivo	2070.06	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1400	100
Bacillaceae	<i>Bacillus Grupo cereus</i> (2070.15)	A23	A.D.G.	Positivo	2070.15	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1400	100
Bacillaceae	<i>Bacillus Grupo cereus</i> (2085.10)	RUB01	A.D.G.	Positivo	2085.10	Rubiaceae	Rubiaceae	Subarbusto	184474	1400	200
Bacillaceae	<i>Bacillus Grupo cereus</i> (2086.13)	B06	A.D.G.	Positivo	2086.13	<i>Ricinus comunis</i> L.	Euphorbiaceae	arbusto-arvoreta 3m	sem voucher	1400	400
Bacillaceae	<i>Bacillus Grupo cereus</i> (2086.19)	D04	A.D.G.	Positivo	2086.19	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	árvore	sem voucher	*	*
Bacillaceae	<i>Bacillus Grupo cereus</i> (2086.21)	D07	A.D.G.	Positivo	2086.21	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	árvore	sem voucher	1400	200
Bacillaceae	<i>Bacillus Grupo cereus</i> (2086.22)	D09	A.D.G.	Positivo	2086.22	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	árvore	sem voucher	< 3,2	100
Bacillaceae	<i>Bacillus Grupo cereus</i> (2086.25)	D14	A.D.G.	Positivo	2086.25	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	árvore	sem voucher	1400	800
Bacillaceae	<i>Bacillus Grupo cereus</i> (2103.30)	JFP3737.8	A.D.G.	Positivo	2103.30	<i>Croton</i> sp.	Euphorbiaceae	erva	184671	800	< 3,2
Bacillaceae	<i>Bacillus Grupo cereus</i> (2103.32)	D13	A.D.G.	Positivo	2103.32	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	árvore	sem voucher	1400	800
Bacillaceae	<i>Bacillus Grupo cereus</i> (2114.01)	A03	A.D.G.	Positivo	2114.01	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1400	100
Bacillaceae	<i>Bacillus Grupo cereus</i> (2114.21)	JFP3738.4	A.D.G.	Positivo	2114.21	<i>Hyptis</i> sp. (Lamiaceae)	Lamiaceae	erva	184672	1400	200

Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2117.22)	LUD03	A.D.G.	Positivo	2117.22	<i>Ludwigia</i> sp. (Onagraceae)	Onagraceae	erva	184665	1400	200
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2118.08)	HP02	A.D.G.	Positivo	2118.08	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.) Kuntze	Lamiaceae	erva	185067	1400	200
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>cereus</i> (2118.09)	HP03	A.D.G.	Positivo	2118.09	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.) Kuntze	Lamiaceae	erva	185067	1400	200
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2070.01)	A01	A.D.G.	Positivo	2070.01	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1050	*
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2070.08)	A13	A.D.G.	Positivo	2070.08	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1050	50
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2070.10)	A19	A.D.G.	Positivo	2070.10	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1600	50
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2070.20)	A31	A.D.G.	Positivo	2070.20	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	*	*
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2085.02)	B15	A.D.G.	Positivo	2085.02	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	arbusto-arvoreta 3m	sem voucher	1400	100
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2085.06)	B19	A.D.G.	Positivo	2085.06	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	arbusto-arvoreta 3m	sem voucher	*	50
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> Grupo <i>subtilis</i> (2086.04)	A18	A.D.G.	Positivo	2086.04	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1050	50
Bacillaceae	<i>Bacillus nealsonii</i> (2086.10)	B03	A.D.M.	Positivo	2086.10	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	arbusto-arvoreta 3m	sem voucher	1050	400
Bacillaceae	<i>Bacillus nealsonii</i> (2114.06)	C04	A.D.M.	Positivo	2114.06	Poaceae	Poaceae	erva	185071	1050	50
