



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Diversidade microbológica no solo temperado- uma análise estrutural e funcional com uso de técnicas moleculares de “fingerprinting”

Rui Miguel Vieira Ferreira

Orientador:

Doutora Margarida Maria Cabral Lages Azevedo Santana

Setembro de 2012

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Diversidade microbológica no solo temperado- uma análise estrutural e funcional com uso de técnicas moleculares de “fingerprinting”

Rui Miguel Vieira Ferreira

Orientador:

Doutora Margarida Maria Cabral Lages Azevedo Santana

Agradecimentos

Gostava de deixar aqui presente os meus agradecimentos às pessoas que, de alguma forma, tornaram possível a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, à Doutora Margarida Santana, minha orientadora, por me ter dado a oportunidade de integrar este projeto, pelos conselhos, pela dedicação, por tudo o que me ensinou, pelo apoio e pela paciência.

À Professora Maria Ivone Clara, à Professora Rosário Félix e à Doutora Carla Varanda pelo apoio científico, pelo incentivo e simpatia que revelaram durante todo o percurso de trabalho.

À D. Maria Mário Azedo, Técnica de Laboratório de Virologia Vegetal, por toda a ajuda no apoio técnico da componente experimental.

Ao Doutor Juan M. Gonzales do Instituto de Recursos Naturais e Agrobiologia (IRNAS-CSIC, Sevilla), por todo o apoio científico.

À Professora Solange Oliveira, Doutora Ana Alexandre e Doutora Marta Laranjo do Laboratório de Microbiologia do Solo, pelo auxílio sempre que necessário.

Ao professor Carlos Alexandre do Departamento de Geociências da Universidade de Évora, pelo apoio científico, fornecimento de dados e informação bibliográfica sobre os valores e conteúdos a abordar.

Ao Engenheiro Gonçalo Pinheiro da Fundação Eugénio de Almeida pela ajuda e disponibilidade no momento da recolha das amostras para a realização do trabalho experimental.

À minha colega Helena Gaspar, “companheira de armas” no âmbito deste trabalho, por toda a simpatia e pela disponibilidade.

À minha mãe, tia, irmão e à minha namorada, pela educação, carinho, apoio, compreensão e conselhos. Deram-me a força e incentivo necessárias para nunca desistir de mim e de que sou capaz de alcançar os meus objetivos

Aos meus amigos, colegas e ex-colegas pela partilha de experiências, informação e apoio. Seguimos caminhos separados, mas apoiamo-nos continuamente.

Resumo

Estudos recentes sugerem um papel importante de bactérias termofílicas do *Phylum Firmicutes*, presentes em solos temperados, na fertilidade dos mesmos, por meio da produção de sulfato e amónia, elementos importantes na nutrição das plantas. Neste trabalho pretendeu-se avaliar a dinâmica da população de bactérias termofílicas de um solo temperado agrícola, e a dos seus potenciais antagonistas quanto à utilização de sulfato e amónia pelas plantas, as bactérias sulfato-redutoras e as bactérias oxidativas da amónia da classe β -*Proteobacteria*, respetivamente. Dois fatores capazes de alterar a diversidade dessas populações são a temperatura e o cobre, este último frequentemente utilizado em tratamentos fitosanitários. A diversidade microbiana relativa a estes grupos, sob influência do cobre e da temperatura, foi avaliada através da técnica de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), uma técnica de *fingerprint* molecular. Como resultado deste estudo, identificaram-se bactérias resistentes ao cobre, presentes no solo agrícola analisado e pertencentes aos grupos taxonómico alvo, e concluiu-se sobre a sua contribuição para a fertilização no solo tratado.

“Microbial diversity in temperate soil – a structural and functional analysis using molecular techniques for "fingerprinting"”

Abstract

Recent studies suggest an important role of thermophilic bacteria of the *Phylum Firmicutes* in soil fertility, through the production of sulphate and ammonia, important elements in plant nutrition. In this work, we evaluated the dynamics of the thermophilic bacteria population in a temperate soil, as well as the one of their potential antagonists on the use of sulphate and ammonia by plants, i.e. sulfate-reducing bacteria and ammonia oxidizing β -proteobacteria. Temperature and copper are factors changing the diversity of these populations; the latter is often used in phytosanitary treatments. The change on the microbial diversity in each of these groups, under the effect of copper and temperature, was evaluated by DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), a molecular fingerprint technique. As a result of this study, we identified copper resistant bacteria belonging to the targeted taxonomic groups, and we concluded on their contribution for fertilization in the copper treated soil.

Abreviaturas gerais

A₂₆₀ – absorvância a 260nm;

A₂₈₀ – absorvância a 280nm;

Água MilliQ – água purificada no sistema MilliQ (Millipore);

AOB – Bactérias Oxidativas de Amónia (*Ammonia Oxidizing Bacteria*);

APS - Persulfato de amónia;

ATP – Adenosina Trifosfato;

Bisacrilamida – N,N'-metileno-bis-acrilamida;

DGGE – Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*);

DNA – ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*);

DNase – desoxirribonuclease;

dNTPs – desoxinucleótidos trifosfatados;

D.O. – densidade ótica;

EDTA – ácido etileno-diaminatetracético;

g – unidade de força centrífuga;

kb – kilobases;

M – molar (quando antecedida de um valor numérico);

mM – milimolar;

NB - *Nutrient Broth-Oxid*;

NBA - *Nutrient Broth-Oxid* com 15% de agar;

nm – nanómetro;

NOB – Bactérias Oxidativas de Nitrato (*Nitrite Oxidizing Bacteria*);

pb – pares de bases;

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*);

ppm – parte por milhão;

p/v – relação peso/volume;

RNA – ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*);

rpm – rotações por minuto;

rRNA – RNA ribossomal (*ribosomal RNA*)

SRB – Bactérias Redutoras de Sulfato (*Sulfate Reducting Bacteria*);

TAE - tampão Tris-Acetato-EDTA;

Taq – DNA polimerase de *Thermophilus aquaticus*;

TE – Tampão Tris-EDTA;

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina;

Tris – tris(hidroximetil)aminometano;

UV – ultravioleta;

Índice

Introdução	1
1. Ciclos biogeoquímicos do azoto e do enxofre.....	1
2. Metabolismo de oxidação da amónia	4
3. Metabolismo de redução do sulfato	5
4. População bacteriana dos solos	7
5. Presença de bactérias termofílicas do <i>Phylum Firmicutes</i> em solos temperados	8
6. Papel e impacto das bactérias termofílicas em ambientes terrestres.....	11
7. Efeito do cobre nas comunidades bacterianas	12
8. Cobre como bioelemento.....	13
9. Métodos moleculares na análise da dinâmica de comunidades bacterianas.....	16
Objetivos gerais	18
Objetivos específicos.....	18
Metodologia	19
1. Recolha de amostras do solo e caracterização do local de amostragem	19
2. Enriquecimento seletivo das amostras em diferentes condições.....	20
2.1. Quantificação de amónio presente nos enriquecimentos.....	22
2.2. Quantificação do sulfato presente nos enriquecimentos.....	22
3. Isolamento bacteriano e caracterização fenotípica, fisiológica e molecular.....	23
3.1. Análise fenotípica	24
3.2. Análise fisiológica	24
3.2.1 Culturas do isolado	24
3.2.2 Quantificação da Proteína celular total do isolado	25
3.3. Análise molecular	25
4. Extração de DNA total e quantificação	27
5. PCR-DGGE.....	28
5.1. Amplificação do gene 16S rRNA.....	28
5.2. Primers e reações de PCR.....	29
5.3. Etapas de amplificação.....	31
5.4. Visualização dos produtos de PCR	33
5.5. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	33

