

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ENNE GOMES ALVES

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ALCALIFÍLICAS
ASSOCIADAS AOS RESÍDUOS DE BAUXITA**

POÇOS DE CALDAS/MG

2015

ENNE GOMES ALVES

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ALCALIFÍLICAS
ASSOCIADAS AOS RESÍDUOS DE BAUXITA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: monitoramento ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antônio de Andrade Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Gunther Brucha

POÇOS DE CALDAS/MG

2015

A474i

Alves, Enne Gomes.

Isolamento e identificação de bactérias alcalifílicas associadas aos resíduos de bauxita./ Enne Gomes Alves. - Poços de Caldas, 2014.

74 fls.: il.; 30 cm.

Orientador: Claudio Antonio de Andrade Lima.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental). –
Universidade Federal de Alfenas- Poços de Caldas, MG, 2014.

Bibliografias

1. Resíduos de bauxita. 2. Lama vermelha. 3. Bactérias alcalifílicas. I. Lima, Claudio Antonio de Andrade (orient.). II. Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL. III. Título.

CDD 673

ENNE GOMES ALVES

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
ALCALIFÍLICAS ASSOCIADAS AOS RESÍDUOS DE BAUXITA**

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia Ambiental, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração: Ciência e Engenharia Ambiental.

Aprovada em: 13 de novembro de 2014.


Professor Doutor Cláudio Antônio de Andrade Lima

Instituição: Universidade Federal de Alfenas


Professora Doutora Renata Piacentini Rodriguez

Instituição: Universidade Federal de Alfenas


Professora Doutora Cristine Chaves Barreto

Instituição: Universidade Católica de Brasília

Dedico aos meus pais, irmão e família pelo apoio que sempre me deram e por me ensinarem que não existe recompensa sem luta.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Cláudio Lima por ter aceitado me orientar quando estava sozinha, aceitando o desafio e me apresentando ao projeto de pesquisa pelo qual me apaixonei. Pela dedicação, orientação e compreensão sempre presentes.

Ao Professor Doutor Gunther Brucha pelo aceite da co-orientação, por me apresentar o universo da biologia molecular, pela dedicação, acompanhamento e disponibilidade durante toda a pesquisa e laboratório.

A Pós-doutoranda Elize Hayashi, pois foi essencial durante toda a pesquisa, pela paciência e vontade de me ensinar todas as técnicas e processos da nossa pesquisa, pelas conversas profissionais e pessoais e estar sempre disposta a me ajudar.

Aos pesquisadores da Indústria de Alumínios parceira neste projeto, Jorge Gallo e Marcelo Montini, pela oportunidade da pesquisa e disponibilidade de explicar e acompanhar todos os procedimentos.

A todos os técnicos dos laboratórios por sempre estarem dispostos a emprestarem equipamentos e reagentes. Aos alunos do laboratório de Microbiologia Ambiental pela ajuda, principalmente ao mestrando Euzébio Beli.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental, Alexandre Silveira e Renata Rodriguez, pela ética e profissionalismos dedicados ao bom desenvolvimento do mestrado.

A todos os professores do Programa de Mestrado por fazerem parte da minha formação.

A todos do Programa por me aceitarem de tão longe e compreenderem minhas dificuldades de distância e saudades.

A Universidade Federal de Alfenas pela concessão da bolsa de mestrado, sem ela seria pouco provável chegar até aqui.

A Poços de Caldas, por ter me acolhido tão bem e me mostrado diferente e incrível cultura.

A toda a minha família, Gomes e Alves, que sabem que sou realmente grata por sempre me apoiarem e estarem presente em todas as etapas da minha vida. Principalmente, a minha mãe, Marinêz, ao meu pai, Donisete e ao meu irmão, Don, pela superação da distância, por ouvir e compreender minhas reclamações e por todo amor de sempre.

Aos meus amigos, pela vida social e companheirismo proporcionados. Aos colegas de mestrado, por todos os desabafos compartilhados e ajuda na formação acadêmica.

RESUMO

Os resíduos de bauxita representam um passivo ambiental importante devido aos riscos ao meio ambiente associados à elevada alcalinidade e aos custos do manejo e disposição. Como pouco se conhece sobre o estabelecimento de populações microbianas nesses locais de disposição dos resíduos de bauxita, o objetivo do presente estudo foi isolar e identificar microrganismos presentes em amostras coletadas em depósito localizado na região de Poços de Caldas, Minas Gerais. Para tanto, amostras de resíduos foram coletadas das profundidades de 0,25, 0,50 e 1 m e da água de dreno e inoculadas em culturas de enriquecimento com meio alcalino (pH 10,5), para cultivo em aerobiose e anaerobiose e isolamento de cepas a partir das culturas enriquecidas. As cepas isoladas foram submetidas a análise por microscopia óptica, PCR, DGGE e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Foram isoladas 6 cepas de bactérias sob condições aeróbias (2 de cada profundidade). Os 6 isolados apresentaram forma bacilar, coloração Gram-positiva, e a análise do sequenciamento indicou que todos pertencem ao gênero *Bacillus* e correlacionam-se a 3 grupos alcalifílicos distintos com alto grau de identidade: as cepas A1 e A2 (0,25m de profundidade) com *Bacillus cohnii*; as cepas B1, B2 (0,50m) e C2 (1m) com *Bacillus pseudofirmus*; e a cepa C1 (1m) com as espécies *Bacillus polygona* e *Bacillus clarkii*. Os presentes resultados mostram o enriquecimento e o isolamento bem sucedidos de bactérias alcalifílicas dos resíduos de bauxita, que permitirão estudos mais aprofundados das mesmas e melhor compreensão desse ambiente extremo.

Palavras-chave: Resíduos de bauxita. Lama vermelha. Bactérias alcalifílicas. Biorremediação.

ABSTRACT

The bauxite waste represents an important environmental liabilities due to the risks to the environment associated with high alkalinity and management costs and disposal. As little is known about the establishment of microbial populations in these disposal sites of bauxite residue, the objective of this study was to isolate and identify microorganisms present in samples from a deposit located in the region of Pocos de Caldas, Minas Gerais. Therefore, samples were collected from the depths of 0.25, 0.50 and 1 m and from drain water and inoculated in alkaline medium (pH 10.5) for enrichment cultures, for growing under aerobic and anaerobic conditions and isolation strains from enriched cultures. The isolated strains were examined by light microscopy, PCR, DGGE and partial sequencing of the 16S rRNA gene. 6 strains were isolated of bacteria under aerobic conditions (at a depth of 2). The 6 isolates showed bacillary form, Gram-positive staining, and the analysis of sequencing indicated that all belong to the genus *Bacillus* and correlate the three distinct groups alcalifilicos with a high degree of identity: the A1 and A2 strains (0.25m deep) with *Bacillus cohnii*; strains B1, B2 (0.50m) and C2 (1m) with *Bacillus pseudofirmus*; and the C1 strain (1m) with *Bacillus clarkii* and *Bacillus polygona*. The present results show the enrichment and the successful isolation of alkaliphilic bacteria waste of bauxite, which will allow further study of the same and better understanding of this extreme environment.

Keywords: Bauxite waste. Red mud. Alkaliphilic bacteria. Biorremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma das etapas do processamento da bauxita para formação de alumina no Processo Bayer	18
Figura 2 - Esquema do Processo <i>Bayer</i>	19
Figura 3 - Caracterização de locais típicos de áreas de disposição de resíduos de bauxita	22
Figura 4 - Mapa do Brasil destacando o estado de Minas Gerais, a cidade de Poços de Caldas e a lagoa de disposição de resíduos de bauxita de onde foram coletadas as amostras	29
Figura 5 - Planta Geral das áreas de disposição dos resíduos de bauxita da Alcoa Alumínios, unidade de Poços de Caldas - MG	31
Figura 6 - Fluxograma da metodologia empregada no estudo	32
Figura 7 - Fotos microscópicas (aumento de 1000x) das culturas de enriquecimento de bactérias sob condições aeróbias e anaeróbias	46
Figura 8 - Fotos microscópicas (aumento de 1000x) das bactérias isoladas sob condições aeróbias, em lâminas de coloração <i>Gram</i>	48
Figura 9 - Eletroforese em agarose a 1,5% dos produtos de PCR do gene 16S rRNA, com os <i>primers</i> 968F-GC e 1401R, obtidos a partir da extração de DNA das cepas isoladas sob condições aeróbias dos resíduos de bauxita	51
Figura 10 - Eletroforese em agarose a 1,5% dos produtos de PCR do gene 16S rRNA purificados, com os <i>primers</i> 27f e 1401R, obtidos a partir da extração de DNA das cepas isoladas sob condições aeróbias dos resíduos de bauxita	52

Figura 11 - Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) dos produtos de PCR, com os <i>primers</i> 968F-GC e 1401R, obtidos a partir da extração de DNA das cepas isoladas sob condições aeróbias dos resíduos de bauxita	53
Figura12 - Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA, mostrando a relação entre as cepas isoladas dos resíduos de bauxita e espécies validamente publicadas. A significância de cada ramo é indicada pelo valor <i>Bootstrap</i> , calculado para 1000 subconjuntos	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração (%) típica de constituintes da bauxita	20
Tabela 2 -	Listagem dos reagentes e suas respectivas concentrações de estoque, concentrações finais e volumes utilizados na reação de PCR	39
Tabela 3 -	pH das amostras de resíduos de bauxita	43
Tabela 4 -	Caracterização química das amostras de resíduos de bauxita, pela análise <i>X-ray fluorescence</i>	44
Tabela 5 -	Valores de Teor Cáustico (TC), Teor Alcalino (TA) e a razão entre estes teores, que representa a alcalinidade nas amostras da ARB7	45
Tabela 6 -	Matriz de diferenças nas sequências parciais alinhadas (556 bases) do gene 16S rRNA das cepas isoladas, obtida através do programa <i>BioEdit</i>	55

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ABAL -	Associação Brasileira do Alumínio
ABPM -	Associação Brasileira de empresas de Pesquisa Mineral
ARB -	Área de disposição final do Resíduo de Bauxita
CETESB -	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
dATP -	DesoxiAdenosina Trifosfatada
dCTP -	DesoxiCitidina Trifosfatada
DGGE -	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
dGTP -	DesoxiGuanosina Trifosfatada
DNA -	Ácido DesoxirriboNucleico
dNTP -	DesoxirriboNucleotídeos Fosfatados
dTTP -	DesoxiTimidina Trifosfatada
IB -	Instituto de Biociências
MG -	Minas Gerais
PCR -	Reação em Cadeia de Polimerase
RB -	Resíduos de Bauxita
rRNA -	Ácido RiboNucleico ribossomal
TA -	Teor Alcalino
TC -	Teor Cáustico
USP -	Universidade de São Paulo
XRF -	Fluorescência de Raios X

SUMÁRIO

1	Introdução	14
2	Objetivos	16
2.1	<i>Objetivo geral</i>	16
2.2	<i>Objetivo específico</i>	16
3	Revisão Bibliográfica	17
3.1	<i>Resíduos de bauxita (RB)</i>	17
3.2	<i>Microrganismos alcalifílicos</i>	24
3.3	<i>Técnicas de biologia molecular</i>	26
3.4	<i>Considerações finais</i>	28
4	Materiais e Métodos	29
4.1	<i>Manejo dos resíduos de bauxita e seleção do local de amostragem</i>	29
4.2	<i>Delineamento experimental do estudo</i>	32
4.3	<i>Coleta dos resíduos de bauxita</i>	33
4.4	<i>Análises físico-químicas dos resíduos de bauxita</i>	33
4.5	<i>Preparo do meio de enriquecimento dos microrganismos presentes nos resíduos de bauxita</i>	34
4.6	<i>Enriquecimento dos microrganismos presentes nos resíduos de bauxita, sob condições aeróbias e anaeróbias</i>	35
4.7	<i>Isolamento dos microrganismos presentes nos resíduos de bauxita, sob condições aeróbias e anaeróbias</i>	36
4.8	<i>Exame bacterioscópico dos microrganismos cultivados</i>	37
4.9	<i>Análise molecular dos microrganismos presentes nos resíduos de bauxita</i>	37
4.9.1	<i>Extração de DNA</i>	37
4.9.2	<i>PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)</i>	38
4.9.3	<i>DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante)</i>	39
4.9.4	<i>Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA</i>	40

4.9.5	<i>Análise do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA</i>	40
5	Resultados e Discussão	42
5.1	<i>Local de amostragem</i>	42
5.2	<i>Análises físico-químicas dos resíduos de bauxita</i>	42
5.3	<i>Enriquecimento dos microrganismos presentes nos resíduos de bauxita, sob condições aeróbias e anaeróbias</i>	45
5.4	<i>Isolamento dos microrganismos presentes nos resíduos de bauxita, sob condições aeróbias e anaeróbias</i>	47
5.5	<i>Análise molecular dos microrganismos presentes nos resíduos de bauxita</i>	49
5.5.1	<i>Extração de DNA</i>	49
5.5.2	<i>PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)</i>	50
5.5.3	<i>DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante)</i>	52
5.5.4	<i>Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA</i>	53
6	Conclusão	59
7	Recomendações	61
	REFERÊNCIAS	62
	APÊNDICE	69
	ANEXOS	71

1 Introdução

O alumínio é o terceiro elemento químico mais abundante na crosta terrestre e o metal não ferroso mais utilizado no mundo. É obtido comercialmente a partir da bauxita, um minério encontrado nos grupos climáticos Mediterrâneo, Tropical e Subtropical (ABAL, 2014). No beneficiamento industrial da bauxita para produção de alumina e, por conseguinte, do metal de alumínio, utilizam-se grandes quantidades de hidróxido de sódio (NaOH) para a digestão do minério, tecnologia conhecida como *Processo Bayer*, que ainda incorpora a etapa de clarificação onde separa-se o aluminato de sódio do Resíduo de Bauxita (RB).

O RB é um resíduo associado a importantes preocupações econômicas e ambientais devido a magnitude da quantidade gerada, ao elevado custo envolvido em seu manejo e disposição, bem como, pelos riscos ao meio ambiente advindos da elevada alcalinidade que estes resíduos apresentam.

Segundo a Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa Mineral (ABPM, 2014), a produção mundial de bauxita em 2013 foi de cerca de 273 milhões de toneladas, e os principais países produtores foram Austrália, Indonésia, China, e Brasil. Ocupando o quarto lugar, o Brasil produziu cerca de 35 milhões de toneladas de bauxita, dos quais, cerca de um milhão foi produzido somente em Poços de Caldas, Minas Gerais.

A principal destinação adotada para os RB é sua deposição em grandes diques, de 10 a 50 hectares, com vida útil de operação de 5 a 10 anos. Após este tempo, o resíduo ainda apresenta-se como uma lama espessa, elevado pH (superior a 10), alta concentração de íons solúveis e escassez em matéria orgânica e nutrientes.

Em termos globais, para se produzir 1 tonelada de metal são necessárias 2 toneladas de alumina, gerando cerca de 2 toneladas de RB. Ribeiro et al. (2014) estima que cerca de 10,6 milhões de toneladas de RB são descartados anualmente no Brasil, enquanto cita a geração mundial de mais de 117 milhões

de toneladas/ano. Já em relação ao elevado custo de estocagem de RB, reportam algo em torno de 1 a 2% do preço da alumina.

Devido ao grande acúmulo dos RB, pesquisas têm sido desenvolvidas na busca de alternativas para o uso destes resíduos em diversos setores da economia, todavia todas elas esbarram na viabilidade econômica para o uso total dos resíduos e nas dificuldades associadas a logística de se transportar grandes quantidades por longas extensões.

Por outro lado, o que impede a logística reversa do RB para a o local de onde foi extraída a bauxita, é a condição intrínseca de elevada alcalinidade proveniente da adição de soda cáustica. Assim, a hipótese motivadora desta pesquisa é a busca por formas de redução desta alcalinidade, por meio da biorremediação, como opção tecnológica para tornar o RB mais amigável ao meio ambiente e ao seu local de origem.

Nos RB podem existir microrganismos capazes de produzir ácidos orgânicos através do seu metabolismo, os quais fazem com que o pH do meio diminua após um certo período de tempo. Este mecanismo pode promover a recuperação destes resíduos, tornando-os inertes e possíveis de serem utilizados para a recomposição da mina.

Como pouco se conhece sobre o estabelecimento de populações microbianas junto aos resíduos de bauxita, o objetivo do presente estudo foi isolar e identificar microrganismos presentes em amostras coletadas na região de Poços de Caldas - MG, em área de disposição típica destes resíduos, contribuindo assim com as pesquisas ligadas a opção de biorremediação do RB.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo desta pesquisa foi isolar e identificar microrganismos presentes em amostras de resíduos de bauxita (RB) coletadas em uma área típica de disposição situada na região de Poços de Caldas, Minas Gerais.

2.2 Objetivos específicos

Foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ compreender o processo de geração e manejo dos resíduos de bauxita para selecionar o local para coleta de amostras representativas;
- ✓ realizar a caracterização físico-química das amostras utilizadas;
- ✓ verificar a diversidade de microrganismos presente nas amostras de resíduos de bauxita através da extração de DNA;
- ✓ enriquecer e isolar em meio de cultivo os microrganismos presentes nas amostras de RB, sob condições anaeróbias e aeróbias;
- ✓ identificar a microbiota cultivável isolada sob condições aeróbias, por meio de técnicas de microscopia e análise molecular.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Resíduos de bauxita (RB)

A bauxita é um minério de coloração avermelhada rica em alumínio, constituída por óxidos de alumínio hidratados de composições variáveis, encontrada nos grupos climáticos Mediterrâneo, Tropical e Subtropical, e é utilizada, principalmente, por indústrias metalúrgicas. Deste minério é obtida a alumina (óxido de alumínio - Al_2O_3), que é precursora do metal alumínio. A bauxita deve apresentar no mínimo 30% de alumina aproveitável para que a produção de alumínio seja economicamente viável (ABAL, 2014).