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> sp.2 (2103.28)	JFP3737.6	*	Negativo	2103.28	<i>Croton</i> sp.	Euphorbiaceae	erva	184671	1600	100
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> sp.3 (2086.36)	LEO01	*	Negativo	2086.36	<i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) R.	Lamiaceae	erva	185064	1400	400

Br. (Lamiaceae)											
Enterobacteriac eae	<i>Citrobacter</i> sp.3 (2118.04)	AROX01	*	Negativo	2118.04	Asteraceae (flor roxa)	Asteracea e	erva	184638	1400	400
Enterobacteriac eae	<i>Citrobacter</i> sp.3 (2118.11)	LEO02	*	Negativo	2118.11	<i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) R. Br. (Lamiaceae)	Lamiacea e	erva	185064	1400	400
Enterobacteriac eae	<i>Citrobacter</i> sp.4 (2117.02)	JFP3734.2	*	Negativo	2117.02	<i>Peperomia pellucida</i> (L.) Kunth	Piperacea e	erva	184668	1600	*
Enterobacteriac eae	<i>Citrobacter</i> sp.4 (2117.18)	JFP3741.6	*	Negativo	2117.18	Asteraceae	Asteracea e	erva	184675	1400	200
Enterobacteriac eae	<i>Citrobacter</i> sp.4 (2114.16)	JFP3733.03	*	Negativo	2114.16	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.) Kuntze	Lamiacea e	erva	184667	1600	200
Enterobacteriac eae	<i>Citrobacter</i> sp.4 (2246.04)	J01	*	Negativo	2246.04	<i>Justicia</i> sp. (Acanthaceae)	Acanthace ae	erva	185075	1400	*
Enterobacteriac eae	<i>Citrobacter amalonicus- farmeri</i> (2086.27)	D18	A.D.G.	Negativo	2086.27	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	árvore	sem voucher	1400	200
Enterobacteriac eae	<i>Citrobacter</i> cf. <i>werkmanii</i> (2103.17)	9OU6.4	A.D.P.	Negativo	2103.17	Scrophulariaceae	Scrophula riaceae	erva	185065	1400	*
Comamonadac eae	<i>Comamonas testosteroni</i> (2117.16)	JFP3741.4	A.D.M.	Negativo	2117.16	Asteraceae	Asteracea e	erva	184675	*	*
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter</i> sp.1 (2114.04)	B14	*	Negativo	2114.04	<i>Ricinus comunis</i> L.	Euphorbia ceae	arbusto- arvoreta 3m	sem voucher	1400	400
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter</i> sp.10 (2086.14)	B07	*	Negativo	2086.14	<i>Ricinus comunis</i> L.	Euphorbia ceae	arbusto- arvoreta 3m	sem voucher	1050	*
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter</i> sp.10 2246.07	O3	*	Negativo	2246.07	<i>Ocimum selloi</i> Benth.	Lamiacea e	erva	184469	1400	*
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter</i> sp.11 (2103.23)	JFP3737.1	*	Negativo	2103.23	<i>Croton</i> sp.	Euphorbia ceae	erva	184671	1400	*
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter</i> sp.12 (2114.10)	M01	*	Negativo	2114.10	<i>Cecropia pachyst achya</i> Trécul		árvore	sem voucher	1400	*
Enterobacteriac	<i>Enterobacter</i>	T02	*	Negativo	2246.08	<i>Indigofera</i>	Fabaceae	erva	184473	1400	*

eae	sp.2 (2246.08)					<i>spicata</i> Forssk.						
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter</i> sp.3 (2086.23)	D11	*	Negativo	2086.23	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	árvore	sem voucher	1400	200	
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter</i> sp.3 (2246.02)	E03	*	Negativo	2246.02	<i>Erithrina velutina</i>	Fabaceae	Muda de 1 palmo	sem voucher	1400	*	
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter</i> sp.4 (2114.14)	JFP3733.1	*	Negativo	2114.14	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.) Kuntze	Lamiaceae	erva	184667	1600	200	
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter</i> sp.5 (2070.07)	A11	*	Negativo	2070.07	<i>Mimosa pigra</i> L.	Fabaceae	arbusto	184472	1600	*	
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter</i> sp.6 (2085.08)	C06	*	Negativo	2085.08	Poaceae	Poaceae	erva	185071	1400	50	
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter</i> sp.7 (2070.09)	A15	*	Negativo	2070.09	<i>Cecropia pachyst achya</i> Trécul	Cecropiac eae	árvore	sem voucher	1400	200	