5.5.1. Preparação dos géis	33
5.5.2. Condições de corrida	34
5.6. Excisão de bandas e purificação	34
Resultados e discussão	36
1. Parâmetros físico-químicos	36
2 Quantificação nos enriquecimentos	37
2.1 Produção de amónio	37
2.2 Produção de sulfato	38
3 Caracterização fenotípica, fisiológica e molecular do isolado	40
3.1 Análise fenotípica e fisiológica	40
3.2. Análise molecular	43
4. Análise dos géis de DGGE e sequenciação	44
4.1. PCR-DGGE de amostras de DNA do solo	44
4.2. PCR-DGGE de amostras de DNA extraído dos enriquecimentos	45
4.2.1. <i>Phylum Firmicutes</i>	47
4.2.2. Subgrupo filogenético <i>β-Proteobacteria</i>	51
4.2.3. Subgrupo filogenético <i>Desulfovibrio/Desulfomicrobium</i>	54
Conclusões e perspetivas futuras	57
Referências Bibliográficas	60
Anexos	67
i. Tabelas referentes à quantificação de sulfato e amónia nos enriquecimentos .	67
ii. Sequência do 16S rDNA do isolado	68
iii. Sequências das bandas recolhidas do gel DGGE	69
a. <i>Firmicutes</i>	69
b. <i>β-Proteobacteria</i>	70
c. <i>Desulfovibrio/Desulfomicrobium</i>	71

Índice de figuras

Figura 1: Ciclo do azoto (adaptado de <i>Mandigan et al, 2003</i>).....	2
Figura 2: Ciclo do enxofre (adaptado de <i>Madigan et al, 2003</i>)	3
Figura 3: Via da oxidação da amónia por <i>Nitrosomonas europaea</i> (retirado de Metacyc)	4
Figura 4: Via dissimilativa da redução do sulfato, proposta para <i>Desulfovibrio vulgaris</i> (retirado de MetaCyC).....	6
Figura 5: Contribuição de cada <i>Phylum</i> em bibliotecas 16S RNA de comunidades bacterianas de solos (2920 clones em 21 bibliotecas) (adaptado de <i>Janssen, 2006</i>)	8
Figura 6 : Imagem de satélite mostrando um trajeto de transporte e dispersão de partículas com origem no Sahara no dia 13 de setembro e 2001, usando SeaWiFS e modelo de dispersão baseado nas estações EARLINET	10
Figura 7: Modelo de homeostase do cobre para <i>Bacillus subtilis</i> . (adaptado de <i>Chillapaggari et al, 2009</i>).....	15
Figura 8: Fotografia do local de amostragem (Google Earth, 2012)	20
Figura 9: Quantificação de amónio nos enriquecimentos seletivos A) Produção absoluta de amónio B) Produção de amónio normalizada por unidades formadoras de colónias.....	37
Figura 10: Quantificação de sulfato nos enriquecimentos seletivos A) Produção absoluta de sulfato B) Produção de sulfato normalizada por unidades formadoras de colónias.	39
Figura 11: Visualização do isolado ao Microscópio ótico <i>Olympus BX41</i> após coloração diferencial de Gram.....	41
Figura 12: Produção absoluta de sulfato total (mM) (azul) e produção de sulfato normalizada em relação ao conteúdo proteico celular (mmol mg^{-1}) (vermelho), para os diferentes tempos T_1 a T_4	42
Figura 13: Visualização do isolado ao Microscópio ótico Olympus BX41 ao tempo T_3 . a) Preparação a fresco, b)) após coloração diferencial de Gram	42
Figura 14: Géis de DGGE das amostras resultantes de amplificação por <i>nested-PCR</i> sobre o DNA extraído das amostras compostas do solo A- Gel resultante da amplificação com os <i>primers</i> para os géneros <i>Desulfovibrio</i> e <i>Desulfomicrobium</i> ; B - Gel resultante da amplificação com os <i>primers</i> para a classe β - <i>Proteobacteria</i>	44
Figura 15: Gel de DGGE das amostras resultantes de amplificação direta sobre o DNA extraído dos enriquecimentos.....	46
Figura 16: Gel de DGGE das amostras de DNA extraído dos enriquecimentos seletivos, amplificadas com o par de <i>primers</i> específicos para o subgrupo filogenético <i>Firmicutes</i>	47
Figura 17: Perfil dos picos obtidos para as bandas da amostra NB30 Cu100, e da amostra NB30 Cu500; o cálculo da área de algumas bandas está indicado	48
Figura 18: Gel de DGGE das amostras de DNA extraído dos enriquecimentos seletivos, amplificadas com o par de <i>primers</i> específicos para o subgrupo filogenético β - <i>Proteobacteria</i> 51	
Figura 19: Montagem do gel de DGGE das amostras de DNA extraído dos enriquecimentos seletivos, amplificadas com o par de <i>primers</i> específicos para os géneros <i>Desulfovibrio/Desulfomicrobium</i>	54

Índice de esquemas

Esquema 1: Enriquecimento seletivo das amostras a diferentes condições de temperatura e concentração de sulfato de cobre.....	21
Esquema 2. Esquema das metodologias utilizadas, de amplificação direta e por <i>nested-PCR</i> . .	29

Índice de tabelas

Tabela 1: Parâmetros registados na recolha de amostras	20
Tabela 2: Sumário dos <i>primers</i> 16S rRNA universais e específicos para os subgrupos filogenéticos em estudo, a sua posição em <i>E. coli</i> e a temperatura de <i>annealing</i>	32
Tabela 3: Parâmetros físico-químicos das amostras recolhidas no solo do olival	36
Tabela 4: Resultados da análise Blast da sequência parcial do gene 16S rDNA do isolado.....	43
Tabela 5: Tabela resultante da análise conjunta da sequência e da intensidade relativa de bandas selecionadas no gel-Figura16	50
Tabela 6: Tabela resultante da análise conjunta da sequência e da intensidade relativa de bandas, selecionadas no Gel-Figura 18.....	53
Tabela 7: Tabela resultante da análise conjunta da sequência e da intensidade relativa de bandas, selecionadas no Gel-Figura 19.....	56
Tabela 8 - Quantificação de amónio nos enriquecimentos.	67
Tabela 9 - Quantificação de sulfato nos enriquecimentos.....	68
Tabela 10 – Sequência 16S rDNA do isolado obtido a partir do enriquecimento.....	68
Tabela 11 - Sequências obtidas a partir das bandas recolhidas do gel de DGGE.....	69
Tabela 12 - Sequências obtidas a partir das bandas recolhidas do gel de DGGE.....	70
Tabela 13 - Sequências obtidas a partir das bandas recolhidas do gel de DGGE.....	71

Introdução

Os solos, como sistemas biológicos complexos, dependem da interação de três fatores: ambiente geofísico, comunidade microbiana presente e atividade biológica. Encontra-se documentada a importância dos microrganismos no solo, em particular de bactérias, que participam nos ciclos biogeoquímicos dos elementos, em particular do carbono (C), fósforo (P), azoto (N) e enxofre (S); diversos microrganismos são responsáveis pela incorporação destes elementos tanto em compostos orgânicos como inorgânicos, graças aos distintos metabolismos envolvendo processos de oxidação e de redução, que se traduzem na dissimilação versus assimilação de nutrientes no sistema biótico e na contínua reutilização dos elementos acima referidos.