A bauxita é obtida, geralmente, por mineração a céu aberto, onde a camada de solo com vegetação é retirada e armazenada para posterior utilização na reabilitação da mina (ESCOBAR, 2004).

A produção mundial de bauxita em 2013 foi cerca de 273 milhões de toneladas, sendo que os principais países produtores foram Austrália, Indonésia, China, e Brasil. Ocupando o quarto lugar, o Brasil produziu cerca de 35 milhões de toneladas de bauxita, dos quais, cerca de um milhão foi produzido somente em Poços de Caldas - MG (ABPM, 2014).

O alumínio tem grande aplicação na indústria devido as suas propriedades, tais como dureza, boa condutividade térmica e elétrica, é de fácil fabricação, resistente a várias substâncias químicas e não é tóxico (KRISHNA, 2003).

Por volta do ano de 1850, Louis Le Chatelier desenvolveu um método para o refino da bauxita e produção de alumina. O processo *Le Chatelier* consistia no aquecimento da bauxita com carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 1200°C ; remoção dos aluminatos e da água formados; precipitação, filtração, secagem e limpeza do hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) (SILVA FILHO et al., 2007). Já em 1888, foi desenvolvido e patenteado por Karl Josef Bayer um novo processo de refino, onde o carbonato de sódio foi substituído pelo hidróxido de sódio (NaOH) e a digestão da bauxita é feita sob pressão (HIND et al., 1999).

Este processo substituiu o *Le Chatelier* por diminuir os custos de produção e é, até hoje, a tecnologia predominantemente adotada pelas indústrias de alumínio.

A descrição do processo *Bayer* pode ser sintetizada por quatro etapas principais: digestão, clarificação, precipitação e calcinação. A Figura 1 apresenta o fluxograma simplificado deste processo industrial, onde destaca as principais etapas e o ponto de geração do RB (Lama Vermelha).

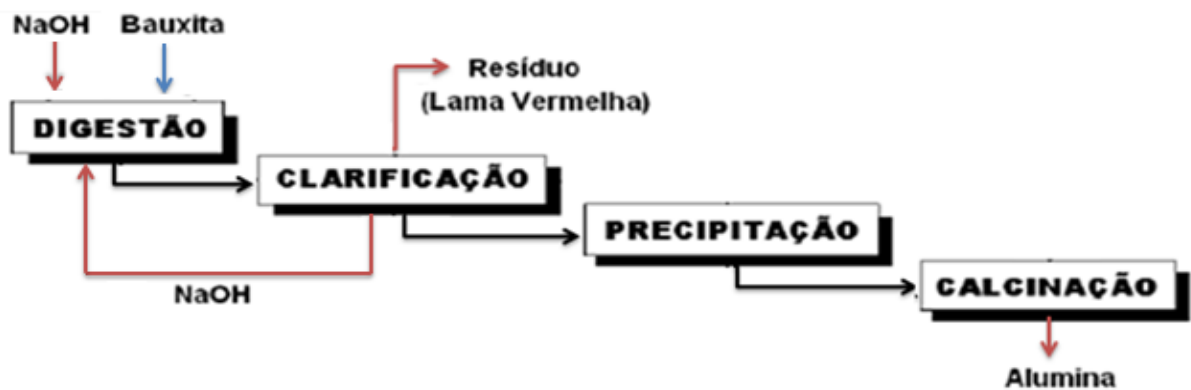


Figura 1 - Fluxograma das etapas do processamento da bauxita para formação de alumina no Processo Bayer.

Fonte: Adaptado de Silva Filho et al. (2007).

Conforme pode-se observar na Figura 2, na primeira etapa do *Processo Bayer* (digestão) a bauxita é triturada por moagem e digerida com hidróxido de sódio (NaOH) sob alta temperatura, em torno de 220°C, e elevada pressão, cerca de 30 atm. Na segunda etapa, operação unitária de clarificação/filtração, ocorre a separação dos aluminatos que irão compor a fase líquida, dos resíduos de bauxita, retirados do processo como fase sólida. Já na terceira etapa do processo (precipitação), são adicionados cristais de alumina (semeadura) para estimular a formação do produto precipitado. Na etapa final (calcinação), a alumina cristalizada é lavada, secada e calcinada a aproximadamente 1000°C para desidratar os cristais, formando, assim, cristais de alumina puros com um aspecto de pó branco (HIND et al., 1999; SILVA FILHO et al., 2007; HYDRO, 2014).

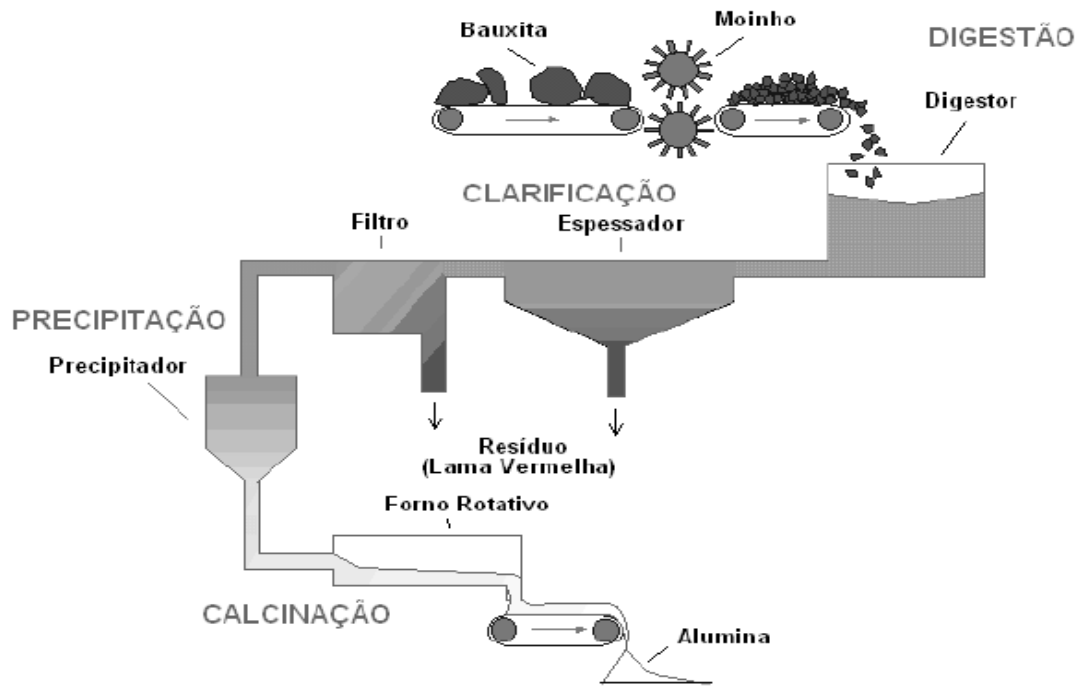


Figura 2 - Esquema do Processo Bayer. Fonte: Silva Filho et al. (2007).

Em termos gerais, para se produzir 1 tonelada do metal alumínio, são necessárias 2 toneladas de alumina e gerados cerca de 2 toneladas de resíduos de bauxita (SILVA FILHO et al., 2007). Logo, à medida que a produção de alumina e alumínio crescem, os volumes de geração de RB se tornam, também, cada vez mais grandiosos. Cabe ainda destacar que os volumes de RB gerados são intrinsecamente dependentes da qualidade da bauxita utilizada, isto é, quanto menor o teor de alumina disponível, maior será a quantidade de resíduo gerado.

Os resíduos gerados no *Processo Bayer* (RB) são também conhecidos como “lama vermelha”, e possuem essa coloração devido à presença de óxido de ferro (KRISHNA, 2003). A composição do RB varia de acordo com a natureza da bauxita e da técnica empregada no *Processo Bayer* (SILVA FILHO et al., 2007; THAKUR; DAS, 1994). Normalmente, ela é constituída em maior quantidade por ferro, alumínio, titânio, sílica, cálcio, sódio e traços de outros elementos (RAGHAVAN et al., 2011; HIND et al., 1999; VACHON et al., 1994). Os RB são insolúveis, constituídos por partículas finas e possuem elevada alcalinidade,

devido a remoção incompleta do hidróxido de sódio adicionado no processamento da bauxita (HIND et al., 1999; KRISHNA et al., 2005).

Silva et al. (2009), em estudo versando sobre a metodologia de caracterização tecnológica da bauxita, apresenta os resultados de uma típica composição química deste minério, encontrada no estado do Pará - Brasil, mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração (%) típica dos constituintes da bauxita.

	Certificado	Desvio padrão	Número de replicatas	Encontrado	Desvio padrão	Número de replicatas
Al₂O₃	54,1	0,3	6	54,1	0,3	3
SiO₂	0,78	0,04	6	0,77	0,02	2
Fe₂O₃	11,5	0,1	6	11,3	0,5	3
P₂O₅	0,15	0,02	6	0,15	0,01	3
TiO₂	1,77	0,04	6	1,5	0,30	3
MnO	0,31	0,02	6	0,26	0,08	4
V₂O₅	0,042	0,005	6	0,038	0,00	4
ZnO	0,013	0,002	6	0,013	0,00	4
Disponível	52,0	0,3	6	52,2	0,2	3
Reativo	0,4	0,1	6	0,4	0,0	4

Fonte: Silva et al. (2009).

Segundo Silva Filho et al. (2007), a qualidade da jazida de bauxita utilizada influencia diretamente na quantidade de lama vermelha gerada, bem como, no teor de sólidos com que esta é lançada, o que está diretamente ligado ao manejo da disposição final adotada. Métodos conhecidos como "disposição seca" produzem uma menor quantidade de lama vermelha que os de "disposição úmida".

O RB pode se apresentar como suspensão com teor de sólidos de 20 a 80%, dependendo do método de disposição. Para métodos de disposição úmida, o teor será próximo aos limites inferiores pois estão associados a condição de diluição para viabilizar o bombeamento.

A lama vermelha faz parte de um grupo de rejeitos conhecidos como "tailings", resultantes do processamento de minérios pela indústria extrativista mineral. Estes resíduos são solos que continham o mineral de interesse ou

resultam da moagem de rochas. Dependendo do processo de extração, podem ser adicionadas substâncias químicas como, por exemplo, a soda cáustica empregada no refino da alumina. Os "tailings" caracterizam-se por serem lamas formadas por partículas muito finas. Este método de disposição de lamas, ou métodos úmidos, são assim denominados devido à grande quantidade de água de processo que segue com o material sólido para disposição. Os métodos úmidos aplicáveis à lama vermelha consistem em grandes diques onde a lama vermelha é disposta com baixo teor de sólidos. A separação de fases ocorre no local de disposição, onde o material sólido se sedimenta e surge um sobrenadante alcalino, o qual é recirculado para o processo (SILVA FILHO et al., 2007; GRAFE; KLAUBER, 2011).

Esta técnica caracteriza-se também, pelo acréscimo de grande quantidade de água para viabilizar o bombeamento do RB, fazendo com que a Área de disposição final dos Resíduos de Bauxita (ARB) tenha a aparência de uma lagoa, por isto esta área também é conhecida como "lagoa vermelha".

A deposição em grandes diques é a principal destinação adotada para os RB, ocupando áreas de 10 a 50 hectares com vida útil de operação de 5 a 10 anos. Após este tempo, o resíduo ainda apresenta-se como uma lama espessa, elevado pH (superior a 10), alta concentração de íons solúveis e escassez em matéria orgânica e nutrientes (NGUYEN ; BOGER, 1998).

A Figura 3 ilustra algumas das fases de implantação e gestão de áreas típicas de disposição dos resíduos de bauxita, denominadas de ARBs.

Embora a operação aparente ser simples, considerando a sedimentação natural da fase sólida e a recirculação do sobrenadante para a fábrica, os custos associados à este método são elevados, devido à necessidade de impermeabilização da área antes da disposição (normalmente com mantas geotêxteis) ou da aplicação de camada de material impermeável, já que contém riscos de contaminação do solo e do lençol freático.



Figura 3 - Caracterização de locais típicos de áreas de disposição de resíduos de bauxita (ARB). Sendo (A) Vista aérea com água de reciclo; (B) Vista aérea; (C) Aplicação de manta geotêxtil para impermeabilização; e, (D) Vista aérea de área revegetada.
Fonte: Costa Filho (2008).

A toxicidade da lama vermelha ainda é questionada. Não é classificada como perigosa, porém Hind et al. (1999) consideram-na tóxica, porque pode constituir um perigo às populações vizinhas à área de depósito de RB, devido à presença de elevados valores de hidróxido de sódio. Logo, a lama vermelha representa um passivo ambiental pelos possíveis riscos de contaminação do meio ambiente e aos altos custos e perigos associados ao seu manejo e disposição (SILVA FILHO et al., 2007).

Em 1965 na França, protestos públicos contra o despejo dos resíduos de bauxita na Baía de Cassis (Mar Mediterrâneo) chamaram a atenção para o

problema ambiental que estes resíduos podem causar (THAKUR; DAS, 1994). E, com a expansão da indústria de alumínio também cresceram os episódios de acidentes associados ao manejo de resíduos de bauxita e as ARBs.

Em 2003 e 2009, a bacia de resíduos da empresa Alunorte, no município de Barcarena - Pará, transbordou devido as grandes chuvas na época, o que causou contaminação do Rio Murucupi, mortandade de peixes e comprometimento do uso da água pelos ribeirinhos (NASCIMENTO, 2010). Em 2004, ocorreu em São Paulo um vazamento de cerca de 900.000 litros de lama vermelha, que atingiu o córrego do Bugre, rios Varzão e Pirajibu, na bacia do Rio Sorocaba (CETESB, 2004). Em 2007, a barragem de rejeitos de bauxita da empresa Mineração Rio Pomba Cataguases Ltda, localizada no município de Mirai - Minas Gerais, rompeu devido a rápida elevação do nível de água pelas chuvas e o vazamento de lama foi estimado em 2 bilhões de litros de resíduos de bauxita (70% do material que estava retido) (MACHADO, 2007). Já em 2010, houve um vazamento do tanque de disposição da fábrica de alumínios Ajkai Timfoldgyar Zrt, no oeste da Hungria, que liberou cerca de 650.000m³ destes resíduos (MAYES et al., 2011).

As indústrias de alumínios vêm tomando medidas para reduzir o risco de acidentes relacionados à disposição dos RB. Tais como, o incentivo e aplicação de métodos de reciclagem para estes resíduos, busca de melhores tecnologias para a construção das lagoas vermelhas, investimentos em planos de recuperação destas áreas com revegetação, entre outras medidas (HYDRO, 2014; ALCOA, 2014). Com isso, atualmente o maior problema com os resíduos de bauxita para as indústrias de alumínios é o elevado custo para sua disposição e manutenção, que gira em torno de 1 a 2% do valor da produção de alumina (RIBEIRO et al., 2014).

Devido o grande acúmulo dos resíduos de bauxita, pesquisas têm sido desenvolvidas para produzir maneiras alternativas para o uso destes resíduos em diversos setores da economia (SILVA FILHO et al., 2007; LIU et al., 2011). Na indústria cerâmica ela é utilizada, por exemplo, para revestimento de porcelanas, vítricos e eletroporcelanas (YALÇIN; SEVINÇ, 2000); na construção

civil, para a produção de cimento, tijolo e concreto (TSAKIRIDIS et al., 2004); na recuperação de metais, tais como ferro, alumínio, titânio, vanádio e escândio (KUMAR; BANDYOPADHYAY, 2006). Pode ser também utilizada como adsorvente nos tratamentos de resíduos líquido e gasosos, adsorvendo ânions, metais pesados, corantes e microrganismos (WANG et al., 2008); como catalisadora, na oxidação de hidrocarboneto e nas reações de hidrogenação e liquefação (SUSHIL; BATRA, 2008); na correção de solos contaminados por metais pesados, baseando-se na extração ou na estabilização dos contaminantes (GRAY et al., 2006); fornece material para a construção de raios-X e CT scanner (AMRITPHALE et al., 2007); e, para a revegetação de áreas alteradas (KRISHNA et al., 2005).

Apesar dos diversos métodos existentes para a reutilização dos resíduos de bauxita, grande quantidade ainda não é tratada, devido aos altos custos associados à maioria das técnicas (transporte e aplicação do método). Tornando-se, assim, fundamental encontrar soluções custo-efetivas para o uso destes resíduos (LIU et al., 2011).

Não obstante as alternativas de reuso e aprimoramento da disposição dos RB, abre-se também novas perspectivas associadas a biorremediação.

A lama vermelha pode ser considerada um ambiente extremo único, por suas características de alcalinidade, salinidade, condição sódica, presença de metais pesados e baixo teor de carbono orgânico e nitrogênio. O que torna importante a investigação da presença de microrganismos e as interações biológicas que ocorrem neste meio (KRISHNA et al., 2014).