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter</i> sp.8 (2086.01)	A08	*	Negativo	2086.01	<i>Cecropia pachyst achya</i> Trécul	Cecropiac eae	árvore	sem voucher	1400	400	
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter</i> sp.9 (2118.13)	PIP01	*	Negativo	2118.13	<i>Peperomia pellucida</i> (L.) Kunth	Piperaceae	erva	184668	1400	*	
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter</i> sp. nov.1 (2117.04)	JFP3734.4	P.I.	Negativo	2117.04	<i>Peperomia pellucida</i> (L.) Kunth	Piperaceae	erva	184668	1600	*	
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter</i> sp. nov.1(2117.14)	AROX	P.I.	Negativo	2117.14	Asteraceae (flor roxa)	Asteraceae	erva	184638	1050	*	
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter cancerogenus</i> (2086.16)	B09	A.D.M.	Negativo	2086.16	<i>Ricinus comunis</i> L.	Euphorbia ceae	arbusto- arvoreta 3m	sem voucher	1400	*	
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter cf. cloacae</i> (2085.07)	C05	A.D.P.	Negativo	2085.07	Poaceae	Poaceae	erva	sem voucher	1400	*	
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter cf. cloacae</i> (2086.05)	A22	A.D.P.	Negativo	2086.05	<i>Cecropia pachyst achya</i> Trécul	Cecropiac eae	árvore	sem voucher	1400	200	
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter cf. cloacae</i> (2086.28)	D19	A.D.P.	Negativo	2086.28	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	árvore	sem voucher	1400	1600	
Enterobacteriac eae	<i>Enterobacter cf. cloacae</i> (2114.05)	C03	A.D.P.	Negativo	2114.05	Poaceae	Poaceae	erva	sem voucher	1400	200	

Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter cf. cloacae</i> (2114.08)	D12	A.D.P.	Negativo	2114.08	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	árvore	sem voucher	1400	*
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter hormaechei</i> (2086.11)	B04	*	Negativo	2086.11	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	arbusto-arvoreta 3m	sem voucher	1400	400
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter hormaechei</i> (2086.15)	B08	*	Negativo	2086.15	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	arbusto-arvoreta 3m	sem voucher	1400	200
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter hormaechei</i> (2086.26)	D17	*	Negativo	2086.26	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	árvore	sem voucher	1400	800
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter hormaechei</i> (2117.23)	A06	*	Negativo	2117.23	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1400	100
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter kobei</i> 2120.04	AROX02	A.D.M.	Negativo	2120.04	Asteraceae (flor roxa)	Asteraceae	erva	184638	*	400
Enterococceae	<i>Enterococcus gallinarum-casseliflavus</i> (2085.05)	B18	A.D.G.	Positivo	2085.05	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	arbusto-arvoreta 3m	sem voucher	1050	100
Enterococceae	<i>Enterococcus gallinarum-casseliflavus</i> (2085.09)	C07	A.D.G.	Positivo	2085.09	Poaceae	Poaceae	erva	185071	*	*
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i> (2103.20)	JFP3707.3	A.D.M.	Negativo	2103.20	<i>Borreria</i> sp.	Rubiaceae	erva	184641	1600	*
Bacillaceae	<i>Exiguobacterium acetylicum-indicum</i> (2085.01)	B11	A.D.G.	Positivo	2085.01	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	arbusto-arvoreta 3m	sem voucher	1400	100
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella cf. variicola</i> (2085.15)	J02	A.D.P.	Negativo	2085.15	<i>Justicia</i> sp. (Acanthaceae)	Acanthaceae	erva	185075	1400	400
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella cf. variicola</i> (2086.20)	D06	A.D.P.	Negativo	2086.20	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	árvore	sem voucher	1400	800
Planococceae	<i>Kurthia</i> sp. nov.1 (2103.25)	JFP3737.3	P.I.	Positivo	2103.25	<i>Croton</i> sp.	Euphorbiaceae	erva	184671	*	*