1. Ciclos biogeoquímicos do azoto e do enxofre

O azoto e o enxofre encontram-se entre os nutrientes fundamentais para o crescimento e manutenção da homeostasia das plantas. O azoto pode ser absorvido pelas plantas na forma de nitrato (NO_3^-) ou de amónio (NH_4^+), enquanto o enxofre é absorvido na forma de sulfato (SO_4^{2-}). O azoto também pode ser absorvido sob a forma de aminoácidos biodegradados, nomeadamente glicina (Jones *et al*, 1999; 2005)

Apesar de uma grande fração do azoto presente nos solos estar sob forma orgânica, em muitas situações, em particular devido à lixiviação dos solos, o azoto é um elemento limitante para o crescimento vegetal. A produção de alimentos deve-se em grande parte à produção de fertilizantes contendo amónio (NH_4^+) como fonte de azoto, num processo químico patenteado por Fritz Haber e Carl Bosch em 1910 (Appl, 2006).

As bactérias do género *Rhizobium* estabelecem uma relação simbiótica com plantas leguminosas que constitui uma das principais fontes de fixação biológica de azoto inorgânico (N_2). No processo simbiótico de fixação de azoto, os rizóbios convertem o azoto atmosférico, não assimilável, em amónia passível de ser utilizado pela planta leguminosa hospedeira.

A amónia pode também ser sintetizada por intermédio da degradação de aminoácidos e redução de compostos azotados presentes em ácidos húmicos resultantes da decomposição da biomassa. Algumas bactérias anaeróbias pertencentes ao *Phylum Firmicutes* e *Proteobacteria*¹ (em particular *γ -Proteobacteria*) contribuem

¹ Para descrição sumária, ver secção 2

também na produção de amónia ao utilizar o nitrato como aceitador alternativo da cadeia respiratória e reduzindo-o a amónia.

A transformação de amónia em nitrato é realizada em duas fases; as bactérias do género *Nitrosomonas* realizam a oxidação da amónia a nitrito (NO_2^-) como parte do seu metabolismo para produção de energia e divisão celular. A oxidação do nitrito em nitrato (NO_3^-) é realizada por microrganismos do género *Nitrobacter*, sendo o nitrato assimilado pelas plantas (Teske et al, 1994; Suzuki et al, 1997; De Boer et al, 1992, 2000).

A Figura 1 mostra como os microrganismos do solo, no seu conjunto, são importantes no ciclo biogeoquímico do azoto e na formação de nitrato ou amónia assimiláveis pelas plantas.

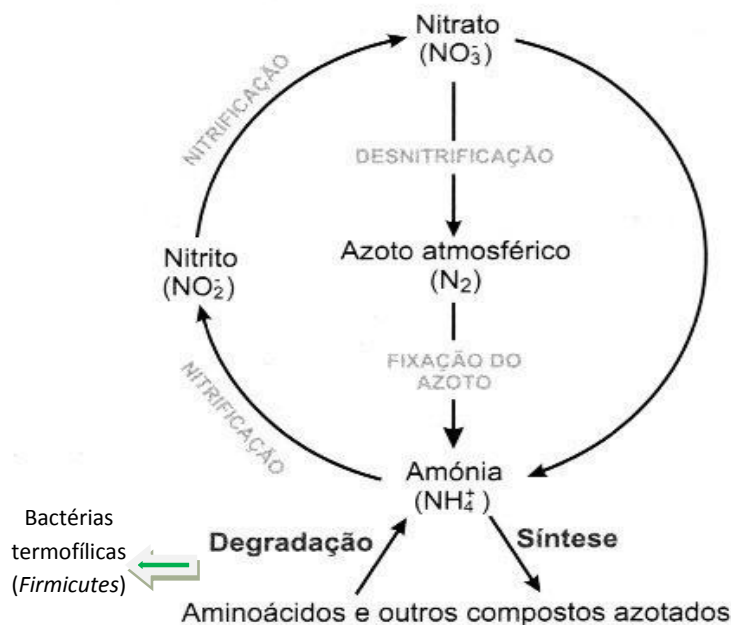


Figura 1: Ciclo do azoto (adaptado de Mandigan et al, 2003)

O enxofre é outro nutriente necessário para maximizar a qualidade das culturas, sendo utilizado na sua forma elementar como constituinte de muitos fertilizantes.

No solo, o enxofre encontra-se principalmente na forma orgânica SH, em resíduos de biomassa na constituição de aminoácidos (cisteína e metionina) e em compostos mais complexos como o ácido húmico. Em solos não fertilizados, a mineralização do enxofre orgânico em sulfato inorgânico (SO_4^{2-}) é considerado o maior contribuinte para o crescimento das plantas (Eriksen, 1996). Este processo consiste

numa decomposição efetuada por exemplo por fungos, do enxofre em sulfureto de hidrogénio (SH_2), seguida de oxidação do sulfureto em tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), um produto intermédio da oxidação do sulfato, realizada por bactérias quimiolitotróficas oxidativas do enxofre (por exemplo *Beggiatoa*, *Sulfurimonas*).

Também α -*Proteobacteria* quimiolitotróficas facultativas (p.e. *Paracoccus*) oxidam o enxofre inorgânico, nestas o sistema multienzimático de oxidação do tiosulfato (SOX) constitui a via central dessa oxidação (Ghosh et al, 2009). Este sistema é induzido pelo tiosulfato, que se liga covalentemente à subunidade SoxY, dando-se uma oxidação dos átomos de enxofre do tiosulfato pela transferência de eletrões para a subunidade SoxXA. O complexo pode aceitar outras espécies de enxofre como o sulfureto (SH), enxofre elementar (S_0), o sulfito (SO_3) e tetrionato (S_4O_6) (Sauvé et al, 2007; Ghosh et al, 2009). As bactérias reductoras de sulfato, que incluem, entre outros, o género *Desulfovibrio* contribuem largamente para a produção de sulfureto de hidrogénio, utilizado pelas bactérias quimiolitotróficas suprarreferidas. Diversos estudos apontam uma fraca mineralização do enxofre orgânico a sulfato no solo (Eriksen, 2008). Diametralmente oposta à mineralização, ocorre a imobilização do sulfato inorgânico que consiste na assimilação pela comunidade bacteriana e outros organismos (e.g. plantas) e incorporação em matéria orgânica.

A Figura 2 mostra o ciclo biogeoquímico de enxofre e os microrganismos do solo que nele intervêm.