3.2 Microrganismos alcalifílicos

Organismos extremófilos são aqueles capazes de se desenvolver em condições ambientais extremas. Quanto à habilidade de crescimento em extremos de pH, podem ser divididos em acidófilos e alcalifílicos. Os microrganismos alcalifílicos possuem sua taxa de crescimento ótima em um pH entre 10 e 12 (KRULWICH; GUFFANTI, 1989). Este tipo de microrganismo pode

produzir ácidos orgânicos no meio fazendo com que o pH da solução diminua (HORIKOSHI, 1999). Os alcalifílicos podem ser isolados a partir de solos que apresentam condições alcalinas transientes geradas por atividades biológicas, porém, são naturalmente encontradas em ambientes alcalinos estáveis, como lagos de soda e em processos industriais (GRANT et al., 1990).

Os microrganismos alcalifílicos podem ser classificados em dois grupos fisiológicos: alcalifílicos e haloalcalifílicos. Os alcalifílicos habitam ambientes com pH superior a 9 e têm sido isolados normalmente de solos e fezes. Já os haloalcalifílicos, além de sobreviverem em pH superior a 9, também, suportam ou necessitam de uma elevada salinidade do meio e, geralmente, são isolados de lagos de soda (HORIKOSHI, 1999).

Os microrganismos alcalifílicos conseguem habitar ambientes de alcalinidade extrema devido às adaptações estruturais e fisiológicas em suas células. Por exemplo, a parede celular mantém o meio intracelular neutro, através de peptidoglicanos e polímeros ácidos (tais como, ácido galacturônico, glucônico, glutâmico, aspártico e fosfórico). Assim, as cargas negativas dos componentes ácidos podem promover à superfície da célula a capacidade de adsorver sódio, íons hidrônio e repelir íons hidróxido (HORIKOSHI, 1999). Em ambientes alcalinos, esses microrganismos podem ainda secretar ácidos orgânicos para manter a homeostase entre seu citoplasma e o meio (KRISHNA et al., 2014).

Os microrganismos capazes de habitar condições extremas vêm ganhando grande importância nas pesquisas, devido a sua fisiologia e ecologia peculiar (GONZÁLEZ-TORIL et al., 2003), e com isso, têm chamado a atenção no seu uso para aplicações biotecnológicas (NIEHAUS et al., 1999; MARGESIN; SCHINNER, 2001). Diversas proteínas úteis já foram isoladas de extremófilos, por exemplo: lipossomos para aplicações médicas (BATISTA et al., 2007); halocinas produzidas por *Halobacterium* sp. para aplicações clínicas em cardiologia e em transplante de órgãos (SREMAC; STUART, 2008); polihidroxialcanoatos produzidos por *Azotobacter* sp. para a confecção de próteses e plásticos biodegradáveis (PETTINARIM et al., 2001);

bacteriorodopsina para a fabricação de aparelhos óticos (TOPOLANCIK; VOLLMER, 2007); entre outros (SALLOTO et al., 2012; BURG, 2003). Isso demonstra a relevância destes microrganismos, já que sua adaptação a um ambiente extremo obriga-os a desenvolver componentes celulares e estratégias bioquímicas, os quais podem ser empregados às condições drásticas presentes nos processos industriais e biotecnológicos (CHAMPDORÉ et al., 2006).

As pesquisas com microrganismos presentes nos RB, apesar de ainda serem escassas, vêm ganhando grande importância. Agnew et al. (1995) isolaram três bactérias alcalifílicas dos resíduos de bauxita, pertencentes ao gênero *Bacillus*, utilizando meio de cultura oxalato (Na_2CO_3 , $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , MgSO_4 , extrato de levedura e solução de metais e vitaminas). Hamdy e Williams (2001) isolaram, nos Estados Unidos, 150 culturas dos resíduos de bauxita, que pertenciam aos gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Enterobacter*, utilizando meio mínimo de soja triptica contendo tioglicolato e ascorbato de sódio. Garau et al. (2007) fizeram alguns testes com a lama vermelha na Itália com o meio de enriquecimento GYEP (Glucose Yeast Extract Peptone) e verificaram a presença dos gêneros *Flavobacterium*, *Erwinia*, *Bacillus* e *Ralstonia*. Na Índia, Krishna et al. (2008) utilizando o meio de soja triptica e *Horikoshi* isolaram uma espécie do gênero *Kocuria* com 98% de similaridade com *Kocuria aegyptia*. Arora et al. (2013), também na Índia, isolaram a espécie *Paenibacillus montaniterrae* com meio nutriente enriquecido com xilano, peptona, extrato de levedura, K_2HPO_4 , MgSO_4 e KCl.

3.3 Técnicas de biologia molecular

A técnica de cultivo e isolamento de microrganismos é importante porque determina a presença de uma espécie específica presente no ambiente estudado. Os primeiros métodos de cultura pura foram desenvolvidos por Robert Koch há mais de 100 anos. Determinadas condições de cultura (nutrientes, pH, fonte de carbono) favorecem a atividade metabólica de certos

microrganismos, ocasionando o crescimento do organismo desejado. Esta técnica já ajudou na descoberta de importantes grupos de microrganismos com diferentes mecanismos de energia e no conhecimento da variedade de organismos e do metabolismo de cada espécie (OVERMANN, 2006).

As técnicas de biologia molecular independentes do isolamento de culturas puras, por sua vez, são importantes devido à falta de conhecimento das condições de cultivo que reproduzam àquelas do habitat, necessárias ao crescimento da maior parte dos microrganismos, o que dificulta o estudo de grande parte da comunidade microbiana por essa abordagem. Estas técnicas, também, são capazes de fornecer a diversidade microbiana da amostra de forma mais rápida (ERCOLINI, 2004).

O método de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) baseia-se na replicação de uma sequência de ácido nucleico específico de interesse (CARRINO; LEE, 1995). A técnica de DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) é baseada na separação dos produtos de PCR de um determinado gene de uma amostra mista de microrganismos, de acordo com as diferenças na sequência de bases. Considerando que o gene 16S rRNA está presente em todos os procariotos, mas que cada espécie apresenta regiões com diferentes sequências de nucleotídeos, a comparação da sequência deste gene permite a inferência filogenética entre os diversos organismos (NETTO, 2007).

Na técnica de DGGE, os fragmentos de DNA são submetidos a um gradiente de concentrações crescentes de agentes desnaturantes formando diferentes pontos de fusão ao longo do gel. Cada sequência de DNA possui um ponto de fusão (desnaturação) específico (ERCOLINI, 2004), e tem em uma extremidade um “grampo” formado por uma sequência rica em bases G e C, que é inserida em um dos *primers* utilizados no PCR. Esse grampo é resistente à desnaturação e não permite a separação total do fragmento de DNA. Quando o DNA atinge o seu ponto de fusão no gradiente, este se desnatura, permanecendo unido pelo grampo, formando uma estrutura de difícil mobilidade no gel que impede a sua migração. Sequências de DNA diferentes irão parar de migrar em diferentes posições (LERMAN et al., 1984). A presença

de regiões altamente conservadas no gene 16S rRNA permite o desenho de *primers* de PCR específicos e regiões hipervariadas que são utilizadas para inferir relações filogenéticas entre os microrganismos (WARD et al., 1990).

Schmalenberger et al. (2013) estudaram os microrganismos presentes nos RB em um depósito da Irlanda. Coletaram amostras de três ARBs diferentes: duas revegetadas há cerca de 10 anos com diferentes quantidades de gipsita e uma ainda não revegetada. Extraíram DNA diretamente destas amostras com o *Ultra Clean Soil DNA extraction kit* (MoBio). E, identificaram 32 gêneros de bactérias nas amostras, sendo que, na ARB ainda não revegetada foram encontradas com maior abundância espécies dos gêneros *Planctomycetes*, *Bacterioidetes* e *Actinobacteria*; das famílias *Chitinophagaceae*, *Beijerinckiaceae*, *Xanthomonadaceae*, e *Acetobacteraceae*; menor abundância de acidobactérias; e, as espécies dos gêneros *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* eram abundantes nas três ARBs. Assim, concluíram que a revegetação da área com gipsita foi bem sucedida, a qual favoreceu o crescimento de uma comunidade bacteriana rica em acidobactérias e outras espécies típicas de solos, incluindo endossimbióticas, que podem ser organismos indicadores para restaurações futuras de RB.

3.4 Considerações finais

No percurso da revisão bibliográfica confirmou-se a magnitude do problema e o esforço da comunidade científica na busca de soluções sustentáveis para a gestão dos RB. Encontrou-se grande número de publicações relacionados ao seu reuso porém estes estudos ainda não apontam viabilidade econômica para a completa eliminação das ARBs. A alternativa da biorremediação apresenta publicações escassas mas encorajadoras para vislumbrar uma logística reversa para os RB.

Já as publicações relacionadas a identificação de microrganismos alcalifílicos e as técnicas de biologia molecular são fartas e crescentes propiciando referencial teórico mais consistente.

4 Material e métodos

4.1 Manejo dos resíduos de bauxita e seleção do local de amostragem

A partir de seminário de oportunidades realizado entre o Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de Alfenas, *campus* Poços de Caldas - MG, com a indústria Alcoa Alumínio, unidade Poços de Caldas, ficou acordada a abrangência da pesquisa e a colaboração da empresa.

Após diversas reuniões de aproximação com a empresa, definiram-se ações específicas para a melhor compreensão do processo de geração e manejo dos RB, bem como, a operação das ARBs. Dentre estas ações destacam-se as visitas de reconhecimento de campo com esclarecimentos técnicos dos processo de geração e de operação das ARB e acesso aos projetos e relatórios de monitoramento interno da empresa.

A Figura 4 ilustra no mapa do Brasil a localização da área de estudo desta pesquisa com o destaque de imagem de satélite e coordenadas geográficas da área de disposição de resíduos de bauxita estudada.

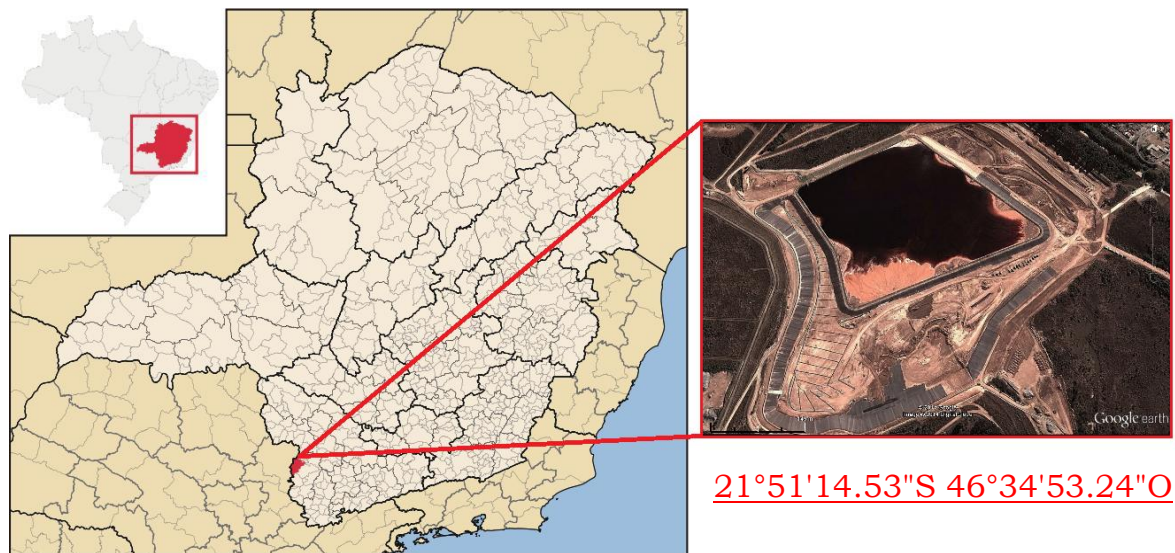


Figura 4 - Mapa do Brasil destacando o estado de Minas Gerais, a cidade de Poços de Caldas e a lagoa de disposição de resíduos de bauxita de onde foram coletadas as amostras, com suas coordenadas geográficas.

Fonte: Raphael Lorenzeto de Abreu, 2006; Google Earth (2014).

O município de Poços de Caldas localiza-se ao sul do Estado de Minas Gérias, na divisa com o Estado de São Paulo. Sua sede entra-se a uma altitude de 1.186 metros. O clima desta área é enquadrado no grupo C (mesotérmico), ou seja, clima mesotérmico de inverno seco, com verões brandos e estação chuvosa no verão. Este tipo de clima é também denominado de “tropical de altitude”, onde a temperatura média anual é em torno de 19,9°C e a pluviosidade entre 1300 mm e 1700 mm. A umidade relativa média do município é de 79% (TINÓS, 2011).

A indústria de alumínio referente ao estudo produz desde 1970, cerca de 275.000 m³/ano de resíduos de bauxita e possui 9 áreas de disposição com o tempo médio de utilização de 5 anos cada (COSTA FILHO, 2008). A Figura 5, apresenta uma planta geral de localização e da área ocupada pelas ARBs, com a codificação utilizada pela empresa para cada ARB, seu estágio de utilização e detalhes sobre o manejo da área. A título de ilustração do problema de gestão de espaço, observa-se que a extensão da área destinada a operação de ARBs ocupa em torno de 90%, enquanto o complexo industrial apenas cerca de 10%.

Buscou-se selecionar uma ARB que representasse a condição exclusiva de presença de RB, isto é, sem a entrada de outros solos como os utilizados na tecnologia de reabilitação da área, garantindo assim a coleta de amostras em um ambiente extremo típico.

Chegou-se a escolha da ARB7, que estava com operação desativada desde o início de 2013 (60%) até meados de 2014 (40%) e ainda sem início das ações de reabilitação da área. O ponto estabelecido para a coleta das amostras foi uma célula construída no topo da área de estocagem da ARB7, em local conhecido como zona final de alteamento.

O método de disposição dos resíduos de bauxita utilizado no depósito é por alteamento, que consiste em estruturas sobrepostas construídas ao longo do tempo, sendo que um dique de partida é construído inicialmente e a contenção passa por alteamentos sucessivos ao longo de sua vida útil (DUARTE, 2008).

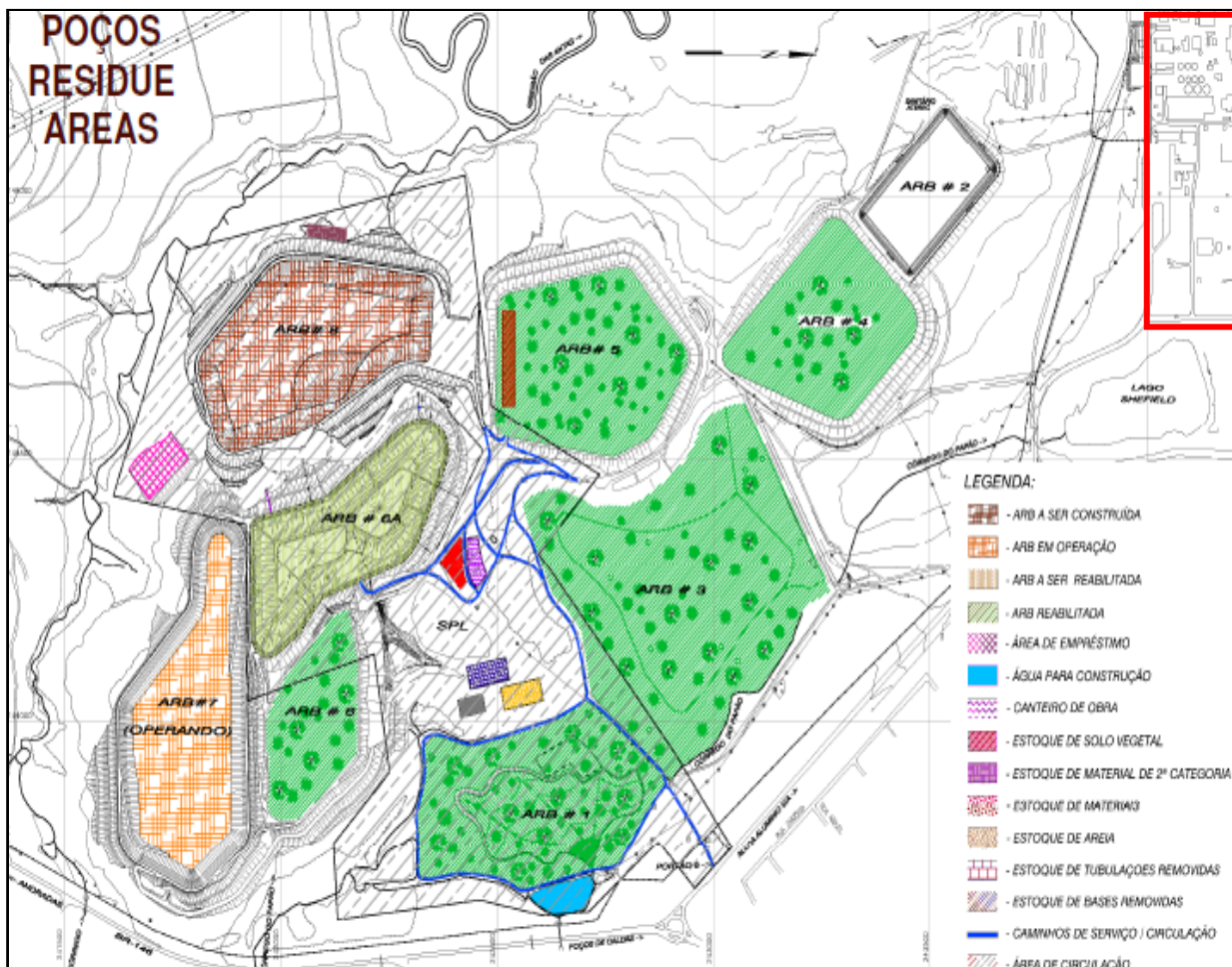


Figura 5 - Planta geral das áreas de disposição dos resíduos de bauxita da Alcoa Alumínios, unidade de Poços de Caldas - MG, com o complexo industrial destacado em vermelho (canto superior direito).
Fonte: Costa Filho (2008).