Planococcaceae	<i>Kurthia</i> sp. nov.1 (2103.26)	JFP3737.4	P.I.	Positivo	2103.26	<i>Croton</i> sp.	Euphorbiaceae	erva	184671	1050	< 3,2
Streptococcaceae	<i>Lactococcus garvieae</i> (2086.37)	LOB01	A.D.M.	Positivo	2086.37	<i>Lobelia</i> sp. (Campanulaceae)	Campanulaceae	erva	184477	1050	100
Streptococcaceae	<i>Lactococcus garvieae</i> (2086.38)	LEG01	A.D.M.	Positivo	2086.38	Leguminosae	Fabaceae	erva	184654	1050	25
Streptococcaceae	<i>Lactococcus garvieae</i> (2086.39)	CU01	A.D.M.	Positivo	2096.39	<i>Cuphea</i> sp.	Lythraceae	erva	185073	1400	100
Streptococcaceae	<i>Lactococcus garvieae</i> (2086.42)	AC01	A.D.M.	Positivo	2086.42	Acanthaceae	Acanthaceae	erva	184478	1400	400
Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i> (2086.41)	SC01	A.D.M.	Positivo	2086.41	Scrophulariaceae	Scrophulariaceae	erva	184669	1050	*
Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i> (2086.43)	CONV01	A.D.M.	Positivo	2086.43	Convolvulaceae	Convolvulaceae	erva	sem voucher	1600	*
Microbacteriaceae	<i>Leucobacter aff. chromiireducens</i> (2114.07)	D08	A.I.M.	Positivo	2114.07	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	árvore	sem voucher	1050	200
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (2085.11)	RUB02	A.D.M.	Positivo	2085.11	<i>Borreria</i> sp.	Rubiaceae	erva	184640	1050	100
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (2086.18)	D02	A.D.M.	Positivo	2086.18	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	árvore	sem voucher	1400	200
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (2114.09)	D20	A.D.M.	Positivo	2114.09	<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	árvore	sem voucher	1050	100
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (2118.10)	HP04	A.D.M.	Positivo	2118.10	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.) Kuntze	Lamiaceae	erva	185067	*	100
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (2120.02)	PIP02	A.D.M.	Positivo	2120.02	<i>Peperomia pellucida</i> (L.) Kunth	Piperaceae	erva	184668	1400	100
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus macroides-boronitolerans</i> (2114.12)	PO01	A.D.G.	Positivo	2114.12	Poaceae	Poaceae	erva	sem voucher	1050	200

Bacillaceae	<i>Lysinibacillus macroides-boronitolerans</i> (2114.13)	PO02	A.D.G.	Positivo	2114.13	Poaceae	Poaceae	erva	sem voucher	1050	200
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (2085.12)	MCID01	A.D.M.	Positivo	2085.12	<i>Sida</i>	Malvaceae	erva	184660	1050	50
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (2117.20)	LUD01	A.D.M.	Positivo	2117.20	<i>Ludwigia</i> sp. (Onagraceae)	Onagraceae	erva	184665	1050	50
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (2117.21)	LUD02	A.D.M.	Positivo	2117.21	<i>Ludwigia</i> sp. (Onagraceae)	Onagraceae	erva	184665	1050	50
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (2117.24)	STA04	A.D.M.	Positivo	2117.24	<i>Stachytarpheta</i>	Verbenaceae	Subarbusto pequeno	184642	1050	100
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (2118.12)	MCID02	A.D.M.	Positivo	2118.12	<i>Sida</i>	Malvaceae	erva	184660	1050	50
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> (2117.13)	JFP3741.1	A.D.M.	Positivo	2117.13	Asteraceae	Asteraceae	erva	184675	1050	50
Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i> sp.1 (2085.03)	B16	*	Positivo	2085.03	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	arbusto-arvoreta 3m	sem voucher	1050	100
Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i> sp.2 (2086.17)	B10	*	Positivo	2086.17	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	arbusto-arvoreta 3m	sem voucher	800	*
Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i> sp.1 (2086.03)	A14	*	Negativo	2086.03	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1050	*