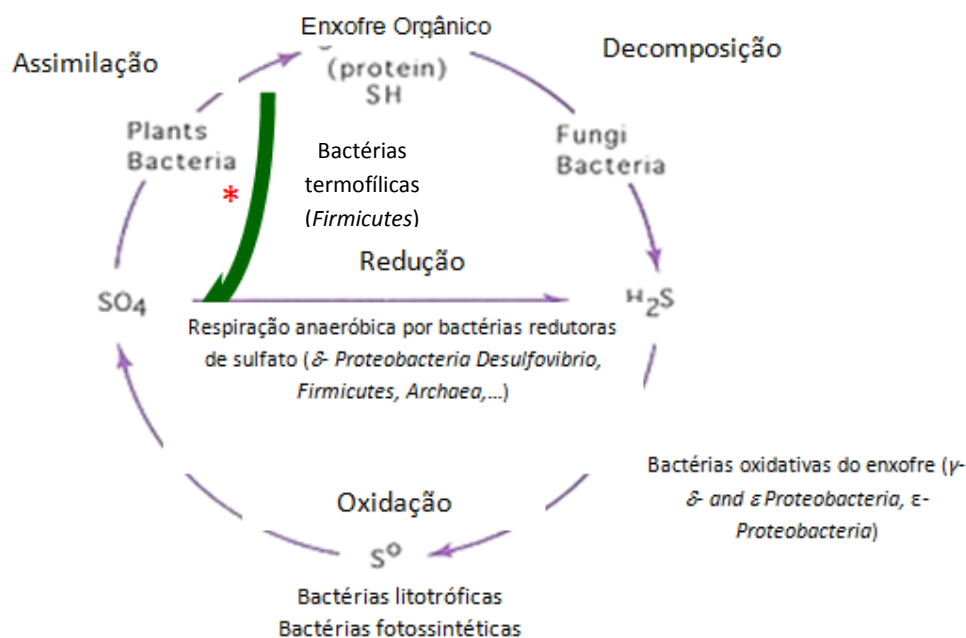


Figura 2: Ciclo do enxofre (adaptado de Madigan et al, 2003)

2. Metabolismo de oxidação da amónia

A oxidação da amónia em nitrato é um dos passos fundamentais para o ciclo do azoto. Esta é realizada em dois passos, a conversão de amónia em nitrito, que, por sua vez é convertida em nitrato, pela ação de dois diferentes grupos de microrganismos: as bactérias oxidativas de amónia (AOB), e as bactérias oxidativas de nitrato (NOB), com metabolismo quimiolitotrófico e aeróbias obrigatórias (Kowalchuk *et al*, 2001).

As bactérias oxidativas de amónia pertencem na sua grande maioria à classe β -*Proteobacteria* (*Nitrosomonas*; *Nitrospira*; *Nitrosolobus*), embora seja conhecido um género pertencente à classe γ -*Proteobacteria* (*Nitrosococcus oceanus*) (Head *et al*, 1993). No entanto, nenhuma das γ -*Proteobacterias* oxidativas de amónia foi isolada em ecossistemas terrestres (Kowalchuk *et al*, 2001).

A conversão de amónia a nitrito envolve duas reações distintas, a oxidação de amónia (NH_3) em hidroxilamina (NH_2OH), catalisada pelo complexo enzimático membranar amónia monooxigenase (AMO; EC 1.14.99.39), codificada pelos genes amoA/B/C; e a oxidação da hidroxilamina a nitrito e produção de 4 eletrões, catalisada pela enzima periplasmática hidroxilamina oxidoreductase (HAO; EC 1.7.3.4), conforme indica a figura 3.

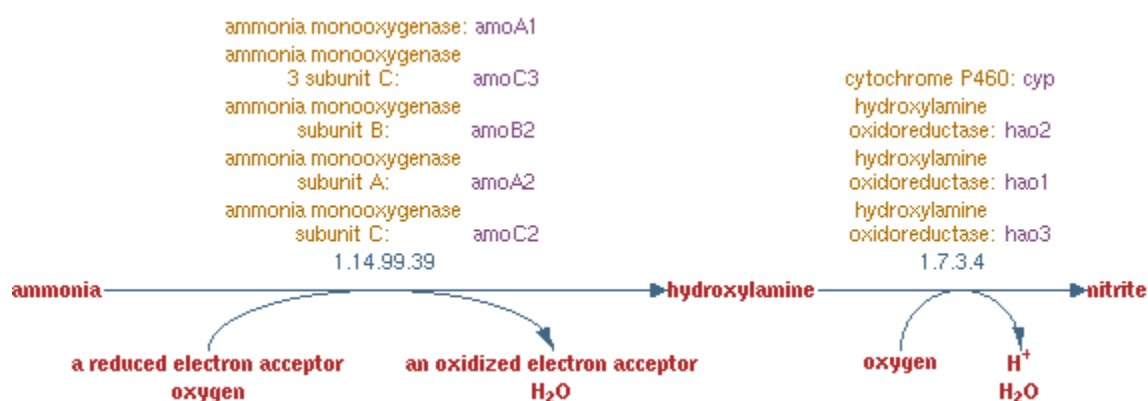


Figura 3: Via da oxidação da amónia por *Nitrosomonas europaea* (retirado de Metacyc)

Considera-se que a amónia é o substrato de eleição para esta via ao invés do ião amónio (NH_4^+), e que o rácio $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ pode afetar a produção de energia e, conseqüentemente, o crescimento bacteriano. Assim podemos considerar a oxidação da amónia como o passo limitante para a nitrificação em muitos ecossistemas, visto que a acumulação de nitrito nos ecossistemas é rara (De Boer *et al*, 1992).

As bactérias oxidativas de nitrato catalisam o segundo passo na nitrificação: a oxidação de nitrito (NO_2^-) a nitrato (NO_3^-). Estudos filogenéticos de 16S rRNA consideraram 4 géneros: *Nitrobacter* (β -*Proteobacterias*), *Nitrospina* (δ -*Proteobacterias*), *Nitrococcus* (γ -*Proteobacterias*) e *Nitrospira* (domínio Bacteria, *Phylum Nitrospira*) (Juretschko *et al*, 1998). A bactéria quimiolitotrófica facultativa

Nitrobacter é considerada a espécie dominante em ecossistemas terrestres e de água doce. Os outros três gêneros apresentam um metabolismo litoautotrófico obrigatório e foram isolados em ecossistemas aquáticos.

A conversão de nitrito a nitrato é catalisada pela enzima nitrito oxidoreductase (NOR, EC 1.7.2._), constituída por duas subunidades ligadas ao citocromo C. Esta proteína apresenta um heteroátomo de molibdênio no seu centro ativo e um cluster [Fe-S]. Em condições aeróbicas, participa na cadeia transportadora de elétrões, do nitrito para o oxigênio, gerando o já enunciado nitrato e o ião molibdênio (IV) (*Meincke et al*, 1992)

Encontra-se bastante documentado que a assimilação de azoto nas plantas é determinada pela abundância e acessibilidade das várias espécies químicas no solo, o que leva à preferência por nitrato e amônio sobre outras espécies de azoto em solos agrícolas. Também a manutenção do equilíbrio iônico pelas plantas pode ser fator preferencial na escolha da espécie química para a homeostasia das plantas (*Wirén et al*, 1997). Em solos bastante fertilizados, o nitrato é a fonte mais abundante de azoto, com concentrações entre 0.5 e 10 μM enquanto que a concentração de amônio é 10 a 1000 x menor, sendo mais abundante em solos onde a nitrificação foi inibida (*Marschner*, 1995). Assim, em condições normais de fertilização, o nitrato é a espécie mais absorvida pelas raízes das plantas, sendo posteriormente reduzida a amônia nos tecidos. No entanto, esta diferença de concentrações não reflete o ratio de absorção de azoto, visto que a maioria das plantas superiores preferencialmente assimila amônio quando o fornecimento de azoto por fertilizantes é limitado e estando as duas espécies químicas disponíveis (*Jones et al*, 2004).

3. Metabolismo de redução do sulfato

As bactérias redutoras de sulfato (SRB) formam um grupo filogeneticamente diverso de microrganismos anaeróbios que utilizam o sulfato. Muitos dos redutores de sulfato pertencem a 23 gêneros da classe δ -*Proteobacteria*, seguindo-se microrganismos gram-positivos do *Phylum Firmicutes* (*Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* e *Desulfosporomusa*). Também se encontram sulfato-redutores termofílicos; são membros do género *Thermodesulfovibrio*, *Phylum Nitrospirae* e membros dos *Phylums Thermodesulfobacteria* e *Thermodesulfobium*.