Assim, a lagoa de onde foram retiradas as amostras utilizadas no presente estudo foi escolhida por ser a de mais fácil acesso para a coleta, por não ter sido revegetada (o que poderia alterar as características físico-químicas e a microbiota dos resíduos) e por não receber mais rejeitos e ter um tempo de disposição que pode garantir uma maior estabilidade da microbiota presente. As profundidades em que as amostras foram coletadas (0,25 m, 0,50 m e 1 m) e a água de dreno, foram escolhidas pela possibilidade de capturar diferentes microrganismos, aeróbios e anaeróbios, devido a capacidade de penetração de oxigênio nos resíduos, e aqueles capazes de serem carregados com a ação da gravidade.

A água de dreno é proveniente da água do processo entremeada no resíduo ao longo do tempo e, também, da água da chuva que se acumula na superfície da ARB e permeia até sua base, onde são coletadas pelo dreno de fundo. A indústria relatou através de constatação visual e dados físico-químicos de controle (dados não divulgados) que as amostras de resíduos de bauxita de seu depósito possuíam a característica de argila.

4.2 Delineamento experimental do estudo

O fluxograma encontrado na Figura 6 apresenta uma síntese de todas as etapas realizadas na metodologia deste estudo, as quais estão descritas individualmente na sequência.

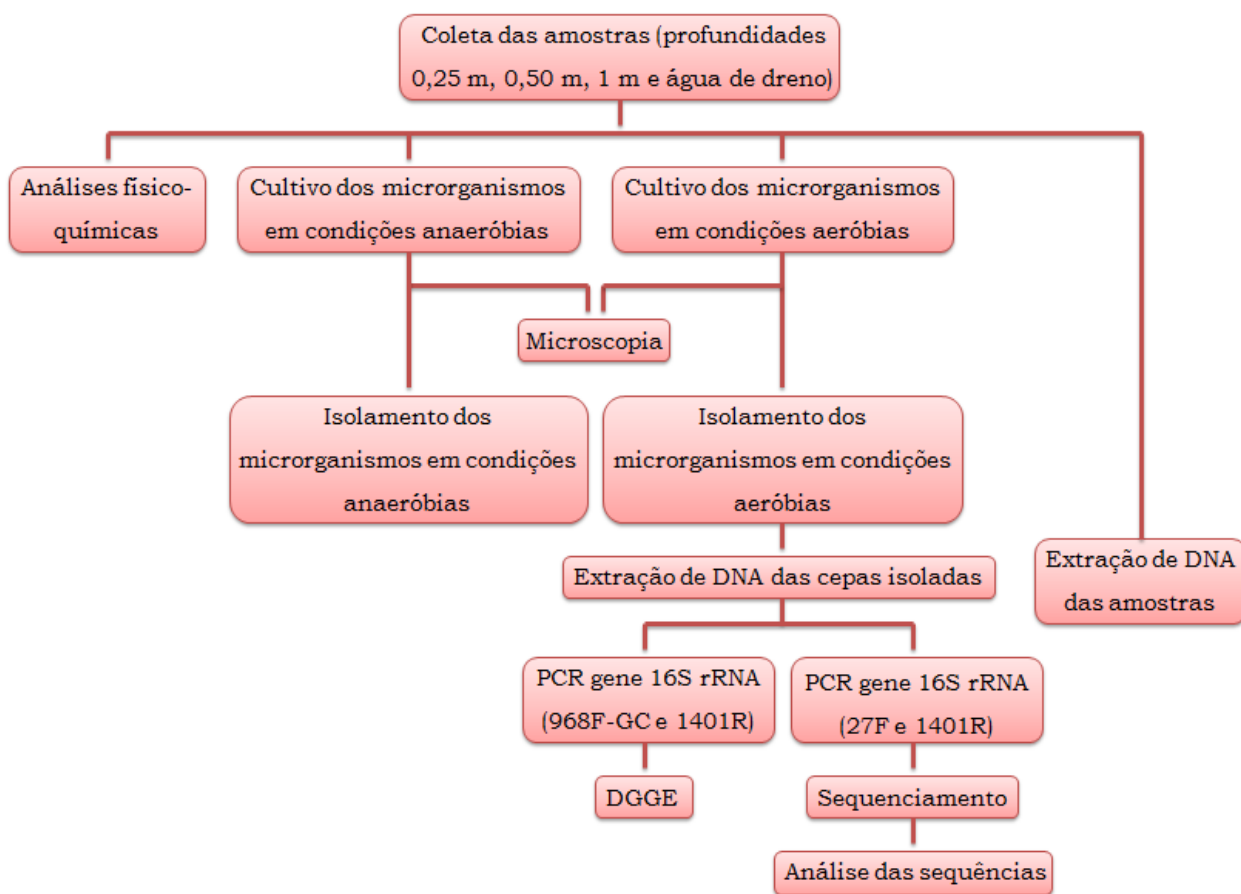


Figura 6 - Fluxograma da metodologia empregada no estudo.

Fonte: Da autora.

4.3 Coleta dos resíduos de bauxita

Foram coletadas, em dezembro de 2013, 4 amostras representativas da ARB7. Sendo, 3 amostras de lama de 2 Kg cada, retiradas por escavadeira nas profundidades de 0,25 m, 0,50 m e 1 m e acondicionadas em sacos plásticos estéreis. Coletou-se também, uma amostra de 3L de água de dreno do local que foi acondicionada em frascos de vidro boro-silicato previamente autoclavados. As amostras foram transportadas sob refrigeração para o laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas.

4.4 Análises físico-químicas dos resíduos de bauxita

A determinação do pH das amostras de lama vermelha foi realizado através de um pHmêtro padrão com faixa de -2 a 20, resolução 0,01 e exatidão $\pm 0,01$, previamente calibrado.

A caracterização química das amostras foi realizada através da análise Fluorescência de Raio X (XRF), utilizando 1,4 g de cada amostra de lama vermelha (profundidades 0,25 m, 0,50 m e 1 m) com 7 g de fundente (metaborato de lítio/tetraborato de lítio 12:22 com 0,02% de lítio), por um período de 5 minutos, corrente elétrica de 30 mA e potência de 50 KV (LEROUX; MAHMUD, 1966).

Para a determinação da alcalinidade das amostras foi necessário fazer o uso de métodos e rotinas analíticas já consolidadas no controle de processo da indústria de alumínio. Os métodos internos da empresa denominados “FFT” e “ALLA” se destinam a monitorar em diversos pontos do processo a presença de alumina disponível e da sílica reativa. Quanto maior a presença de sílica, maior será o consumo de hidróxido de sódio e, por conseguinte, maior será a alcalinidade no RB.

Estes métodos consistem na digestão da bauxita em meio alcalino, sob pressão e temperatura, simulando o *Processo Bayer*. O que consiste

essencialmente de titulações potenciométricas que permitem também obter o teor de hidróxido livre e carbonato e, por conseguinte, determinar a alcalinidade total e o teor de carbonato. Assim, para a realização dos métodos adiciona-se gluconato de sódio, formando um complexo de hidróxido de alumínio - gluconato. O excesso de NaOH, usado na digestão, é neutralizado com HCl (pH 8,1). Em seguida, é adicionado KF, cuja função é promover a liberação das hidroxilas do complexo. Essas hidroxilas são determinadas por uma titulação reversa, um excesso de solução de HCl é adicionado e posteriormente titulado com solução de NaOH.

4.5 Preparo do meio de enriquecimento para os microrganismos presentes nos resíduos de bauxita

Para o cultivo de enriquecimento dos microrganismos alcalifílicos a partir das amostras de resíduos de bauxita, foi utilizado o meio de cultura oxalato adaptado de Agnew et al. (1995). Este meio foi constituído por um composto mineral basal, suplementado com 1% de solução estoque de traço de metais e 1% de solução de vitaminas. A composição destas soluções está detalhada abaixo.

Para preparar o composto basal do meio de cultura adicionou-se à água destilada (g/L): 2,65 g de carbonato de sódio, 1,62 g de cloreto de amônio, 0,17 g de fosfato de potássio, 0,15 g de sulfato de manganês, 6,7 g de oxalato de sódio e 1 g de extrato de levedura. O composto teve o pH ajustado para 10,5, com adição de solução de NaOH a 5 N, e em seguida foi autoclavado.

Para preparar a solução traço de metais do meio de cultura oxalato adicionou-se à água destilada (g/L): 0,19 g de ácido bórico, 0,020 g de cloreto de níquel, 0,086 g de sulfato de manganês, 0,01 g de molibdato sódio, 0,556 g de sulfato de ferro, 0,17 g de cloreto de cobalto e 0,21 g de sulfato de zinco. A solução foi mantida sob fluxo de nitrogênio por 20 minutos e em seguida, autoclavada.

Para preparar a solução de vitaminas do meio de cultura oxalato adicionou-se à água destilada (g/L): 0,002 g de biotina, 0,002 g de ácido fólico, 0,005 g de riboflavina, 0,005 g de tiamina, 0,005 g de ácido nicotínico, 0,0001 g de vitamina B₁₂, 0,005 g de pantotenato de cálcio e 0,01 g de piridoxina. A solução foi esterilizada por filtração com filtro de 0,22 µm e uso de bomba à vácuo.

Para a preparação das soluções usadas em meio para cultura sob condições anaeróbias, a água destilada foi previamente fervida e resfriada sob fluxo de nitrogênio por 20 minutos. Após a autoclavagem, o meio basal e a solução traço de metais foram resfriados também sob fluxo de nitrogênio.

4.6 Enriquecimento dos microrganismos presentes nos resíduos de bauxita, sob condições aeróbias e anaeróbias

Para o enriquecimento dos microrganismos com meio de cultura oxalato sob condições anaeróbias, foram adicionados em frascos boro-silicato previamente autoclavados, 220 mL de composto basal, 2,5 mL de solução traço de metais, 2,5 mL de solução de vitaminas, 0,3 mL de solução de resazurina (indicadora de oxidação do meio), 0,3 mL de solução redutora de sulfeto 5% (Na₂S.9H₂O, redutora do meio) e 75 mL de amostra. Os frascos foram submetidos a fluxo de nitrogênio por 20 minutos e incubados em agitador a 30°C e 150 rpm, por 40 dias.

Para o enriquecimento dos microrganismos com meio de cultura oxalato sob condições aeróbias, foram adicionados em *Erlemeyers* previamente autoclavados, 220 mL de composto basal, 2,5 mL de solução traço de metais, 2,5 mL de solução de vitaminas e 75 mL de amostra (profundidades de 0,25 m, 0,50 m e 1 m e água de dreno). Os frascos foram fechados com tampões de gaze e incubados em agitador (Marconi) a 30°C e 150 rpm, por 6 dias.

4.7 Isolamento dos microrganismos presentes nos resíduos de bauxita, sob condições aeróbias e anaeróbias

Para a etapa de isolamento de cepas a partir das culturas de enriquecimento em meio oxalato líquido, foram preparados meios sólidos adicionando-se ágar bacteriológico (1,5%) ao composto basal do meio de cultura oxalato.

Para o isolamento de colônias sob condições anaeróbias, 220 mL de composto basal com ágar foi autoclavado e, após esfriamento parcial, foram adicionados 2,5 mL de solução traço de metais, 2,5 mL de solução de vitaminas, 0,25 mL da solução de resazurina e 0,25 mL da solução redutora de sulfeto 5%. O meio de cultura final foi distribuído em placas de *Petri* de 10cm de diâmetro, previamente autoclavadas. Após solidificação, foi adicionado às placas 1 mL do sobrenadante dos frascos de cultivo sob condições anaeróbias em meio líquido (Seção 4.6. - profundidades 0,25 m, 0,50 m, 1 m e água de dreno), acondicionadas em jarra de anaerobiose e mantida em estufa a 30°C, por 40 dias.

Para o isolamento de colônias sob condições aeróbias, 220 mL de composto basal com ágar foi autoclavado e, após esfriamento parcial (aproximadamente 60°C), foi suplementado com 2,5 mL de solução traço de metais e 2,5 mL de solução de vitaminas. O meio de cultura final foi distribuído em placas de *Petri* de 10cm de diâmetro (aproximadamente 30 mL/placa), previamente autoclavadas. Após solidificação, foi adicionado às placas 1 mL do sobrenadante dos frascos de cultivo sob condições aeróbias em meio líquido (Seção 4.6 - profundidades 0,25 m, 0,50 m, 1 m e água de dreno) e acondicionadas em estufa a 30°C, por 6 dias.

Para a obtenção de colônias isoladas, foi utilizado o método de estriamento (esgotamento) em placa. Ao final de 48 horas de cultura em estufa a 30°C, foram selecionadas aleatoriamente 2 colônias de cada amostra, coletadas com alça de platina e inoculadas individualmente em tubos de ensaio com 10 mL de meio de cultura oxalato líquido, fechados com tampões de gase e

incubadas em estufa a 30°C. Após 48 horas, cada uma dessas culturas foi novamente inoculada por esgotamento em placa com meio oxalato sólido e uma nova colônia foi selecionada para assegurar a pureza das cepas isoladas.

4.8 Exame bacterioscópico dos microrganismos cultivados sob condições aeróbias e anaeróbias

Os microrganismos cultivados em meio de cultura oxalato líquido foram caracterizados em relação à parede celular através do método de coloração de *Gram* com cristal violeta, lugol e safranina. As lâminas resultantes foram analisadas e fotodocumentadas por meio do fotomicroscópio óptico Leica DM 2500, com aumento de 1000x.

4.9 Análise molecular dos microrganismos presentes nos resíduos de bauxita

4.9.1 Extração de DNA

O DNA das cepas isoladas sob condições aeróbias foi extraído por meio do *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation), de acordo com o protocolo do fabricante descrito no Anexo A.

O DNA dos microrganismos presentes nos resíduos de bauxita, foi extraído por meio do *Power Soil® DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories), de acordo com o protocolo do fabricante descrito no Anexo B, com 0,25 g de amostra, e adaptado, com 0,5 g de amostra.

Para avaliar a eficiência do procedimento de extração de DNA, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,5% preparados com TEB 0,5x em cuba eletroforética DIGEL®, por 60 minutos a 100 V. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL em TEB 0,5x por 20 minutos, lavado em água destilada por 10 minutos e fotodocumentado com o uso de filtro específico para captação do sinal emitido pelo brometo de etídeo no sistema de fotodocumentação *L-Pix STi* (Loccus®).

4.9.2 PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)

Para a verificação da pureza das colônias isoladas sob condições aeróbias através da técnica de DGGE, a amplificação do gene 16S rRNA foi feita com os *primers* 968F–GC (5'CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAACGCACCTTAC3') e 1401R (5'CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG3') (HEUER et al., 1997). As amplificações foram realizadas com o uso de um termociclador *Axygen Maxygene*®, nas seguintes condições: 5 minutos de desnaturação a 94°C, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C de 1 minuto, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA das cepas isoladas sob condições aeróbias, a amplificação do gene 16S rRNA foi feita com os *primers* 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') e 1401R (5'CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG3') (LANE, 1991). Nas seguintes condições: 5 minutos de desnaturação a 94°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 1 minuto.

Cada reação de amplificação continha: 31,7 µL de água destilada; 5 µL de tampão de PCR 1x (Promega®); 1,5 µL de MgCl₂ (Promega®); 0,4 µL de Taq DNA polimerase (Promega®); 0,4 µL de dNTP (dCTP, dGTP, dTTP e dATP) (Promega®); 0,5 µL de cada *primer* (Invitrogen®), conforme o objetivo da amplificação; e, 10 µL de amostra de DNA na diluição onde apresentou melhor resultado em testes prévios, concentrações descritas na conforme Tabela 2. As preparações foram feitas sob refrigeração com gelo e realizadas em câmara asséptica previamente esterilizada.

Tabela 2 - Listagem dos reagentes e suas respectivas concentrações de estoque, concentrações finais e volumes utilizados na reação de PCR.

Reagentes	Estoque	Concentração final na reação	Volume para a reação de 50µL
Solução tampão da Taq	10 X	1 X	5 µL
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	1,5 µL
Primer 968F-GC / 27F	20 µM	0,2 µM	0,5 µL
Primer 1401R	20 µM	0,2 µM	0,5 µL
Taq polimerase	5 U/µL	0,5 U	0,4 µL
dNTPs	100 mM	0,8 mM	0,4 µL
DNA	--	50-100ng	--
Água destilada	--	--	q.s.p. para 50 µL

Fonte: Da autora.

4.9.3 DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante)

Para verificar a pureza das colônias isoladas sob condições aeróbias, a análise por DGGE foi realizada no sistema da *Loccus Biotecnologia*, como descrito no Anexo C. Os produtos de PCR, utilizando os *primers* 968F-GC e 1401R (sequência dos *primers* e detalhamento do PCR descritos na seção 4.9.2), foram colocados em gel vertical de 0,75 mm de espessura de poliacrilamida a 7,5%, com um gradiente de ureia/formamida (40% a 70%).