Enterobacteriaceae	<i>Pantoea eucrina</i> (2086.02)	A12	A.D.M.	Negativo	2086.02	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1400	*
Enterobacteriaceae	<i>Pantoea eucrina</i> (2086.06)	A26	A.D.M.	Negativo	2086.06	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1050	*
Enterobacteriaceae	<i>Pantoea eucrina</i> (2086.08)	A30	A.D.M.	Negativo	2086.08	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Cecropiaceae	árvore	sem voucher	1050	*
Enterobacteriaceae	<i>Providencia</i> sp.2 (2103.27)	JFP3737.5	*	Negativo	2103.27	<i>Croton</i> sp.	Euphorbiaceae	erva	184671	1400	1600
Enterobacteriaceae	<i>Providencia</i> sp.1 (2117.03)	JFP3734.3	*	Negativo	2117.03	<i>Peperomia pellucida</i> (L.)	Piperaceae	erva	184668	1400	*

Kunth											
Enterobacteriaceae	<i>Providencia</i> sp.2 (2103.29)	JFP3737.7	*	Negativo	2103.29	<i>Croton</i> sp.	Euphorbiaceae	erva	184671	1400	1600
Enterobacteriaceae	<i>Providencia</i> sp.2 (2118.03)	AA2	*	Negativo	2118.03	Asteraceae (floramarela)	Asteraceae	erva	184637	1400	1600
Enterobacteriaceae	<i>Providencia alcalifaciens-rustigianii</i> (2118.07)	HP01	A.D.G.	Negativo	2118.07	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.) Kuntze	Lamiaceae	erva	185067	1400	*
Brucellaceae	<i>Pseudochrobacterium saccharolyticum</i> - <i>asaccharolyticum</i> (2117.05)	JFP3736.1	A.D.G.	Negativo	2117.05	Asteraceae (floroxa)	Asteraceae	erva	184670	1400	100
Pseudomonadaeae	<i>Pseudomonas</i> sp.1 (2114.03)	B12	*	Negativo	2114.03	<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	arbust-arvoreta 3m	sem voucher	1050	100
Pseudomonadaeae	<i>Pseudomonas</i> sp.2 (2114.18)	JFP3736.4	*	Negativo	2114.18	Asteraceae (floroxa)	Asteraceae	erva	184670	1050	50
Pseudomonadaeae	<i>Pseudomonas</i> sp.2 (2117.06)	JFP3736.2	*	Negativo	2117.06	Asteraceae	Asteraceae	erva	184670	1050	50
Pseudomonadaeae	<i>Pseudomonas</i> sp.3 (2117.01)	JFP3734.1	*	Negativo	2117.01	<i>Peperomia pellucida</i> (L.) Kunth	Piperaceae	erva	184668	1050	400
Pseudomonadaeae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2117.10)	JFP3739.3	A.D.M.	Negativo	2117.10	<i>Heliotropium</i> sp.	Boraginaceae	erva	184673	*	*
Pseudomonadaeae	<i>Pseudomonas</i> cf. <i>mosselii</i> (2114.17)	JFP3733.4	A.D.P.	Negativo	2114.17	<i>Mesosphaerum pectinata</i> (L.) Kuntze	Lamiaceae	erva	184667	1400	*
Pseudomonadaeae	<i>Pseudomonas</i> cf. <i>mosselii</i> (2117.19)	JFP3741.7	A.D.P.	Negativo	2117.19	Asteraceae	Asteraceae	erva	184675	1050	*
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> (sp.1) 2103.15	9OU6.2	*	Negativo	2103.15	Scrophulariaceae	Scrophulariaceae	erva	185065	1600	400
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i> sp.1 (2246.05)	H03	*	Negativo	2246.05	<i>Ipomoea asarifolia</i> Roem. & Schult.	Convolvulaceae	erva	184471	1400	*

Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.1 (2086.30)	H01	*	Negativo	2086.30	<i>Ipomoea asarifolia</i> Roem. & Schult.	Convolvul aceae	erva	184471	1400	1600
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.2 (2114.24)	JFP3739.4	*	Negativo	2114.24	<i>Heliotropium</i> sp.	Boraginac eae	erva	184673	1400	100
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.2 (2117.07)	JFP3736.3	*	Negativo	2117.07	Asteraceae	Asteracea e	erva	184670	1600	1600
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.3 (2117.11)	JFP3740.1	*	Negativo	2117.11	Campanulaceae	Campanul aceae	erva	184674	*	1600
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.3 (2103.19)	JFP3707.2	*	Negativo	2103.19	<i>Borreria</i> sp.	Rubiaceae	erva	184641	1600	1600
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.4 (2114.22)	JFP3739.1	*	Negativo	2114.22	<i>Heliotropium</i> sp.	Boraginac eae	erva	184673	1400	100