No geral, as SRB são classificadas em dois grupos quanto ao seu metabolismo: aqueles que degradam compostos orgânicos de modo incompleto a acetato e aqueles que os degradam completamente a dióxido de carbono. O metabolismo de redução do sulfato representa o maior contributo na degradação de matéria orgânica em ecossistemas ricos em enxofre. Estima-se que 50% da degradação da biomassa provenha deste processo oxidativo em ambientes marinhos (*Muyzer et al*, 2008).

O metabolismo das SRB baseia-se na utilização do sulfato como aceitador de elétrons em processos de degradação de matéria orgânica com produção de energia e resultando na produção de sulfureto de hidrogênio (SH₂). Esta redução do sulfato constitui portanto uma via dissimilatória. Em todos os procariotas que apresentam este metabolismo, o processo dissimilatório é mediado por três enzimas fundamentais (figura 4). A enzima ATP sulfurilase (EC 2.7.7.4) catalisa a ativação do sulfato inerte em adenosina-5'-fosfosulfato (APS). O APS é reduzido em adenosina-monofosfato (AMP) e sulfito, por ação da enzima adenilsulfato reductase (EC 1.8.99.2). A última enzima da via, sulfito-reductase (Dsr; EC 1.8.99.1/3) catalisa a redução do sulfito em sulfureto. Esta redução envolve 6 elétrons e é considerada o passo fundamental na via dissimilatória de redução do sulfato (Meyer *et al*, 2007; Muyzer *et al*, 2008).

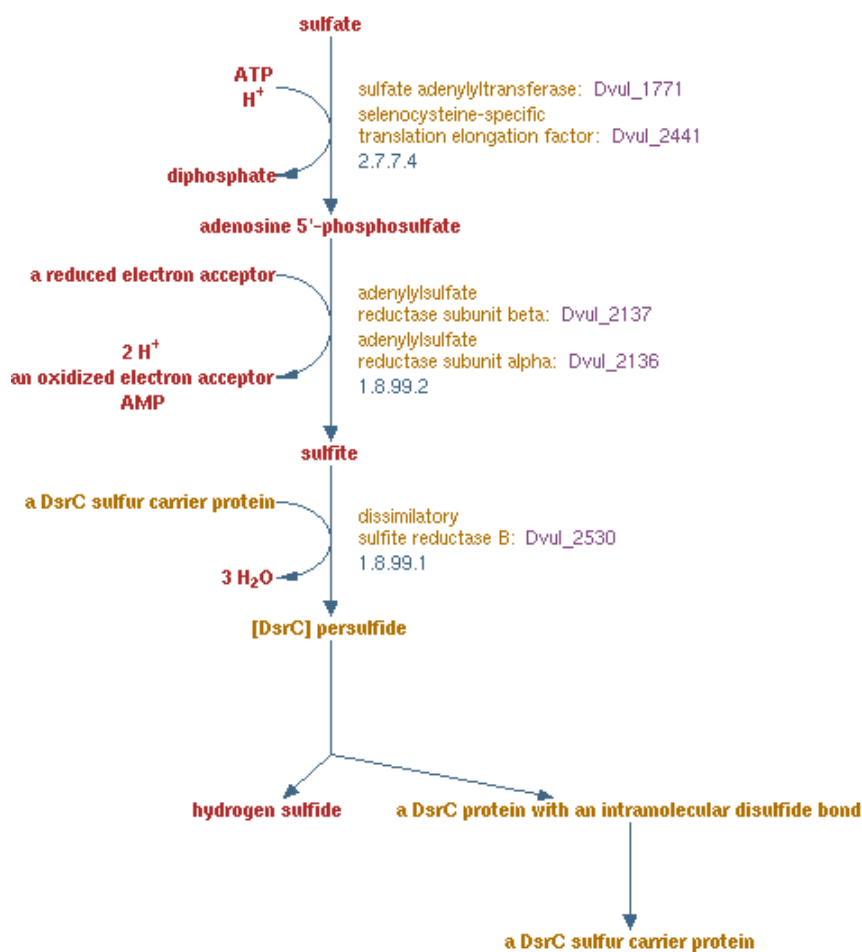


Figura 4: Via dissimilativa da redução do sulfato, proposta para *Desulfovibrio vulgaris* (retirado de MetaCyc)

As enzimas Dsr contêm um grupo prostético hemo e clusters [4Fe-4S] e estão presentes em todos os organismos capazes de reduzir sulfatos em sulfuretos em condições anaeróbicas (Stahl *et al*, 2002). A estrutura desta enzima apresenta dois polipéptidos distintos com conformação $\alpha_2\beta_2$, em que os genes que codificam as duas subunidades (dsrAB) encontram-se adjacentes nos genomas respectivos (Stahl *et al*, 2002). Diversos estudos demonstraram a presença de homólogos do gene dsrAB em,

pelo menos 5 grupos filogenéticos procariotas (*Wagner et al*, 1998) e um elevado estado de conservação deste gene em SRB e membros do domínio *Archaea* (*Dahl et al*, 1993). Estes dados sugerem que a enzima sulfito-reductase presente nas bactérias redutoras de sulfato é uma evolução de genes ancestrais (*Stahl et al*, 2002).

Apesar de as bactérias redutoras de sulfato serem classificadas como organismos anaeróbios obrigatórios, foram detetadas em ecossistemas aeróbios, tais como zonas de depósitos de cianobactérias ricos em oxigénio (*Krekeler et al*, 1997) e biofilmes que contêm oxigénio, formados em estações de tratamento de águas (*Ramsing et al*, 1993). Também no solo, membros do género *Desulfovibrio* encontram-se frequentemente na interfase entre a zona óxica e anóxica dos sedimentos (*Dilling et al*, 1990)

4. População bacteriana dos solos

Os microrganismos do solo desempenham portanto um papel fundamental na manutenção dos ciclos biogeoquímicos dos elementos, com uma grande variedade de taxa microbiana. Estima-se que existam $10^4 - 10^6$ diferentes microrganismos por grama de solo e um total de 10^{10} micróbios.g⁻¹ (*Gonzalez et al*, 2012). A análise de bibliotecas genómicas de 16S rRNA de comunidades bacterianas de diferentes solos, revelou uma afiliação dos genes de 16S rRNA com 32 *Phylums*. Os mais dominantes são os *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Cloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* e *Firmicutes*, contribuindo para um total de 92% das bibliotecas genómicas (*Janssen*, 2006).