Para o preparo da solução desnaturante 40% foi utilizado: 100 mL de solução poliacrilamida 30%, 12,5 mL de solução tampão TAE 20x, 80 mL de formamida 32%, 83,5 mL de ureia e 500 mL de água destilada. Já para o preparo da solução desnaturante 70%, as quantidades de reagentes foram: 100 mL de solução poliacrilamida 30%, 12,5 mL de solução tampão TAE 20x, 140 mL de formamida 32%, 146,7 mL de ureia e 500 mL de água destilada.

Para o preparo final do gel de gradiente desnaturante foi utilizado 25 mL de cada solução desnaturante (40% e 70%), 150 µL de persulfato de amônio 10% e 12 µL de TEMED (catalisador da polimerização do gel).

As amostras (18µL dos produtos de PCR com 5 µL de tampão de carregamento Promega®) foram carregadas nas canaletas do gel utilizando ponteiros de 0,4 mm (Costar®). A corrida eletroforética foi feita em tampão TAE

1x, a 100 V e temperatura de 60°C por 15 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com *SYBR Gold* (Gold Nucleic Acid Gel Stain; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) (solução estoque diluída 10.000x em tampão TAE 1x) por 40 minutos, de acordo com as instruções do fabricante. O gel foi observado sob luz ultravioleta (transiluminador TransUV 312) e fotodocumentado com o uso de filtro específico para captação do sinal emitido pelo SYBR (fotodocumentador L-Pix Sti, Loccus Biotecnologia).

4.9.4 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Para sequenciar parte do gene 16S rRNA das cepas bacterianas isoladas sob condições aeróbias, os produtos de PCR utilizando os *primers* 27F e 1401R (sequência dos *primers* e detalhamento do PCR descritos na seção 4.9.2) foram purificados com o *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega Corporation), de acordo com o protocolo do fabricante descrito no Anexo D. Para a quantificação destes produtos de PCR, alíquotas de 2 µL foram aplicadas em gel de agarose 2% junto com o marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen®).

Os produtos de PCR a serem sequenciados foram devidamente preparados de acordo com as especificações da prestadora de serviços e enviados para o Centro de Pesquisa em Genoma Humano - IB, USP. No sequenciamento foi utilizado o sistema *ABI 3730 DNA Analyser* (Life Technologies, Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram feitas com *primer* 27f através do *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (código 4337456). As corridas foram feitas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. As sequências são analisadas pelo software *Sequencing Analysis 5.3.1* utilizando o *Base Caller KB*.

4.9.5 Análise do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Os resultados obtidos do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA das cepas bacterianas isoladas, foram inicialmente tratados no programa *Electropherogram Quality Analysis* (TOGAWA; BRIGIDO, 2003), para avaliação

das sequências com boa qualidade ($\text{Phred} \geq 31$) a serem utilizadas nas análises. Utilizou-se o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999), para realizar o alinhamento das sequências obtidas das cepas isoladas. A busca e análise de similaridade das sequências 16S rRNA das cepas isoladas com sequências de referência (cepas "tipo", sequências ≥ 1200 e de boa qualidade) assim como a construção da árvore filogenética pelo método Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) foram feitas através da ferramenta do RDP *The Ribosomal Database Project* (COLE et al., 2013). A árvore filogenética foi editada no programa Mega 6.06 (TAMURA et al., 2013). A confiabilidade das correlações na árvore filogenética inferida foi estimada através do método *Bootstrap* (HALL, 2011).

5 Resultados e Discussão

5.1 Local de amostragem

As visitas de reconhecimento de campo e reuniões de esclarecimentos com os responsáveis pela gestão do manejo do RB na empresa parceira, foram suficientes para o entendimento da situação em que se encontravam as ARBs. A ARB7 foi escolhida, como objeto de estudo, por ser a única que não teve sua fase de reabilitação iniciada e apresentava, assim, menor probabilidade de contaminação por outros solos.

No processo de seleção da área deparou-se com a complexidade de uma amostragem de RB em uma área tão extensa, com cerca de 120.000 m² e com aproximadamente 12 metros de profundidade. O ponto escolhido foi estabelecido pela facilidade do acesso da equipe de amostragem para a utilização de escavadeira manual.

Como a profundidade está associada a "idade" do RB depositado, buscou-se, em um primeiro momento, coletar amostras rasas e mais profundas para uma possível comparação entre elas. Todavia, durante a coleta de amostras houve dificuldade de atingir profundidades abaixo de 1 m, devido a umidade excessiva, reologia do material e limitações do instrumento de amostragem. As amostras foram coletadas então nas profundidades de 0,25 m, 0,50 m e 1 m, acreditando ser suficiente para uma avaliação exploratória, abrangendo microrganismos tanto aeróbios quanto anaeróbios. Coletou-se também a água de dreno, para verificação de um possível carreamento de microrganismos pela ação da gravidade ao longo dos resíduos de bauxita.

5.2 Análises físico-químicas dos resíduos de bauxita

As amostras coletadas na ARB7 apresentaram valores de pH semelhantes entre si, em um intervalo de 10,53 a 10,73, conforme pode-se observar na Tabela 3. Este intervalo representa valores típicos para RB de acordo com a

literatura existente. Devido a esta pequena variação, a limitação do método analítico empregado e a possível interferência de sólidos insolúveis, não foi possível explorar as diferenciações entre as profundidades.

Tabela 3 - pH das amostras de RB e água de dreno da ARB7.

Amostras	0,25 m	0,50 m	1 m	Água de dreno
pH	10,73	10,70	10,53	10,72

Fonte: Da autora.

A composição química do RB está associada ao minério de bauxita utilizado durante o processo gerador e, por sua vez, a bauxita traz consigo as características do local de onde foram retiradas. Durante os trabalhos de campo, apurou-se junto aos operadores das ARBs que os resíduos de bauxita da região de Poços de Caldas - MG apresentavam características peculiares de maior presença de argilas. Isto é, percentual de partículas mais finas que o encontrado em outras regiões do Brasil. O que lhe conferia propriedades reológicas também peculiares e um maior teor de umidade associado ao RB disposto. Estas informações são corroboradas pelo estudo de Garcia (2012), que caracterizou amostras de RB da região de Poços de Caldas apresentando valores de granulometria com a dimensão média inferior a 2,73 μm , 11,14 μm e 18 μm para 50%, 90% e 100%, respectivamente, das partículas presentes.

A caracterização da composição química das amostras de RB, foi realizada no laboratório da empresa parceira através do método Fluorescência de Raio X (XRF), conforme pode-se observar os resultados na Tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização química das amostras por Fluorescência de Raio X.

Parâmetro	Caracterização XRF (%)		
	0,25 m	0,50 m	1 m
Al ₂ O ₃	31,773	18,513	28,180
CaO	2,221	2,959	2,780
Cr ₂ O ₃	0,012	0,023	0,020
Fe ₂ O ₃	21,993	34,650	25,850
K ₂ O	2,219	1,257	1,560
MgO	0,127	0,108	0,090
MnO	0,395	0,930	0,910
Na ₂ O	8,269	3,937	5,860
P ₂ O ₅	0,501	0,410	0,360
SiO ₂	22,209	16,525	17,360
TiO ₂	4,538	9,576	5,850
V ₂ O ₅	0,068	0,102	0,080
ZnO	0,024	0,068	0,050
ZrO ₂	0,662	1,817	0,800
Outros	5,000	5,000	5,000

Fonte: Da autora.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, observa-se que a camada mais superficial do RB (0,25 m) apresentou os maiores valores de óxido de alumínio, óxido de silício e óxido de sódio (31,78%, 22,21% e 8,27%, respectivamente). Já a camada de 0,50 m apresentou a mais baixa quantidade destes compostos (óxido de alumínio 18,51%, óxido de silício 16,52% e óxido de sódio 3,94%). E a camada mais profunda (1 m) apresentou valores intermediários destes compostos (28,18%, 17,36% e 5,86%). O óxido de ferro esteve presente em maior quantidade na profundidade de 0,50 m (34,65%), à 1 m encontra-se um valor intermediário (25,85%) e uma menor quantidade na camada superficial (21,99%).

De acordo com os valores típicos da composição química de resíduos de bauxita, segundo World Aluminium (2014), as amostras da ARB7 apresentaram valores médios de óxido de sódio e óxido de silício dentro da faixa de 2-10% e 3-50%, respectivamente. Já os valores de óxido de alumínio das profundidades

0,25 m e 1 m, apresentaram-se um pouco acima da faixa típica (10-20%) e o óxido de ferro, mais baixo (30-60%). Ressalta-se que os valores típicos referem-se ao universo de amostras de minérios de diferentes regiões do mundo.

As avaliações da alcalinidade das amostras foram obtidas pelos métodos "ALLA" e "FFT", implementados na rotina de controle de processo da empresa parceira, e encontram-se na Tabela 5. Onde, o teor cáustico representa todo OH combinado à alumina e o teor alcalino, a soma do teor cáustico com o carbonato total presente.

Tabela 5 - Valores de Teor Cáustico (TC), Teor Alcalino (TA) e a razão entre estes teores, que representa a alcalinidade nas amostras da ARB7.

Amostras	TC (g/L)	TA (g/L)	TC/TA
0,25 m	131,4	139,1	0,945
0,50 m	129,9	142,3	0,913
1 m	130,3	137,8	0,946

Fonte: Da autora.

Observa-se na Tabela 5 a confirmação da elevada alcalinidade presente nas amostras em estudo, superior a 90% nas três amostras.

Os valores de alcalinidade das três amostras foram muito próximos, diferença na ordem de 1%, não permitindo afirmar qualquer alteração deste parâmetro com a profundidade, tempo ou ação de microrganismos. Cabe ressaltar que a diferença de idade entre as profundidades das amostras de RB é estimada em alguns poucos meses. O que é pouco representativo para evidenciar alterações temporais ou de influência das características da origem da bauxita.

5.3 Enriquecimento dos microrganismos presentes nos resíduos de bauxita, sob condições aeróbias e anaeróbias

A análise microscópica das amostras dos cultivos de enriquecimento evidenciaram crescimento de microrganismos em culturas inoculadas com as

amostras de resíduos de bauxita, tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias, conforme visualizado na Figura 7.

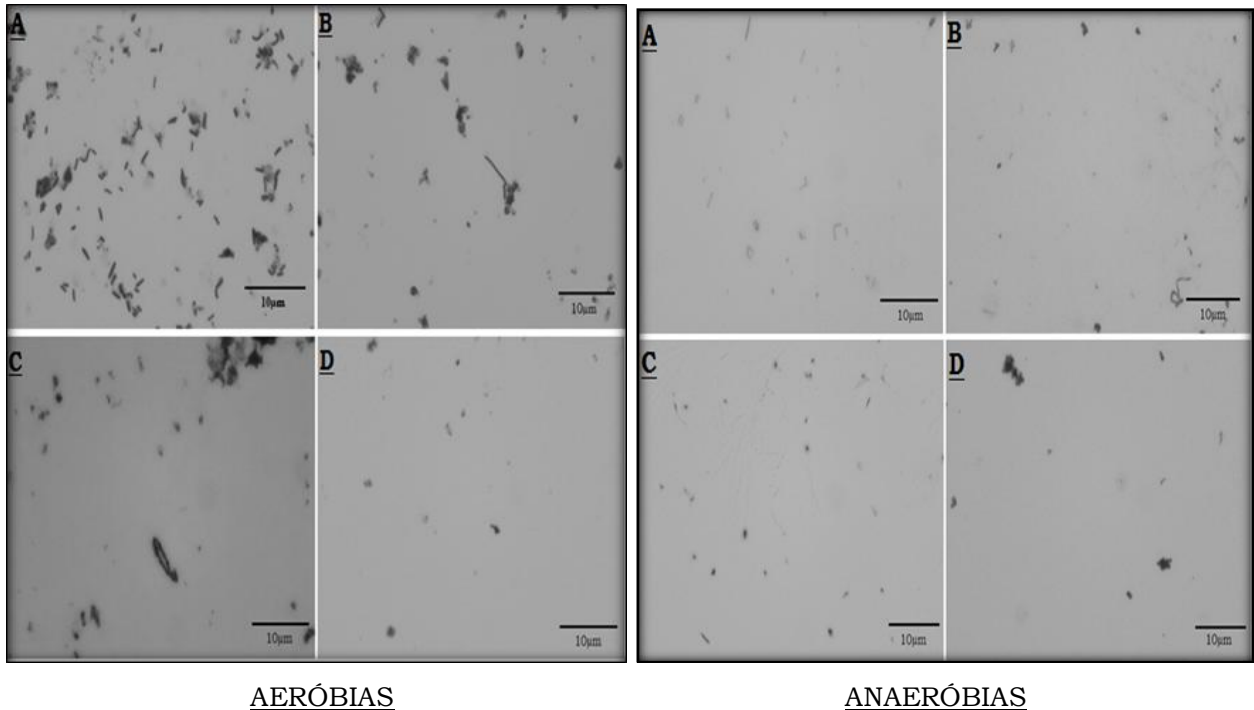


Figura 7 - Fotos microscópicas (aumento de 1000x) das culturas de enriquecimento de bactérias sob condições aeróbias (esquerda) e anaeróbias (direita). Sendo: (A) amostras da profundidade de 0,25 m; (B) 0,50 m; (C) 1 m; e, (D) água de dreno.
Fonte: Da autora.

As culturas inoculadas com a água de dreno não apresentaram microrganismos claramente identificáveis ao microscópio óptico, como pode-se notar na Figura 6. Além disso, não houve crescimento em meio sólido dos possíveis microrganismos presentes na água de dreno (não mostrado).

Isto pode ser explicado pelo fato de que os microrganismos podem se aderir às partículas de resíduos de bauxita, não sendo assim carregados com a ação da gravidade pela decantação da água que é retirada como dreno de fundo da lagoa vermelha. E, como relatado pela empresa parceira deste estudo, a maior quantidade de argila no RB coletado, ou seja, muitas partículas finas, propicia a ligação dos microrganismos aos colóides (ZHOU et al., 1996).

5.4 Isolamento dos microrganismos presentes nos resíduos de bauxita, sob condições aeróbias e anaeróbias

A partir das culturas para isolamento em meio sólido sob condições aeróbias, foram escolhidas aleatoriamente duas colônias isoladas de cada profundidade dos resíduos de bauxita. Ao final de 48 horas de cultura, as colônias isoladas eram, em geral, de aparência semelhante, com formato convexo liso, e esbranquiçadas, com tamanhos variando entre 2 a 3 mm. Todas as 6 cepas isoladas são Gram-positivas, conforme Figura 8.

Como observado na Figura 8, as cepas A1, A2, C1 e C2 são morfológicamente semelhantes, com formas de bastonetes muito finos, de tamanhos médios de 2 a 4 μm . As cepas B1 e B2, por sua vez, apresentaram formas bacilares curtas (entre 0,8 e 1,3 μm), mas de maior diâmetro (aproximadamente 0,4 μm) que as demais cepas.

O isolamento dos microrganismos sob condições anaeróbias presentes nos resíduos de bauxita não foi satisfatório (foram realizadas duas tentativas). Tendo em vista que houve crescimento nas culturas de enriquecimento em meio líquido sob condições anaeróbias, onde se usou a mesma composição de nutrientes, acredita-se que a causa do não crescimento em meio sólido foi devido a limitação da técnica utilizada na manutenção da anaerobiose.

O sistema utilizado no experimento foi a jarra de anaerobiose, recipiente que, após o acondicionamento das placas de *Petri* e fluxionamento de nitrogênio, é vedado com uma tampa acrílica sobre anel de borracha. Apesar da técnica ter sido desenvolvida cuidadosamente com a presença do fluxo de nitrogênio, enquanto o meio se solidifica na placa pode ocorrer contato com o oxigênio presente no ar ou a retirada do oxigênio do meio oxalato ou da jarra anaeróbia pode não ter sido total. Esse sistema não é totalmente hermético e, apesar dos procedimentos de retirada de oxigênio e da adição de solução redutora no início da cultura, o tempo prolongado de incubação na jarra pode haver permitido que o oxigênio penetrasse aos poucos até chegar a níveis inibitórios para microrganismos anaeróbios.