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.5 (2117.09)	JFP3738.2	*	Negativo	2117.09	<i>Hyptis</i> sp. (Lamiaceae)	Lamiacea e	erva	184672	1400	1600
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.6 (2070.16)	A24	*	Negativo	2070.16	<i>Cecropia pachyst achya</i> Trécul	Cecropiac eae	árvore	sem voucher	1400	400
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.6 (2086.07)	A28	*	Negativo	2086.07	<i>Cecropia pachyst achya</i> Trécul	Cecropiac eae	árvore	sem voucher	1400	400
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.6 (2070.03)	A04	*	Negativo	2070.03	<i>Cecropia pachyst achya</i> Trécul	Cecropiac eae	árvore	sem voucher	3200	400
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.6 (2070.19)	A29	*	Negativo	2070.19	<i>Cecropia pachyst achya</i> Trécul	Cecropiac eae	árvore	sem voucher	1400	1600
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.7 (2085.13)	EM01	*	Negativo	2085.13	<i>Cecropia pachyst achya</i> Trécul	Cecropiac eae	árvore	sem voucher	1400	1600
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.7 (2103.21)	JFP3707.4	*	Negativo	2103.21	<i>Borreria</i> sp.	Rubiaceae	erva	184641	1600	1600
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.7 (2085.16)	STA03	*	Negativo	2085.16	<i>Stachytarpheta</i>	Verbenace ae	Subarbust o pequeno	184642	*	1600
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.7 (2086.29)	E01	*	Negativo	2086.29	<i>Erithrina velutina</i>	Fabaceae	Muda de 1 palmo	sem voucher	1400	1600
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.7 (2086.32)	H04	*	Negativo	2086.32	<i>Ipomoea asarifolia</i> Roem. & Schult.	Convolvul aceae	erva	184471	1400	1600
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.7 (2086.34)	STA01	*	Negativo	2086.34	<i>Stachytarpheta</i>	Verbenace ae	Subarbust o pequeno	184642	1400	1600
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.7 (2086.35)	STA02	*	Negativo	2086.35	<i>Stachytarpheta</i>	Verbenace ae	Subarbust o pequeno	184642	1400	1600
Enterobacteriac	<i>Serratia</i> sp.7	JFP3707.5	*	Negativo	2103.22	<i>Borreria</i> sp.	Rubiaceae	erva	184641	1600	1600

eae	(2103.22)											
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.7 (2103.24)	JFP3737.2	*	Negativo	2103.24	<i>Croton</i> sp.	Euphorbia ceae	erva	184671	1600	1600	
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.7 (2114.19)	JFP3738.1	*	Negativo	2114.19	<i>Hyptis</i> sp. (Lamiaceae)	Lamiacea e	erva	184672	1400	1600	
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.7 (2114.23)	JFP3739.2	*	Negativo	2114.23	<i>Heliotropium</i> sp.	Boraginac eae	erva	184673	1400	100	
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> sp.7 (2117.12)	JFP3740.2	*	Negativo	2117.12	Campanulaceae	Campanul aceae	erva	184674	1600	1600	
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> <i>nematodiphila</i> (2114.20)	JFP3738.3	A.D.M.	Negativo	2114.20	<i>Hyptis</i> sp. (Lamiaceae)	Lamiacea e	erva	184672	1400	1600	
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> <i>nematodiphila</i> (2118.14)	T01	A.D.M.	Negativo	2118.14	<i>Indigofera</i> <i>spicata</i> Forssk.	Fabaceae	erva	184473	1400	1600	
Enterobacteriac eae	<i>Serratia</i> <i>nematodiphila</i> (2246.03)	EM02	A.D.M.	Negativo	2246.03	<i>Cecropia pachyst</i> <i>achya</i> Trécul	Cecropiac eae	árvore	sem <i>voucher</i>	1400	*	
Staphylococac eae	<i>Staphylococcus</i> <i>warnerii</i> (2086.12)	B05	A.D.M.	Positivo	2086.12	<i>Ricinus comunis</i> L.	Euphorbia ceae	arbusto- arvoreta 3m	sem <i>voucher</i>	< 3,2	100	
Xanthomonada ceae	<i>Stenotrophomon</i> <i>as cf. pavanii-</i> <i>maltophilia</i> (2103.18)	JFP3707.1	A.D.P.	Negativo	2103.18	<i>Borreria</i> sp.	Rubiaceae	erva	184641	1050	*	
Xanthomonada ceae	<i>Stenotrophomon</i> <i>as cf. pavanii-</i> <i>maltophilia</i> (2117.08)	JFP3736.5	A.D.P.	Negativo	2117.08	Asteraceae (flor roxa)	Asteracea e	erva	184670	1050	50	