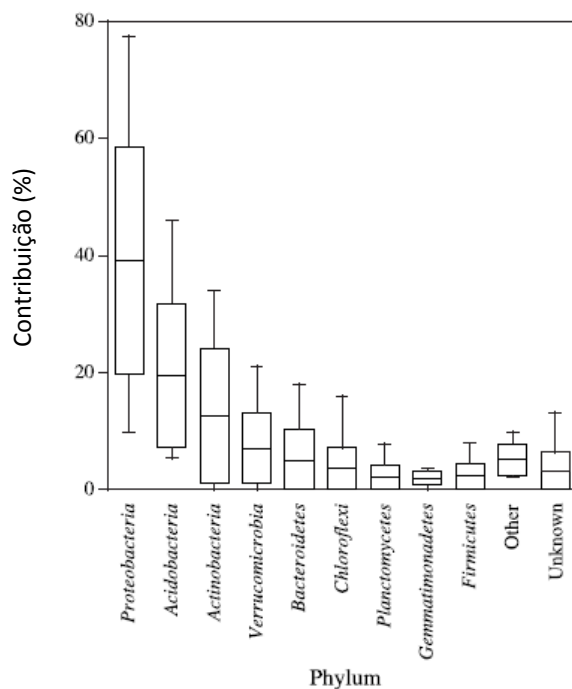


Figura 5: Contribuição de cada *Phylum* em bibliotecas 16S RNA de comunidades bacterianas de solos (2920 clones em 21 bibliotecas) (adaptado de Janssen, 2006)

Membros do *Phylum Proteobacteria*, que engloba bactérias gram-negativas anaeróbias obrigatórias ou facultativas e metabolismo quimioautotrófico ou heterotrófico, constituem cerca de 39% das bibliotecas. A maior parte pertencem às classes α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* e δ -*Proteobacteria* sendo as ζ -*Proteobacteria* as menos abundantes com uma contribuição média de 0.04% (Janssen, 2006). De entre estas classes é importante nomear as bactérias redutoras de sulfato como por exemplo *Desulfovibrio*, *Desulfobacter* (δ -*Proteobacteria*) e as bactérias oxidativas da amónia que incluem membros das β e γ -*Proteobacteria*.

Os géneros *Bacillus* e *Clostridium* do *Phylum Firmicutes*, o qual engloba bactérias gram-positivas (com as exceções das classes *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* e *Zymophilus*) anaeróbios (*Clostridia*) ou aeróbios obrigatórios ou facultativos (*Bacilli*), têm sido considerados pela comunidade científica como comuns na comunidade microbiana dos solos, mas as classes *Bacilli* e *Clostridia* do *Phylum Firmicutes*, que compreendem em conjunto 214 géneros, incluindo os géneros acima referidos, contribuem apenas com uma média de 2% para as bibliotecas (Janssen, 2006).

5. Presença de bactérias termofílicas do *Phylum Firmicutes* em solos temperados

Desde há muito, têm sido isolados microrganismos em ambientes considerados extremos nos quais pH, temperatura, concentração salina e outros parâmetros

ultrapassam os valores considerados como padrões para a proliferação da maioria dos seres vivos. Os microrganismos termofílicos têm sido isolados a partir de ambientes geotermicamente estáveis. Estes termofílicos não apenas resistem, mas também requerem altas temperaturas para sobreviver.

Os microrganismos termofílicos incluem quer termófilos moderados com temperaturas ótimas de crescimento entre 40 e 50°C como termófilos extremos capazes de crescer otimamente a temperaturas entre 65 e 85°C.

A distribuição biogeográfica de bactérias termofílicas tem sido alvo de muitos estudos (*Wiegel et al, 1979; Mutzel et al, 1996; Rahman et al, 2004*), sobretudo desde há cerca de uma década quando foram isoladas bactérias do género *Geobacillus*, com temperatura ótima de crescimento de 70°C em solos temperados frios (temperatura máxima de 15°C da Irlanda do Norte (*Marchant et al, 2002, 2008*)). Estes autores propuseram uma origem endémica destes isolados, pois foram obtidos de solos sem qualquer característica geotérmica e encontrados em número significativo em camadas subsuperficiais do solo. *Huber et al (2009,2010)* isolaram bactérias termofílicas anaeróbias em sedimentos marinhos recolhidos no Ártico e sugeriram que a sua presença neste ambiente hostil era devido à proximidade de reservatórios de petróleo no subsolo, que apresentam temperaturas mais elevadas.

A comunidade científica dividiu-se em duas linhas de pensamento acerca da presença de termofílicos em solos temperados. A ocorrência de isolados pode ser resultado do transporte e dispersão a curta ou longa distância através de via aérea ou aquática, de ecossistemas a maiores latitudes que apresentam elevadas temperaturas médias do solo (*Portillo et al, 2008; Huber et al, 2009; Marchant et al, 2010*). Esta teoria é apoiada por estudos de dispersão de partículas proveniente da África Sahariana no espaço Europeu ou da América do Norte. Outra corrente aponta para uma adaptação e especialização *in situ*, pelo menos nalguns casos, de modo a explorar nichos espaciais e temporais, como resultado de um longo processo evolutivo (*Portillo et al, 2012*). Essa adaptação seria independente, claro está, dos mecanismos de transporte iniciais dos termofílicos, sendo que presentemente estes representam taxa endémica e uma minoria estabelecida entre a comunidade bacteriana do solo temperado.

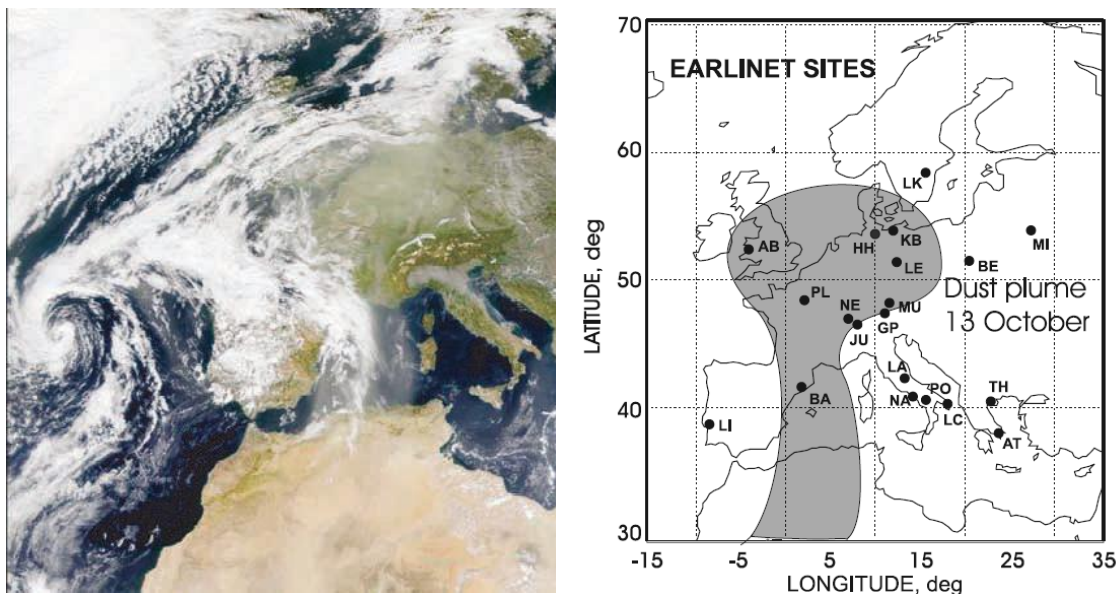


Figura 6 : Imagem de satélite mostrando um trajeto de transporte e dispersão de partículas com origem no Sahara no dia 13 de setembro e 2001, usando SeaWiFS e modelo de dispersão baseado nas estações EARLINET

Fonte: (http://visibleearth.nasa.gov/data/ev102/ev10286_S2001286.L1A_HROM_DUN_CAN.EuropeDust.png)
(http://www.earlinet.org/index.php?id=earlinet_homepage)

Os mecanismos de sobrevivência das bactérias termofílicas em solo temperado, em particular em solos nórdicos estão sob estudo; é de facto surpreendente que estes microrganismos possam sobreviver em solos onde são incapazes de crescer. Na literatura, encontra-se documentado que bactérias Gram-positivas termofílicas, que produzem endósporos (p.e. *Bacillales* e *Clostridia*), podem sobreviver por longos períodos de tempo, resistindo a condições extremas como a seca, radiação UV e frio. (Saffary et al, 2002). Contudo o trabalho de Marchant et al (2002 e 2008) bem como o de Portillo et al, (2012) confirmam que uma fração desses termofílicos está presente nos solos sob forma vegetativa. A possibilidade de um crescimento muito lento mas contínuo, foi sugerida por Marchant et al (2008). Assim, é possível que em ambientes terrestres temperados como aqueles presentes a latitudes mais próximas dos polos, um crescimento lento resulte num aumento de células viáveis. Contudo, em locais de maior temperatura, as bactérias termofílicas podem ter oportunidade de crescimento a taxas elevadas durante as estações mais quentes. Tal será o caso nos países do Sul da Europa e regiões de latitude similar onde a temperatura de camadas superficiais do solo pode facilmente ultrapassar os 40°C durante o verão (Santana et al, não publicado).