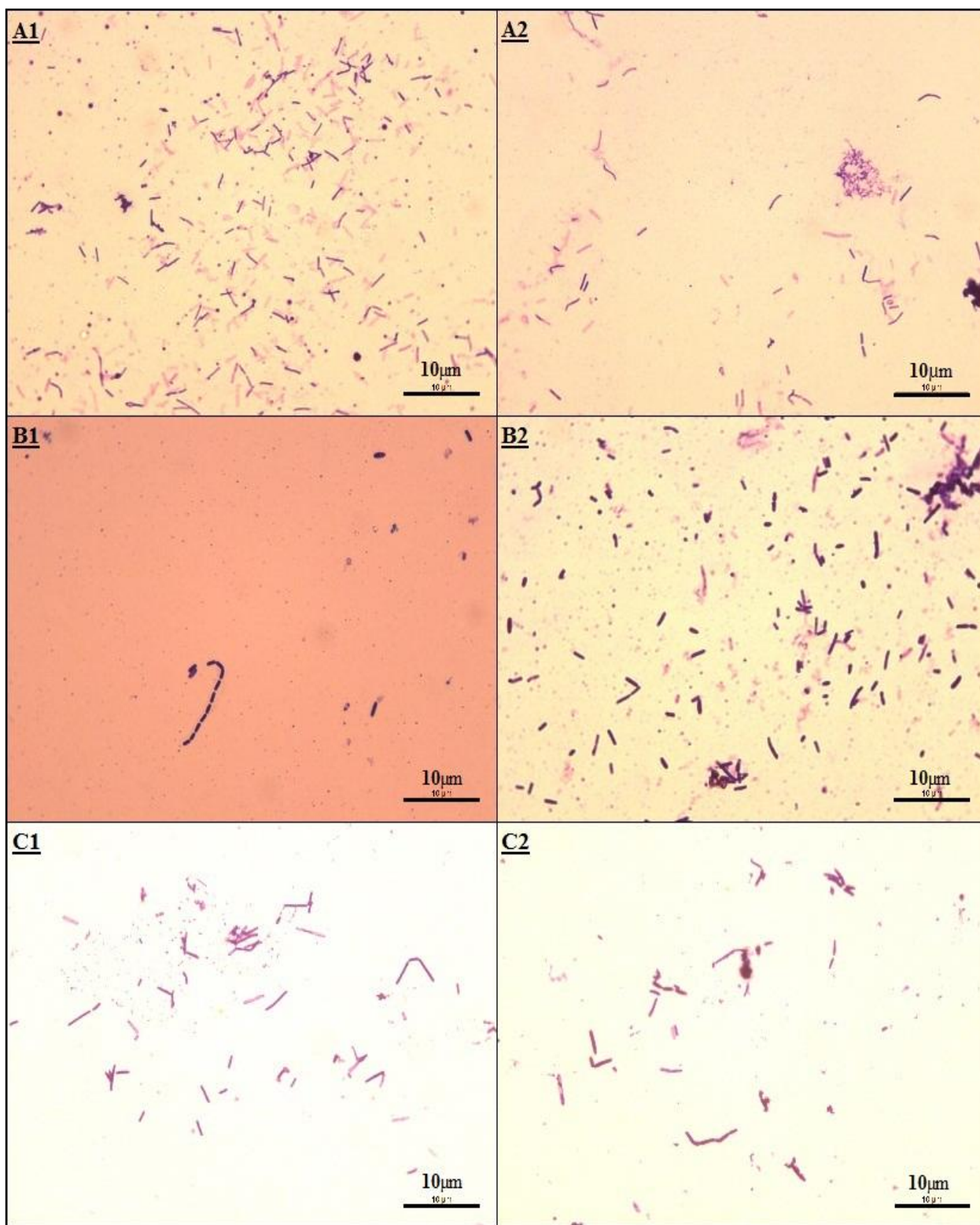


Figura 8 - Fotos microscópicas (aumento de 1000x) das bactérias isoladas sob condições aeróbias, em lâminas de coloração *Gram*. Sendo: (A1) colônia 1 da amostra da profundidade de 0,25 m; (A2) colônia 2, 0,25 m; (B1) colônia 1, 0,50 m; (B2) colônia 2, 0,50 m; (C1) colônia 1, 1 m; e, (C2) colônia 2, 1 m.

Fonte: Da autora.

De fato, os microrganismos anaeróbios estritos são mais difíceis de serem isolados, principalmente, devido sua sensibilidade à presença de quantidades mínimas de oxigênio (CHEN et al., 2005) e ao seu crescimento lento. Um sistema mais adequado para o isolamento de microrganismos anaeróbios talvez seja o uso da câmara anaeróbia, a qual pode garantir que o preparo do meio de cultura e do experimento seja realizado na total ausência de oxigênio.

5.5 Análise molecular dos microrganismos presentes nos resíduos de bauxita

5.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA das cepas isoladas foi bem sucedida, como constatado com a visualização de bandas no gel de agarose. O DNA extraído foi então submetido à amplificação para produzir uma maior quantidade do segmento de DNA necessários para a aplicação das técnicas de DGGE e sequenciamento.

Não foi possível a extração de DNA diretamente das amostras de resíduos de bauxita. Foram feitas tentativas de acordo com o protocolo padrão do *Power Soil kit* e também com o dobro de quantidade de amostra, mas não se obteve sucesso. Isso pode ser explicado, pela presença de poucos microrganismos existentes em sedimentos alcalinos. Ou, a quantidade de sais e/ou inibidores presentes nos resíduos de bauxita é alta, o que pode ter causado interferência na extração de DNA (VERMA; SATYANARAYANA, 2011).

A dificuldade em extrair DNA diretamente do solo pode ser explicada por este ser um meio complexo (textura, estrutura, quantidade de água, pH, variações climáticas e atividade biótica), que contém várias substâncias que podem interferir e inibir o processo de extração e amplificação do DNA dos microrganismos presentes. Estas substâncias presentes no solo são principalmente as substâncias húmicas, que são ácidos orgânicos e fúlvicos que possuem a capacidade de co-precipitar com o DNA (VERMA; SATYANARAYANA, 2011). A maioria dos protocolos de extração necessitam da purificação do DNA, o que diminui o problema com as substâncias húmicas, mas que causam a perda de DNA (SCHNEEGURT et al., 2003).

Os microrganismos podem se ligar fortemente aos colóides do solo, assim, solos ricos em argila apresentam maior dificuldade para a obtenção de altos rendimentos na extração de DNA do que outros tipos de solo, devido às partículas finas que compõem a argila (ZHOU et al., 1996). Os solos argilosos, podem também apresentar maior quantidade de substâncias húmicas, o que irá interferir ainda mais na extração de DNA de microrganismos presentes (TEBBE; VAHJEN, 1993). As amostras de RB utilizadas no presente estudo, foram relatadas com uma grande quantidade de argila, característica que pode explicar a não obtenção de DNA com a extração utilizando protocolo já consolidado.

Verma e Satyanarayana (2011) fizeram testes de extração de DNA em amostras de solos e sedimentos alcalinos (pH variava de 7,6 a 11) coletados em diferentes regiões da Índia. Eles indicam a utilização de carvão ativado em pó e polivinilpirrolidona (PAC) para a lise celular seguida por precipitação com polietilenoglicol e isopropanol (PEG), para o isolamento e purificação simultâneos do DNA íntegro do solo. O protocolo desenvolvido neste estudo obteve um grau de pureza para substâncias húmicas, cerca de 1,66, para proteínas cerca de 1,72 e um rendimento médio de DNA de 10,5 µg/g peso seco de solo. Enquanto que os valores alcançados pelo *Mo Bio kit* são de 1,41, 1,56 e 6,3 µg/g, respectivamente.

5.5.2 PCR (*Reação em Cadeia de Polimerase*)

Os fragmentos de DNA do gene 16S rRNA das cepas isoladas, amplificados com os *primers* 968F-GC e 1401R para posterior verificação da pureza das colônias isoladas, foram obtidos no tamanho esperado (aproximadamente 450 pares de bases), conforme verificado em eletroforese em gel de agarose mostrado na Figura 9.

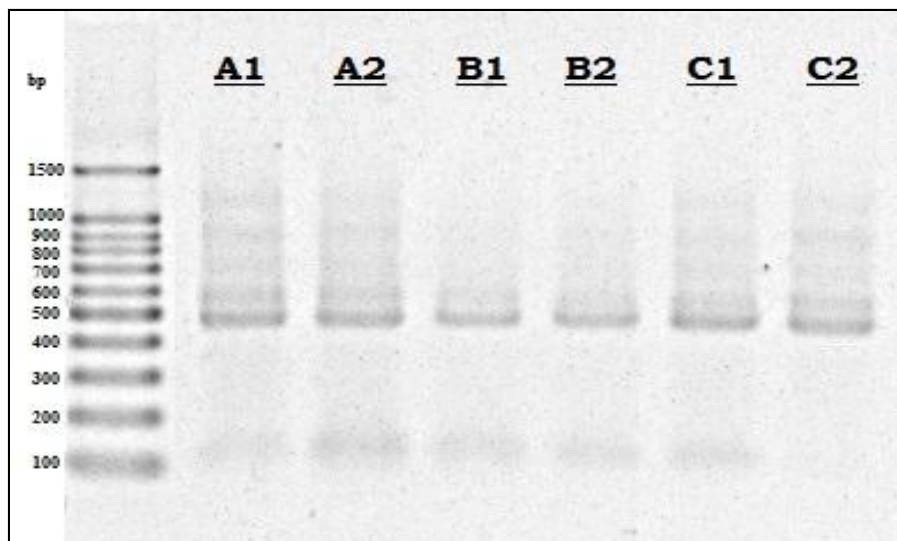


Figura 9 - Eletroforese em agarose a 1,5% dos produtos de PCR do gene 16S rRNA, com os *primers* 968F-GC e 1401R, obtidos a partir da extração de DNA das cepas isoladas sob condições aeróbias dos resíduos de bauxita. Sendo: (coluna à esquerda) padrão de pares de bases, com os respectivos tamanhos em pares de bases (bp) ao lado; (A1) e (A2) colônias isoladas da amostra de 0,25 m; (B1) e (B2) 0,50 m; (C1) e (C2) 1 m.

Fonte: Da autora.

Os fragmentos de DNA do gene 16S rRNA das cepas isoladas, amplificados com os *primers* 27F e 1401R para posterior sequenciamento parcial do gene, foram obtidos no tamanho esperado (aproximadamente 1400 pares de bases), conforme verificado em eletroforese em gel de agarose mostrado na Figura 10. Esses produtos de PCR foram devidamente purificados para a eliminação dos sais, nucleotídeos e enzimas restantes da reação de PCR que possam inibir a reação de sequenciamento.

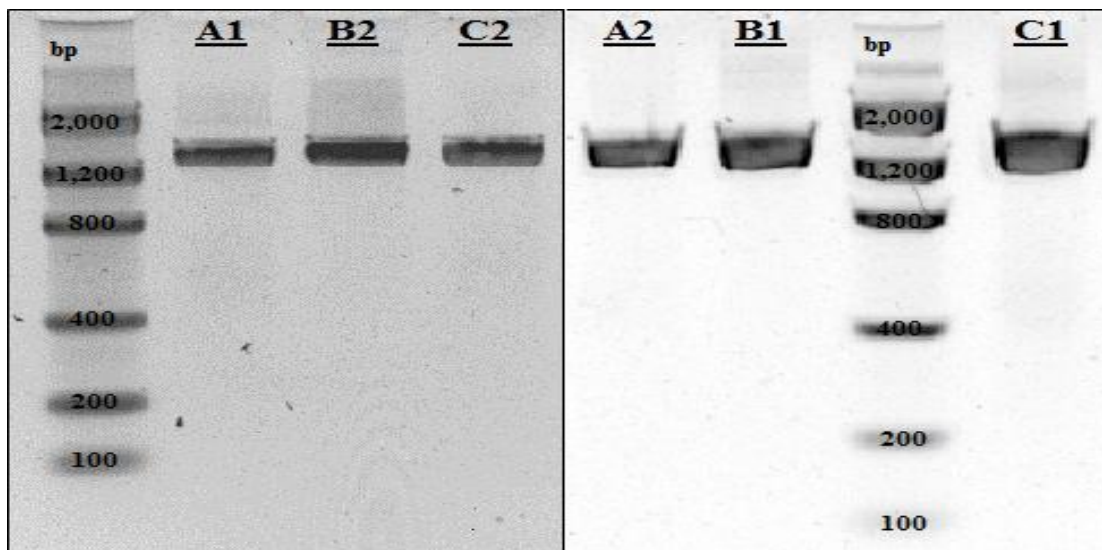


Figura 10 - Eletroforese em agarose a 1,5% dos produtos de PCR do gene 16S rRNA purificados, com os *primers* 27f e 1401R, obtidos a partir da extração de DNA das cepas isoladas sob condições aeróbias dos resíduos de bauxita. Sendo: (coluna a esquerda da primeira figura e penúltima coluna da segunda figura) padrão de pares de bases *Low Mass Lader*, com os respectivos tamanhos em pares de bases (bp); (A1) e (A2) colônias isoladas da amostra de 0,25 m; (B1) e (B2) 0,50 m; (C1) e (C2) 1 m.

Fonte: Da autora.

5.5.3 DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante)

Os fragmentos de DNA do gene 16S rRNA, amplificados com os *primers* 968F–GC e 1401R, foram submetidos à análise por Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante para verificar a pureza das colônias isoladas sob condições aeróbias, mostrado na Figura 11. A presença de uma única banda em cada amostra na corrida dos fragmentos de DNA em DGGE indica fortemente que há apenas uma cepa em cada amostra, confirmando o êxito do isolamento. Observou-se ainda a semelhança na migração das bandas entre os isolados A1 e A2 e entre B1, B2 e C2. E que o isolado C1 divergiu dos outros. Isso denota a diferença entre as sequência de pares de bases dos fragmentos de DNA, o que foi confirmado com o sequenciamento destas bactérias (mostrado a seguir no item 5.4.4. *Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA*).

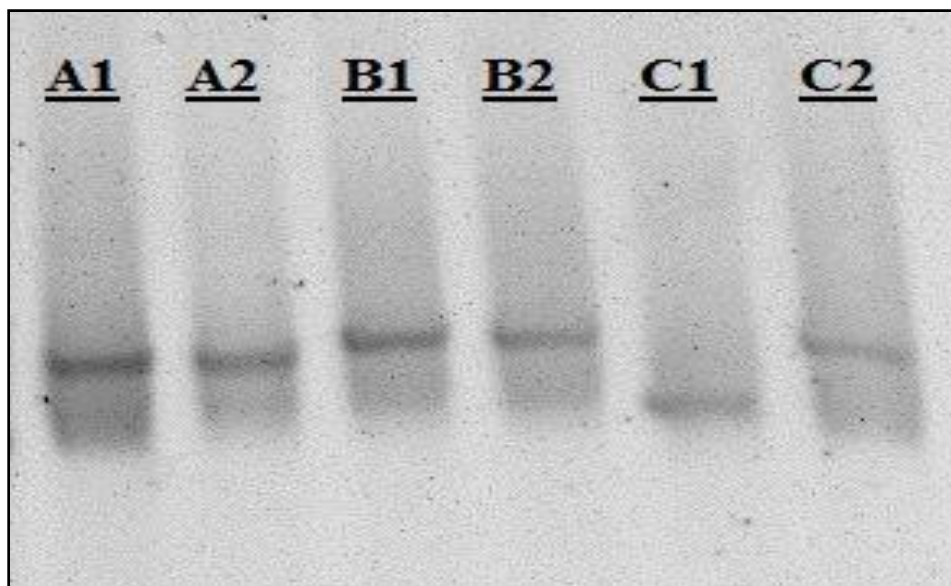


Figura 11 - Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) dos produtos de PCR, com os *primers* 968F-GC e 1401R, obtidos a partir da extração de DNA das cepas isoladas sob condições aeróbias dos resíduos de bauxita. Sendo: (A1) e (A2) colônias isoladas da amostra de 0,25 m; (B1) e (B2) colônias isoladas da amostra de 0,50 m; (C1) e (C2) colônias isoladas da amostra de 1 m.

Fonte: Da autora.

5.5.4 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Os dados brutos do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, obtidos pela prestadora de serviços, foram tratados para a seleção da região com o melhor índice de qualidade de sequenciamento (PHRED).

As sequências obtidas foram então alinhadas e comparadas com sequências de referência utilizando os recursos do RDP. Para cada uma das 6 sequências obtidas das cepas isoladas, foram selecionadas de 5 a 6 cepas de referência com os maiores índices de similaridade. A partir desse conjunto, com a adição de algumas cepas de referência não correlacionadas (como *Escherichia coli*, *Falsibacillus pallidus* e *Bacillus vedderi*, foi inferida a árvore filogenética apresentada abaixo como Figura 12.

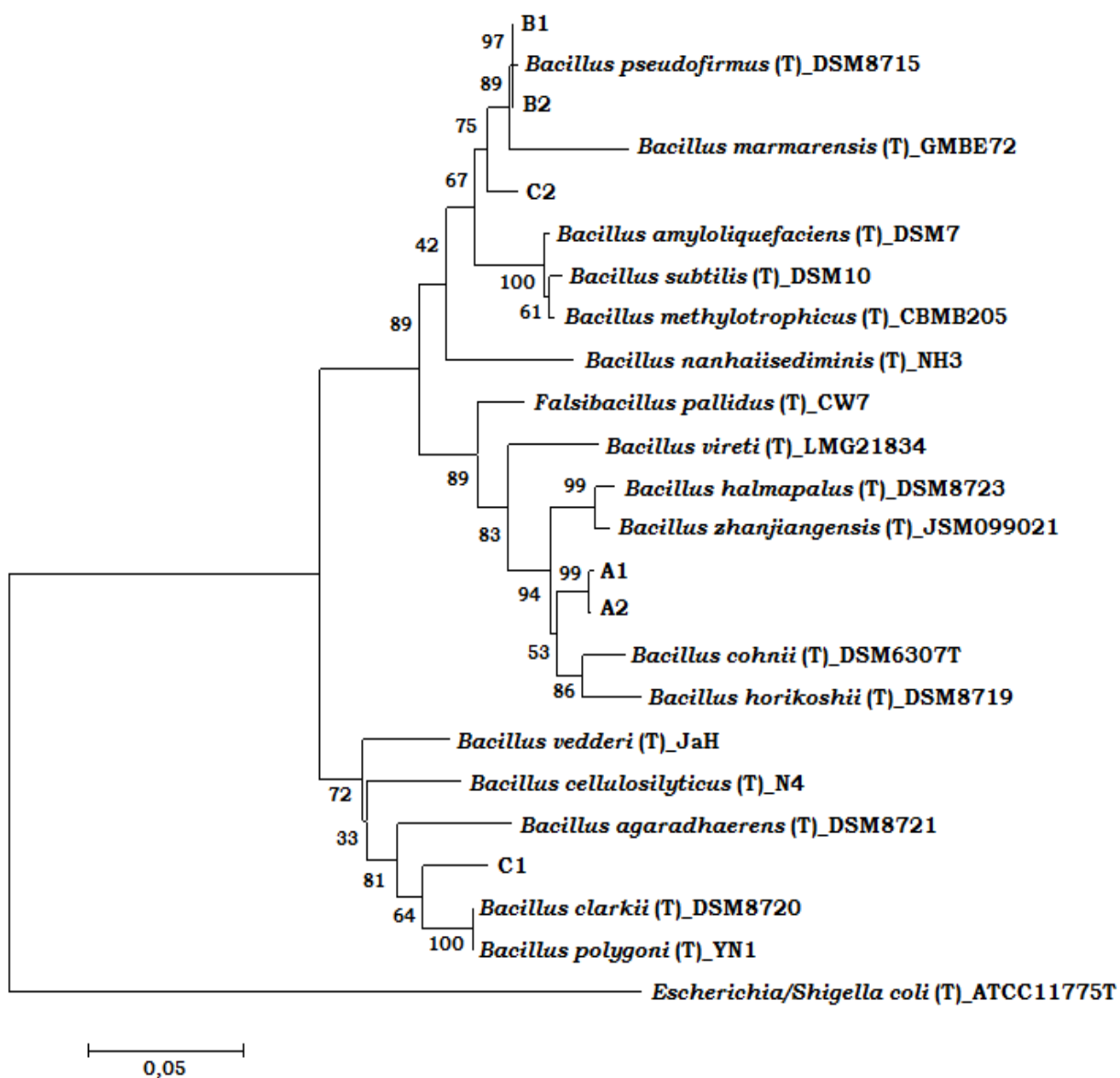


Figura 12 - Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA, mostrando a relação entre as cepas isoladas dos resíduos de bauxita e espécies validamente publicadas. A significância de cada ramo é indicada pelo valor *Bootstrap*, calculado para 1000 subconjuntos. Fonte: Da autora.

De acordo com a ferramenta *Sequence Difference Count Matrix* do programa *BioEdit*, apresentada na Tabela 6, entre as cepas A1 e A2 existe apenas uma diferença na sequência do gene 16S rRNA. Entre B1 e B2 não há diferenças, mas estas cepas em relação à C2 possuem 11 diferenças ao longo de suas sequências de pares de bases, apesar destas três cepas apresentarem uma alta similaridade à espécie *Bacillus pseudofirmus*. Isto justifica a distância

observada na árvore filogenética, mostrada na Figura 12, entre as cepas B1/B2 e C2. A diferença entre estas cepas pode ser notada também na microscopia óptica, apresentada na Figura 8, onde observa-se que as cepas B1 e B2 possuem formas bacilares curtas e diâmetro maior, e a cepa C2, formas de bastonetes muito finos.

Tabela 6 – Matriz de diferenças nas sequências parciais alinhadas (556 bases) do gene 16S rRNA das cepas isoladas, obtida através do programa *BioEdit*.

Cepa	A1	A2	B1	B2	C1	C2
A1	ID	1	57	57	82	60
A2	1	ID	58	58	82	61
B1	57	58	ID	0	68	11
B2	57	58	0	ID	68	11
C1	82	82	68	68	ID	70
C2	60	61	11	11	70	ID

Fonte: Da autora.

O resultado do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA dos isolados provenientes do RB indicou que as cepas A1 e A2, provenientes de 0,25 m de profundidade, apresentaram similaridade de 99,6% à *Bacillus cohnii* (família *Bacillaceae*), como mostrado no Apêndice A. As bactérias *Bacillus cohnii* são Gram-positivas; alcalifílicas obrigatórias; aeróbias; formadoras de esporos ovais; e, possuem pH ótimo de 9,7 (SPANKA; FRITZE, 1993). Foram isoladas de solo alcalino e de fezes coletadas na Dinamarca e na Alemanha com meio de cultura peptona, e encontradas como contaminante em placa de ágar na Grã-Bretanha (SPANKA; FRITZE, 1993). Yumoto et al. (2000) isolaram de amostras bolas de indigo (corante natural), com cultivo em meio de cultura PYA, cepas com alta similaridade à *Bacillus cohnii* (99,6%), as quais são capazes de produzir ácidos a partir das fontes de carbono D-glucose, D-frutose, D-manose, manitol, trealose, maltose e celobiose, o que indica o potencial desses microrganismos no processo de biorremediação de ambientes com alta alcalinidade.

As cepas B1 e B2, provenientes de 0,50 m de profundidade do RB, e a amostra C2 de 1 m, apresentaram similaridade de 99,8% e 98,4%, respectivamente, à *Bacillus pseudofirmus* (família *Bacillaceae*), como mostrado no Apêndice A. As bactérias *Bacillus pseudofirmus* são Gram-positivas; alcalifílicas facultativas; aeróbias facultativas; formadoras de esporos ovais; e, possuem pH ótimo de 9 (NIELSEN et al., 1995). Foram isoladas de solos e fezes de animais com cultivo em meio contendo glucose e carbonato de sódio (KOJIMA et al., 2006). A sua capacidade de crescimento fermentativo, já descrito na literatura (JANTO et al., 2011), coloca *Bacillus pseudofirmus* como um potencial estimulador da neutralização do pH e remediação dos resíduos de bauxita com a produção de ácidos orgânicos. Ma et al. (2012) isolaram de amostra de biofilme anódico de reator tipo MFC (*microbial fuel cell*) (ambiente alcalino), cepas com similaridade de 99,6% à *Bacillus pseudofirmus* com meio de enriquecimento acetato sódio e verificaram que estes isolados consumiram citrato, glicerol, lactato, sacarose e glucose para reduzir óxido de ferro III, AQDS (antraquinona-2, 6-disulfonato, análogo de húmus) e HA (ácidos úmidos), com potencial para degradação de corantes em efluentes industriais de alta alcalinidade. Assim, essas bactérias apresentam um potencial metabólico que abrange diversos processos de biorremediação.

A cepa C1, proveniente de 1 m de profundidade dos resíduos de bauxita, apresentou similaridade de 99% à *Bacillus polygoni* e 98,8% à *Bacillus clarkii* (ambas classificadas na, recentemente descrita, família *Bacillaceae*), como mostrado no Apêndice A. As bactérias *Bacillus polygoni* são Gram-positivas; alcalifílicas obrigatórias; aeróbias; formadoras de esporos elipsoidais; e, possuem pH ótimo de 9. Foram isoladas de bolas de indigo no Japão com meio de cultura PYA (AINO et al., 2008). As bactérias *Bacillus clarkii* são Gram-positivas; alcalifílicas obrigatórias; anaeróbias facultativas; e, possuem pH ótimo de 9-10. Foram isoladas de resíduos de bauxita com meio de cultura oxalato (JARREL et al., 1997).

A sequência parcial do gene 16S rRNA da cepa C1 teve uma similaridade muito próxima com duas espécies de bactérias, *Bacillus polygoni* e *Bacillus*

clarkii (99% e 98,8%, respectivamente). Estas espécies possuem, entre si, similaridade de 99,5%, em relação a sequência do gene 16S rRNA (1558pb), mas diferem em características fenotípicas e quimiotaxonômicas (forma do esporângio, oxidase, redução de nitrato, hidrólise de caseína, entre outros) (AINO et al., 2008). Portanto, neste caso torna-se particularmente importante o sequenciamento completo do gene 16S rRNA e testes bioquímicos complementares da cepa C1 para sua melhor identificação. Caso se confirme a identidade de C1 como *Bacillus polygoni* é importante a realização de estudos de seus potenciais metabólicos, já que esta espécie ainda foi pouco investigada. Por outro lado, a cepa C1 ter sido encontrada na profundidade de 1m nos resíduos de bauxita (profundidade visualmente com maior teor de líquidos), levanta a possibilidade de que esta bactéria seja anaeróbia facultativa, o que a colocaria mais próxima a *Bacillus clarkii*, já descrita com essa característica.

Hamdy e Williams (2001) isolaram 150 cepas bacterianas com o meio de cultura soja triptica em depósito de resíduos de bauxita nos Estados Unidos. Identificaram espécies dos gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter* e *Proteus*. Testando a biorremediação com suplementação com alfafa, verificaram que as bactérias degradaram as fontes de carbono glicose e peptona, produzindo ácidos orgânicos (ácido lático, ácido acético, ácido propanoico, ácido butírico e ácido metilpropanóico). O gênero *Bacillus* foi identificado como os mais numerosos e ativos nesse processo (HAMDY; WILLIAMS, 2001). De fato, vários *Bacillus* alcalifílicos já foram previamente descritos como produtores de ácidos orgânicos (PAAVILAINEN et al., 1994). Interessante notar ainda no trabalho de Hamdy e Williams (2001) que constatou-se que o crescimento anaeróbio permitiu uma redução mais eficiente do pH do meio em relação ao crescimento aeróbio.

Foram isolados dos resíduos de bauxita somente cepas similares ao gênero *Bacillus*, isto pode ser explicado pelos nutrientes e tempos fornecidos de enriquecimentos os quais selecionaram apenas espécies deste gênero, sendo necessário para outros gêneros diferentes características de meio de cultura.

Outra hipótese, é que as espécies do gênero *Bacillus* são formadores de endósporos, característica que promove vantagem a estas espécies pela alta capacidade de resistência a várias condições adversas, estresses físicos e químicos, as quais seriam letais às células vegetativas (HORIKOSHI, 1999; LOGAN; DE VOS, 2009).

Resultados similares de isolamento dos microrganismos presentes nos resíduos de bauxita foram encontrados por Agnew et al. (1995). Onde conseguiram isolar três cepas bacterianas com o meio de cultura oxalato (o mesmo utilizado no presente estudo). Seus isolados são do gênero *Bacillus*, sendo que um deles possui uma alta similaridade com a espécie *Bacillus cohnii*, que também é similar às cepas A1 e A2.

Considerando os resultados do presente estudo e da literatura, a partir do momento em que se conhece quais microrganismos habitam os resíduos de bauxita, pelo conhecimento de sua biologia e fisiologia, é possível planejar ações para biorremediar o local.

6 Conclusão

As visitas de reconhecimento de campo permitiram o conhecimento da complexidade e custos em relação ao manejo dos resíduos de bauxita. Onde, as áreas destinadas ao depósito de RB são muito maiores que a área ocupada pelo próprio complexo industrial. Vivenciou-se no planejamento da amostragem de RB, muitas variáveis interferentes sobre a escolha do local e profundidade de coleta, devido principalmente ao acesso e reologia dos RB nos depósitos.

As características físico-químicas das amostras estudadas foram compatíveis com os valores típicos citados na literatura para este tipo de resíduo, principalmente em relação ao elevado pH e alcalinidade.

Não foi possível a extração de DNA (sem cultivo) dos microrganismos presente nas amostras de RB, provavelmente pelas próprias dificuldades dos atuais protocolos e/ou pela característica do RB coletado de ter maior presença de argila, tipo de solo que pode conter maior quantidade de substâncias húmicas as quais se combinam com os reagentes utilizados na extração de DNA.

O meio oxalato se mostrou eficiente para o enriquecimento das bactérias alcalifílicas presente nos resíduos de bauxita, sob condições anaeróbias e aeróbias. Não foi possível o isolamento em meio sólido de microrganismos sob condições anaeróbias, por causa da dificuldade na retirada total do oxigênio durante o experimento, ou mesmo da ineficiência do meio de cultivo escolhido. Já, sob condições aeróbias, duas colônias de cada profundidade puderam ser isoladas com o meio oxalato sólido.

Microscopicamente, as cepas isoladas A1, A2, C1 e C2 são morfológicamente semelhantes, com formas de bastonetes muito finos, de tamanhos médios de 2 a 4 μm . As cepas B1 e B2, por sua vez, apresentaram formas bacilares curtas, mas de maior diâmetro que as demais cepas.

As sequências parciais do gene 16S rRNA das cepas isoladas indicaram uma alta similaridade destas com três espécies de bactérias Gram-positivas, pertencentes ao filo *Firmicutes* e distribuídas em duas famílias. Onde, as cepas

A1 e A2 apresentaram alta similaridade à espécie *Bacillus cohnii* pertencente a família *Bacillaceae*, B1, B2 e C2 à *Bacillus pseudofirmus* da mesma família, e C1 à *Bacillus polygoni* / *Bacillus clarkii* que pertencem a nova família *Sporolactobacillaceae*.

A identificação de microrganismos em local tão extremo como os resíduos de bauxita, incentiva a continuidade das pesquisas para a compreensão e aplicação da hipótese motivadora de utilização do processo de biorremediação na gestão de RB.

7 Recomendações

Para os estudos futuros sobre bactérias presentes nos resíduos de bauxita, visando a biorremediação deste resíduos, recomenda-se:

- ✓ melhoria da amostragem de RB e a busca de vinculação temporal das amostras e local de origem da bauxita (ARB);
- ✓ extração de DNA diretamente dos resíduos de bauxita para verificar a diversidade total de microrganismos, testando outros protocolos;
- ✓ isolamento das bactérias presentes nos resíduos de bauxita, sob condições anaeróbias, através de melhores condições na condução do experimento ou testes com outros meios de cultivo sólido;
- ✓ sequenciamento completo do gene 16S rRNA da cepa C1;
- ✓ testes bioquímicos das cepas isoladas para verificar a produção de ácidos orgânicos e sua eficiência na redução do pH do meio.

REFERÊNCIAS

- ABAL. Associação Brasileira do Alumínio. **O alumínio**. 2014. Disponível em: <<http://www.abal.org.br/aluminio/introducao.asp>>. Acesso em: 19 set. 2014.
- AGNEW, M. D.; KOVAL, S. F.; JARRELL, K. F. Isolation and characterization of novel alkaliphiles from bauxite-processing waste and description of *Bacillus vedderi* sp. Nov., a new obligate alkaliphile. **Systematic and Applied Microbiology**, v.18, p. 221-230. 1995.
- AINO, K. et al. *Bacillus polygoni* sp. nov., a moderately halophilic, non-motile obligate alkaliphile isolated from indigo balls. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 120-124. 2008.
- ALCOA. Alcoa no Brasil. **Sustentabilidade**. 2014. Disponível em: <http://www.alcoa.com/brasil/pt/info_page/relsus_desempenho_ambiental.asp>. Acesso em: 19 set. 2014.
- AMRITPHALE, S. et al. A novel process for making radiopaque materials using bauxite – Red mud. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 27, p. 1945-1951. 2007.
- ARORA, A. et al. Alkalistable xylanase production by alkalitolerant *Paenibacillus montaniterrae* RMV1 isolated from red mud. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, p. 1-7. 2013.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHAES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 167-179. 2007.
- BURG, B. V. D. Extremophiles as a source for novel enzymes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 213-218. 2003.
- CARRINO, J. J.; LEE, H. H. Nucleic acid amplification methods. **Journal of Microbiological**, v. 23, p. 3-20. 1995.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **CBA multada por poluir rios da região de Sorocaba**. 2004. Disponível em < http://www.cetesb.sp.gov.br/noticentro/004/07/29_multa.pdf>. Acessado em 2 set. 2014.
- CHAMPDORÉ, M. et al. Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. **Journal of the Royal Society**, v. 4, p. 183-191. 2006.

CHEN, W. et al. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1063-1070. 2005.

COLE, J. R. et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, p. 1-10. 2013.

COSTA FILHO, L. M. **Reabilitação de áreas de resíduo desativadas**. Workshop Barragens de rejeito, IBRAM. 2008. Disponível em: <<http://www.ibram.org.br/sites/700/784/00001750.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2014.

DUARTE, A. P. **Classificação das barragens de contenção de rejeitos de mineração e de resíduos industriais no estado de Minas Gerais em relação ao potencial de risco**. 2008. Tese de Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 297-314. 2004.

GARAU, G. et al. Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization, culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil. **Geoderma**, v. 142, p. 47-57. 2007.

GARCIA, M. C. S. **Modificação do resíduo de bauxita gerado no processo Bayer por tratamento térmico**. 2012. Tese de Mestrado em Engenharia de Materiais. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GONZÁLEZ-TORIL, E. et al. Microbial ecology of an extreme acid environment, the Tinto River. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4853-4865. 2003.

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

GRANT, W. D.; MWATHA, W. E.; JONES, B. E. Alkaliphiles: ecology, diversity and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 75, p. 255-269. 1990.

GRAY, C. W. et al. Field evaluation of *in situ* remediation of a heavy metal contaminated soil using lime and red-mud. **Environmental Pollution**, v. 142, p. 530-539. 2006.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis proGram for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98. 1999.

HALL, B. G. **Phylogenetic trees made easy: a how-to manual**. Sunderland, Sinauer Associates, 4^o edição, 282 p. 2011.

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

HEUER, H. et al. Analysis of actinomycetes communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3233-3241. 1997.

HIND, R. A.; BHARGAVA, S. K.; GROCOTT, S. C. The surface chemistry of Bayer process solids: a review. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects**, n^o 146, p. 359-374. 1999.

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

HYDRO. **A Hydro no Brasil**. 2014. Disponível em: <<http://www.hydro.com>>. Acessado em: 01 set. 2014.

JANTO, B. et al. Genome of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 reveals adaptations that support the ability to grow in an external pH range from 7.5 to 11.4. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 3289-3309. 2011.