Apesar de representarem uma minoria dentro das comunidades bacterianas do solo, as bactérias termofílicas estão metabolicamente ativas. Num estudo recente de quantificação relativa do RNA ribossomal por RT-PCR (reação de transcrição reversa, seguida de amplificação por PCR) em tempo real, efetuado em amostras ambientais e visando os géneros *Brevibacillus*, *Geobacillus*, e *Ureibacillus* foram detetadas frações metabólicas de RNA bacteriano termofílico até 3.14% da comunidade bacteriana

(Portillo et al, 2012). Esta quantificação relativa foi também realizada em função da temperatura, revelando que a porção de RNA termofílico em comunidades bacterianas do solo depende da temperatura. Assim, estas bactérias termofílicas poderão desempenhar um papel metabólico ativo em alguns solos temperados, pelo menos, dentro de um período sazonal mais quente.

6. Papel e impacto das bactérias termofílicas em ambientes terrestres

Diversos estudos caracterizam o cultivo, isolamento e classificação de estirpes termofílicas, muitos focam o interesse em processos e produtos metabólicos passíveis de uso em processos industriais, graças por exemplo ao facto destes microrganismos possuírem enzimas termoestáveis (Wiegel et al, 1979; Mutzel et al, 1996; Rahman et al, 2004). Contudo, a recente descoberta de isolados termofílicos extremos em solos temperados revela uma lacuna no estudo do potencial metabólico destas bactérias.

Gonzalez e colaboradores (Portillo et al (2012); Santana et al (2012)) realizaram diversos estudos que permitiram concluir da capacidade de alguns membros do *Phylum Firmicutes*, em particular, dos géneros *Geobacillus*, *Brevibacillus* e *Ureibacillus*, na mineralização do azoto e do enxofre orgânicos. Inicialmente, foram efetuados enriquecimentos seletivos de sedimentos recolhidos em diferentes locais, em meio rico, por incubação a diferentes temperaturas (25°C e 50°C). A monitorização do amónio e sulfato produzidos ao longo do tempo revelou uma produção similar a superior do ião amónio e nitidamente superior de ião sulfato a 50°C. Foram isoladas bactérias mesofílicas e termofílicas a partir das amostras estudadas, respetivamente a 25°C e a 50°C e efetuadas culturas destes microrganismos pertencentes às comunidades microbianas sob estudo. Também aqui se verificou um aumento significativo da produção de sulfato; nalgumas estirpes, o conteúdo em sulfato libertado para o meio de cultura era dez vezes superior ao valor produzido pelos mesofílicos, o qual nunca foi superior ao valor máximo de 0.2 mM, este registado para um isolado do género *Paenibacillus*. Verificou-se também que as culturas de termofílicos suplementadas com tiosulfato ou não suplementadas apresentavam valores similares de concentração de sulfato solúvel. O tiosulfato é um intermediário da oxidação do enxofre inorgânico e a maioria das bactérias que a efetuam são capazes de oxidar o tiosulfato a sulfato (Madigan et al, 2003) Este resultado mostra que a produção de sulfato pelos isolados termofílicos é independente da oxidação de fontes de enxofre inorgânico. Pelo contrário, trata-se de uma oxidação dissimilativa do enxofre orgânico, já que os autores observaram uma proporcionalidade na concentração de sulfato com a disponibilidade de nutrientes orgânicos. Esta proporcionalidade também se observa relativamente à concentração de amónio no meio de cultura.

Estes resultados revestem-se de particular importância, dado que é validado o papel de bactérias termofílicas de solos temperados na mineralização de biomassa com consequente produção de sulfato e amónia; as bactérias termófilas serão capazes de explorar nichos espaciais e temporais para participar nos ciclos biogeoquímicos do azoto e enxofre, conforme indicado pelas setas na figura 1 (ciclo do azoto) e figura 2 (ciclo do enxofre). Fica também refutada a afirmação sobre o papel limitante das bactérias na mineralização do S-orgânico, afirmação baseada em estudos efetuados a temperatura moderada (20°C) (Ghani *et al*, 1993). A participação das bactérias termofílicas isoladas do solo na mineralização direta do S-orgânico define uma nova via no ciclo do enxofre – oxidação dissimilativa do enxofre – tal como apresentada na figura 2.

Atendendo a que tanto o azoto como, em particular, o enxofre orgânicos, constituem frações maioritárias do N e S em ambientes terrestres, e que ambos os elementos são nutrientes fundamentais para as plantas, as capacidades das bactérias termofílicas aqui descritas reveste-se da maior importância para o estabelecimento de modelos agrícolas mais produtivos e sustentáveis. Nestes futuros modelos é possível prever a possível aplicação destas bactérias como adjuvantes na fertilização em solos temperados, com carência em enxofre e/ou azoto (Santana *et al*, não publicado).

7. Efeito do cobre nas comunidades bacterianas

O cobre é um elemento que ocorre naturalmente em todos os ecossistemas. É considerado um micronutriente essencial para os seres vivos, participando nos processos de respiração (participa na cadeia transportadora de eletrões como parte da enzima citocromo c oxidase), fotossíntese e como cofactor da enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) (Madigan *et al*, 2003). No entanto, em elevadas concentrações, o cobre é extremamente tóxico; a toxicidade do cobre pode estar relacionada com a síntese de espécies reativas de oxigénio (ROS) e consequente *stress* celular (ver secção 8).