JARREL, K. F. et al. Isolation and characterization of bacteriophage BCJA1, a novel temperate bacteriophage active against the alkaliphilic bacterium, *Bacillus clarkii*. **Extremophiles**, v. 1, p. 199-206. 1997.

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

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

KRISHNA, P.; SUDHAKARA, M.; PATNAIK, S. K. *Aspergillus tubingensis* reduces the pH of the bauxite residue (red mud) amended soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 167, p. 201-209. 2005.

KRISHNA, P.; ARORA, A.; REDDY, M. S. An alkaliphilic and xylanolytic strain of actinomycetes *Kocuria* sp. RM1 isolated from extremely alkaline bauxite residue sites. **World Journal Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 3079-3085. 2008.

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

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

KUMAR, U.; BANDYOPADHYAY, M. Sorption of cadmium from aqueous solution using pretreated rice husk. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 104-109. 2006.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA Sequencing. *In*: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. John Wiley & Sons, New York, USA, 329 p. 1991.

LERMAN, L. S. et al. Sequence-determined DNA separations. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 13, p. 399-423. 1984.

LEROUX, J.; MAHMUD, M. X-ray quantitative analysis by an emission-transmission method. **Analytical Chemistry**, v. 38, p. 77-82. 1966.

LIU, Y.; NAIDU, R.; MING, H. Red mud as a amendment for pollutants in solid and liquid phases. **Geoderma**, v. 163, p. 1-12. 2011.

LOGAN, N. A.; DE VOS, P. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174^{AL}. *In*: DE VOS, P. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Springer, New York. Second edition, v. 3 - The Firmicutes, 1450 p. 2009.

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

MACHADO, W. G. F. **Monitoramento de barragens de contenção de rejeitos da mineração**. 2007. Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Potential of halotolerant and halophilic microorganism for biotechnology. **Extremophiles**, v. 5, p. 73-83. 2001.

MAYES, W. M. et al. Dispersal and attenuation of trace contaminants downstream of the Ajka bauxite residue (red mud) depository failure, Hungary. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 5147-5155. 2011.

NASCIMENTO, P. A. M. Gestão Ambiental em área de risco no município de Barcarena/Pará. **II Encontro da Sociedade Brasileira de Sociologia da Região Norte, Belém - Pará**. 2010.

NETTO, O. V. C. **Identificação de bactérias contaminantes de fermento de cachaça por sequenciamento do gene 16S rDNA**. 2007. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

NGUYEN, Q. D.; BOGER, D. V. Application of rheology to solving tailings disposal problems. **International journal of mineral processing**, n° 54, p. 217-233. 1998.

NIEHAUS, F. et al. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 711-729. 1999.

NIELSEN, P. et al. Comparative 16S rDNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a sixth rRNA group within the genus *Bacillus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 117, p. 61-66. 1994.

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

OVERMANN, J. Principles of enrichment, isolation, cultivation and preservation of Prokaryotes. **The Prokaryotes**, p. 80-136. 2006.

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

PETTINARIM, J. et al. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter* sp. Strain FA8. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5331-5334. 2001.

RAGHAVAN, P. K. N.; KSHATRIVA, N. K.; WAWRVNINK, K. Recovery of metal values from red mud. **TMS (The minerals, metals & materials society)**. 2011.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425. 1987.

SALLOTO, G. R. B. et al. A biologia das arqueias halofílicas e seu potencial biotecnológico. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, p. 226-234. 2012.

SCHMALENBERGER, A. et al. Bacterial communities established in bauxite residues with different restoration histories. **Environmental Science & Technology**, v. 47, p. 7110-7119. 2013.

SCHNEEGURT, M. A.; DORE, S. Y.; KULPA JR, C. F. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 5, p. 1-8. 2003.

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

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

SREMAC, M.; STUART, E. S. Recombinant gas vesicles from *Halobacterium* sp. Displaying SIV peptides demonstrate biotechnology potential as a pathogen peptide delivery vehicle. **BMC Biotechnology**, v. 8, p. 1-14. 2008.

SUSHIL, S.; BATRA, V. S. Catalytic applications of red mud, na aluminium industry waste: a review. **Applied Catalysis B**, v. 81, p. 64-77. 2008.

TAMURA, K. et al. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** v. 30, p.2725-2729. 2013.

TEBBE, C. C.; VAHJEN, W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2657-2665. 1993.

THAKUR, R. S.; DAS, S. N. Red mud analysis and utilisation. **New Delhi: publications ; information directorate**, 291p., 1° ed. 1994.

TINÓS, T. M. **Mapeamento geologic-geotécnico a partir de metodologia de análise integrada: ensaio de aplicação no município de Poços de Caldas - MG**. 2011. Dissertação de Mestrado, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2011.

TOGAWA, R. C.; BRIGIDO, M. M. PHPH: Web based tool for simple electropheroGram quality analysis. **1st International Conference on**

Bioinformatics and Computacional Biology - IcoBiCoBi, Ribeirão Preto. 2003. Disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>>. Acesso em: 01 jan. 2014.

TOPOLANCIK, J.; VOLLMER, F. Photoinduced transformations in bacteriorhodopsin membrane monitored with optical microcavities. **Biophysical Journal**, v. 92, p. 2223-2229. 2007.

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

VACHON, P. et al. Chemical and biological leaching of aluminium from red mud. **Environmental Science ; Technology**, v. 28, p. 26-30. 1994.

VERMA, D.; SATYANARAYANA, T. An improved protocol for DNA extraction from alkaline soil and sediment samples for constructing metagenomic libraries. **Applied Biochemistry & Biotechnology**, v. 165, p. 454-464. 2011.

WANG, S.; ANG, H. M.; TADÉ, M. O. Novel applications of red mud as coagulant, adsorbent and catalyst for environmentally benign processes. **Chemosphere**, v. 72, p. 1621-1635. 2008.

WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, v. 345, p. 63-65. 1990.

WILLIAMS, F. S.; HAMDY, M. K. Induction of biological activity in bauxite residue. In: DONALDSON, D; RAAHAUGE, B. E. (Ed.). **Essential Readings in Light Metals: Alumina and Bauxite**. Estados Unidos: Wiley, 1982, p. 957-964.

WORLD ALUMINIUM. Bauxite residue management: best practice. **The International Aluminium Institute**. 2014. Disponível em: <<http://www.world-aluminium.orgf>>. Acesso em: 03 set. 2014.

YALÇIN, N.; SEVINÇ, V. Utilization of bauxite waste in ceramic glazes. **Ceramic International**, n° 26, p. 485-493. 2000.

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

ZHOU, J.; BRUNS, M. A.; TIEDJE, J. M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 316-322. 1996.

APÊNDICE A - Valores de Similarity score, S_{ab} score, táxon, nome, domínio, filo, classe, ordem, família e gênero do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA das cepas isoladas dos resíduos de bauxita, obtidos através da ferramenta RDP.

Cepa	Similarity score	S _{ab} score	Táxon	Nome	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
A1	0,996	0,944	Bacillus cohnii	DSM	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,971	0,836	Bacillus halmapalus	DSM	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,971	0,84	Bacillus horikoshii	DSM 8719	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,971	0,847	Bacillus zhanjiangensis	JSM	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,963	0,817	Bacillus vireti	LMG	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
A2	0,996	0,946	Bacillus cohnii	DSM	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,971	0,836	Bacillus halmapalus	DSM	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,971	0,836	Bacillus horikoshii	DSM 8719	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,971	0,845	Bacillus zhanjiangensis	JSM	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,963	0,814	Bacillus vireti	LMG	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
B1	0,998	0,987	Bacillus pseudofirmus	DSM	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,992	0,957	Bacillus marmarensis	GMB E72	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,965	0,791	Falsibacillus pallidus	CW	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Falsibacillus
	0,955	0,813	Bacillus amyloliquefaciens	DSM7	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,953	0,8	Bacillus methylotrophicus	CBMB 205	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
B2	0,998	0,987	Bacillus pseudofirmus	DSM	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,992	0,957	Bacillus marmarensis	GMB E72	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,965	0,791	Falsibacillus pallidus	CW	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Falsibacillus
	0,955	0,813	Bacillus amyloliquefaciens	DSM7	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,953	0,8	Bacillus methylotrophicus	CBMB 205	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
C1	0,99	1	Bacillus polygoni	YN-1	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Sporolactobacillaceae	Sporolactobacillaceae
	0,988	0,982	Bacillus clarkii	DSM	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Sporolactobacillaceae	Sporolactobacillaceae
	0,963	0,803	Bacillus cellulosilyticus	N-4;	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Sporolactobacillaceae	Sporolactobacillaceae

	0,955	0,774	Bacillus vedderi	JaH	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Sporolactobacillaceae	Sporolactobacillaceae_incertae_sedis
	0,945	0,768	Bacillus neizhouensis	JSM	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Sporolactobacillaceae	Sporolactobacillaceae_incertae_sedis
	0,941	0,754	Bacillus agaradhaerens	DSM	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Sporolactobacillaceae	Sporolactobacillaceae_incertae_sedis
C2	0,984	0,876	Bacillus pseudofirmus	DSM	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,977	0,848	Bacillus marmarensis	GMB E72	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,955	0,8	Bacillus nanhaiisediminis	NH3	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,94	0,796	Bacillus amyloliquefaciens	DSM7	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
	0,938	0,785	Bacillus methylophilus	CBMB 205	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus

**ANEXO A - Protocolo de Extração de DNA – Wizard Genomic DNA
Purification Kit (Promega®)**

- ✓ Adicionar 1 mL de cultura *overnight* em um tubo de microcentrifuga *ependorf* de 1,5 µL;
- ✓ Centrifugue a 13.000-16.000×*g* por 2 minutos para separar as células. Remover o supernadante;
- ✓ Adicionar 600 µL de *Nuclei Lysis Solution*, pipetando gentilmente até que as células sejam resuspendidas;
- ✓ Incubar a 80°C por 5 minutos para lisar as células. Resfriar em temperatura ambiente;
- ✓ Adicionar 3 µL de *RNase solution* para o lisado. Inverter o tubo 2-5 vezes para misturar;
- ✓ Incubar a 37°C por 15-60 minutos. Resfrie a amostra em temperatura ambiente;
- ✓ Adicione 200 µL de *Protein Precipitation Solution* para o tubo contendo o lisado. Coloque no vórtex a alta velocidade por 20 segundos para misturar a solução de *Protein Precipitation Solution* com o lisado;
- ✓ Incubar em gelo por 5 minutos;
- ✓ Centrifugar a 13.000-16.000×*g* por 3 minutos;
- ✓ Transferir o supernadante contendo o DNA para um tubo *ependorf* limpo contendo 600µL de isopropanol;
- ✓ Misturar gentilmente por inversão até que se forme uma massa visível de filamentos filiformes de DNA;
- ✓ Centrifugar a 13.000-16.000×*g* por 2 minutos;
- ✓ Cuidadosamente descartar o supernadante e drene o tubo em papel absorvente. Adicionar 600µL de etanol 70% e gentilmente inverter o tubo várias vezes para lavar o DNA;
- ✓ Centrifugar 13.000-16.000×*g* por 2 minutos. Cuidadosamente aspirar o etanol;
- ✓ Drenar o tubo em papel absorvente limpo e permitir que seque ao ar por 10-15 minutos;
- ✓ Adicionar 100µL de *DNA Rehydration Solution* e reidratar o DNA incubando a 65°C por uma hora. Periodicamente misture a solução por leves toques no tubo. De forma alternativa, reidratar o DNA pela incubação da solução *overnight* a temperatura ambiente ou a 4°C.

ANEXO B - Protocolo de Extração de DNA - Power Soil DNA Isolation Kit (MoBio®)

- ✓ Adicionar 0,25g de amostra de solo no *PowerBead Tubes* fornecido; Misturar gentilmente com vortex;
- ✓ Verificar a *Solução C1*, se conter precipitado, aquecer a solução em 60°C até dissolver antes do uso; Adicionar 60µl de *Solução C1* e inverta várias vezes ou vortex brevemente;
- ✓ Segurar o *PowerBead Tubes* horizontalmente usando tubo *Adapter Vortex* para o vórtice; ou tubos colocados horizontalmente em uma almofada *vortex flat-bed* com fita adesiva; Vortex à velocidade máxima por 10 minutos; Nota: se você estiver usando o adaptador Vortex 24 lugares por mais de 12 preparos, aumentar o tempo vortex por 5-10 minutos;
- ✓ Colocar os tubos *PowerBead* em centrifuga, 10.000x g durante 30 segundos à temperatura ambiente;
- ✓ Transferir o sobrenadante para um tubo limpo *2 ml Collection Tube* (fornecido). Nota: Espera-se entre 400 a 500µl de sobrenadante. O sobrenadante ainda pode conter algumas partículas do solo;
- ✓ Adicionar 250µl de *Solução C2* e vortex por 5 segundos. Incubar a 4°C durante 5 minutos; Centrifugar os tubos à temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g. Transferir o sobrenadante para um *2 ml Collection Tube* limpo, evitando o pellet, não mais do que 600µl de sobrenadante;
- ✓ Adicionar 200µl de *Solução C3* e vortex brevemente. Incubar a 4°C durante 5 minutos; Centrifugar os tubos à temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g. Transferir o sobrenadante para um *2 ml Collection Tube* limpo, evitando o pellet, não mais do que 750µl de sobrenadante;
- ✓ Agitar para misturar a *Solução C4* antes do uso. Adicionar 1200µl de *Solução C4* sobre o sobrenadante e vortex durante 5 segundos; Centrifugar a 10000 xg durante 1 minuto;
- ✓ Descartar o líquido e adicionar 675µl de *Solução C4* sobre o *Spin Filter* e centrifugar a 10000 xg durante 1 minuto à temperatura ambiente. Repetir este procedimento três vezes;
- ✓ Adicionar 500µl da *Solução C5* e centrifugar à temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 x g. Eliminar o líquido; Centrifugar à temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g. Com cuidado, coloque o *Spin Filter* em um *2 ml Collection Tube* limpo;
- ✓ Adicionar 100µl de *Solução C6* no centro da membrana do filtro. Centrifugar a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 x g. Descartar o *Spin Filter*. O DNA no tubo está pronto para qualquer aplicação. É recomendado armazenar o DNA no congelador.

ANEXO C - Procedimento para a técnica de DGGE - Loccus Biotecnologia

- ✓ Montar as placas de vidros juntamente com o espaçador e o pente. Apertar os parafusos do cassete;
- ✓ Conectar a mangueira da bomba peristáltica (ponta com agulha) ao sistema de placas de vidro;
- ✓ Preparar 2 mL de cada solução gradiente para formação do gradiente;
- ✓ Adicionar 150 μ L APS 10% em cada 25 mL das soluções;
- ✓ Adicionar 12 μ L TEMED em cada 25 mL das soluções. Agite;
- ✓ Carregar o misturador com as respectivas soluções (A e B). Colocar o misturador sobre o agitador magnético com imã no tubo A. Abrir o misturador e ligar a bomba peristáltica para permitir a mistura das soluções;
- ✓ Depois de passar toda solução apertar o pente e esperar solidificar por 60 minutos;
- ✓ Carregar a cuba com 16 L de TAE 0,5X.
- ✓ Ligar o aparelho para aquecimento a 60°C;
- ✓ Colocar o cassete no aparato com o tampão já aquecido. Empurrar o espaçador do gel para baixo. Retirar as bolhas de ar que se formarem na parte inferior do cassete;
- ✓ Conectar a mangueira de fluxo do tampão no cassete;
- ✓ Conectar os plugs elétricos;
- ✓ Abrir a mangueirinha para lavar os pocinhos do gel e preenchê-los com tampão;
- ✓ Antes de carregar as amostras, desligar o fluxo de tampão;
- ✓ Carregar as amostras;
- ✓ Ligar a fonte e programar a voltagem e o tempo. Deixar a corrida seguir por 5 minutos;
- ✓ Ligar a mangueira do fluxo de tampão. Checar a amperagem;
- ✓ Finalizada a corrida, desligar a cuba e a fonte. Retirar o cassete da cuba. Soltar os parafusos e retirar as placas do cassete;
- ✓ Remover o gel e corar.

**ANEXO D - Protocolo de purificação de DNA - Wizard SV Gel and PCR
Clean-up System (Promega®)**

- ✓ Adicionar igual volume de *Membrane Binding Solution* para o produto de PCR;
- ✓ Inserir a minicoluna no *Collection Tube*;
- ✓ Transfiri a mistura de DNA e *Membrane Binding* para a minicoluna. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto;
- ✓ Centrifugar a 16.000×g por 1 minuto. Descartar o volume do *Collection Tube*, inserir a minicoluna no *Collection Tube* novamente;
- ✓ Adicionar 700 µL de *Membrane Wash Solution* (já preparado com etanol).
- ✓ Centrifugar por 16.000×g por 1 minuto. Descarte o volume e reinsira a minicoluna no *Collection tube*;
- ✓ Adicionar 500 µL de *Membrane Wash Solution*. Centrifugar a 16.000×g por 5 minutos;
- ✓ Esvaziar o *Collection Tube* e centrifugar novamente o aparato por 1 minuto com a tampa da centrífuga aberta para permitir evaporação de qualquer etanol residual;
- ✓ Cuidadosamente, transferir a minicoluna para um ependorf de 1,5 µL;
- ✓ Adicionar 50 µL de *Nuclease-Free Water* para a minicoluna. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a 16.000×g por 1 minuto;
- ✓ Descartar a minicoluna e armazenar o DNA a 4°C ou -20°C.