O cobre presente no solo encontra-se maioritariamente no estado oxidativo +2 (ião cúprico – Cu^{+2}), sendo esta forma mais solúvel e disponível para a biota em condições ácidas (Brady *et al*, 2000). Uma fração do ião encontra-se na camada subsuperficial do solo, associada através de processos de quelação com moléculas de húmus e constituindo uma reserva no solo (Brady *et al*, 2000). O fluxo deste elemento para os solos provém de várias fontes tais como emissão aérea e efluentes de indústrias metalúrgicas e eletrónicas, poluição atmosférica devido ao tráfico, efluentes de centrais de tratamento de água e esgotos, bem como às aplicações na agricultura como pesticida, fungicida e fertilizante. Devido ao uso contínuo de fertilizantes e fungicidas e a um elevado índice de bioacumulação, os solos agrícolas normalmente

apresentam valores elevados de concentrações de cobre, o que pode levar a uma fitotoxicidade nas plantas. A quantificação da concentração de cobre nos solos revelou valores compreendidos entre 0.3 e 15 mg/kg de solo (*Laboratório Químico Agrícola, 2006*). No entanto, já foram reportados valores que excedem 3000mg/kg em solos florestais com elevados valores de ácidos húmicos (*Kiikila et al, 2000*)

Lejoin et al (2010) avaliaram os potenciais efeitos de contaminações de cobre nas comunidades bacterianas. Para isso os autores recorreram a incubações de microcosmos (ecossistema artificial, usado para estimular e prever comportamentos de ecossistemas naturais em condições controladas) com distintos tipos e quantidades de matéria orgânica do solo. Em cada microcosmo, procedeu-se à adição de 250 mg de Cu por kg de solo, um valor elevado. Resultados da contagem e caracterização molecular bacteriana indicaram que o impacto do cobre na comunidade bacteriana presente dependia das propriedades bioquímicas da matéria orgânica presente. Em relação à diversidade bacteriana, a amplificação genómica do 16S rRNA bacteriano e subsequente comparação das sequências obtidas com as da base de dados no GenBank, revelou a ausência de diferenças significativas nas comunidades bacterianas resistentes ao cobre. A classe α -*Proteobacteria* era a mais representativa (53-57%), com o género *Methylobacterium* em destaque. Os *Firmicutes* representavam 38-43% da comunidade, sendo maioritariamente *Staphylococcus* (17-37%) e *Bacillus* (6-17%).

8. Cobre como bioelemento

O potencial redox do par $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ faz com que este elemento seja cofactor de mais de 30 enzimas, denominadas coproenzimas, em eucariotas superiores (*Karlin, 1993*). Dependendo do tipo de coordenação entre o ião e a proteína, o potencial redox pode variar entre 200 a 800 mV. Em ambientes anaeróbios, como na atmosfera primordial, o cobre encontrava-se na forma de Cu(I) em sulfuretos insolúveis e apenas biodisponível em condições ácidas, como fontes hidrotermais, onde a concentração de iões metálicos é elevada. O surgimento de oxigénio na atmosfera pela possível ação de cianobactérias há 3 biliões de anos, levou a que muitos organismos adquirissem um metabolismo oxidativo. As enzimas envolvidas em metabolismos anaeróbios tiveram de se adaptar à presença do di-oxigénio, com a procura de um metal com elevado potencial redox para lidar com as capacidades oxidativas do oxigénio. Assim o Cu(I) sofreu uma oxidação a Cu(II), um ião solúvel, aumentando a sua biodisponibilidade (*Soliz et al, 2010*)

A presença de metaloproteínas no domínio *Bacteria* é relevante. A análise bioinformática de sequências genómicas, quanto à presença de genes codificantes de metaloproteínas implicadas no transporte de cobre ou de coproenzimas envolvidas em processos metabólicos vários mostrou que o *Phylum Actinobacteria* (gram-positivos

comuns na comunidade microbiana de ecossistemas terrestres e aquáticos e participantes ativos no ciclo do carbono pela decomposição de matéria orgânica) apresenta uma taxa de $\approx 90\%$ de membros com coproproteínas (Ridge *et al*, 2008). No *Phylum Firmicutes* essa taxa decresce para 50%, com a particularidade de as espécies deste *Phylum* que apresentam coproproteínas, terem um genoma médio de 3 Mb, superior aos que não as possuem (2.3 Mb) (Solioz *et al*, 2010)

O *Phylum Cyanobacteria* constitui o único grupo bacteriano que necessita de importar iões de cobre para o espaço citoplasmático para a síntese de coproenzimas. Os restantes grupos apresentam coproenzimas situadas na membrana citoplasmática ou no periplasma, parecendo não requerer cobre intracelular (Solioz *et al*, 2010). Em particular, em bactérias Gram-positivas, as enzimas associadas à homeostase do cobre poderão ter como única função a expulsão do cobre (Solioz *et al*, 2010).

Até à presente data, todos os genomas sequenciados de microrganismos, mesmo os que não possuem qualquer proteína dependente de cobre, apresentam um ou vários mecanismos de defesa contra a toxicidade do cobre, através da presença de proteínas exportadoras de cobre. Uma explicação para este facto pode residir no processo evolutivo que ocorreu nos ecossistemas primordiais, onde elevadas temperaturas, acidez e conseqüentes altas concentrações de metais pesados dissolvidos causaram a prioridade evolutiva no desenvolvimento de mecanismos de defesa contra estes elementos tóxicos.

É frequente a referência à toxicidade do cobre como resultado da formação de espécies reativas de oxigénio, nomeadamente radicais hidroxílicos (OH), peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e superóxido (O₂⁻), através de uma reação de Fenton. Também a oxidação de sulfidril (R-SH) mediada pelo Cu (II) com a formação de dissulfureto (R-SS-R) foi avançada como causadora de *stress* celular. No entanto, vários dados experimentais incluindo a descoberta de que os níveis de cobre livre intracelular são mínimos ou mesmo não existentes (Solioz *et al*, 2010) levaram à consideração de outros mecanismos de toxicidade além do *stress* oxidativo. Dados recentes demonstram um novo mecanismo de toxicidade associado à destruição dos centros ferro-enxofre de enzimas, devido à deslocação do ferro pelo cobre (Macomber *et al*, 2009)

O sistema de homeostase do cobre mais estudado é o de *Enterococcus hirae*, bactéria gram-positiva da classe *Bacilli*. Esta possui o operão que contém os genes *copY*, *copZ*, *copA* e *copB*; *copA* e *copB* codificam ATPases transportadoras de cobre, *copY* codifica um repressor transcricional dependente do cobre, que desbloqueia a transcrição do operão em condições de excesso do ião. O gene *copZ* codifica uma molécula *chaperone* de cobre cuja função é guiar o transporte intracelular do ião. Este operão permite que a bactéria cresça em meios com concentrações de cobre até 8mM e em condições onde o cobre esteja limitado (Solioz *et al*, 2010). A via de homeostase

inicia-se com a entrada do cobre na célula via ATPase *copA*. O cobre citoplasmático em excesso liga-se ao *chaperone copZ* que pode doar o cobre excedente à ATPase *copB* ou ao repressor, o qual associado ao cobre se liberta da sequência promotora do operão, deste modo induzindo a transcrição dos genes a jusante. Em concentrações baixas de cobre, *copY* associa-se a átomos de zinco e permanece associado à sequência promotora, impedindo a transcrição do operão. (Solioz *et al*, 2003, 2010).

Em *Bacillus subtilis*, o gene *csor* localizado a montante do operão *copZA*, codifica um repressor transcripcional que sob elevado nível de cobre leva à desrepressão de *copZA*. As proteínas codificadas pelo operão são responsáveis pelo efluxo de cobre. Chillappagari *et al* (2009) reportaram a identificação de um gene – *ycnJ* com papel fundamental no metabolismo do cobre nesta bactéria. *ycnJ* é sobreexpresso em condições limitantes de cobre e um mutante de deleção neste gene tem um crescimento reduzido em condições limitantes deste elemento. Estes dados revelam o papel de YcnJ no transporte de cobre para a célula através da membrana citoplasmática (Cooksey *et al*, 1994). A montante de *ycnJ* encontra-se o gene *ycnK* que codifica um repressor transcripcional da síntese de YcnJ. Quando associado ao cobre, o repressor impede a transcrição de *ycnJ*. Este sistema permite regular a síntese do transportador mediante a disponibilidade celular de cobre (Figura 7)

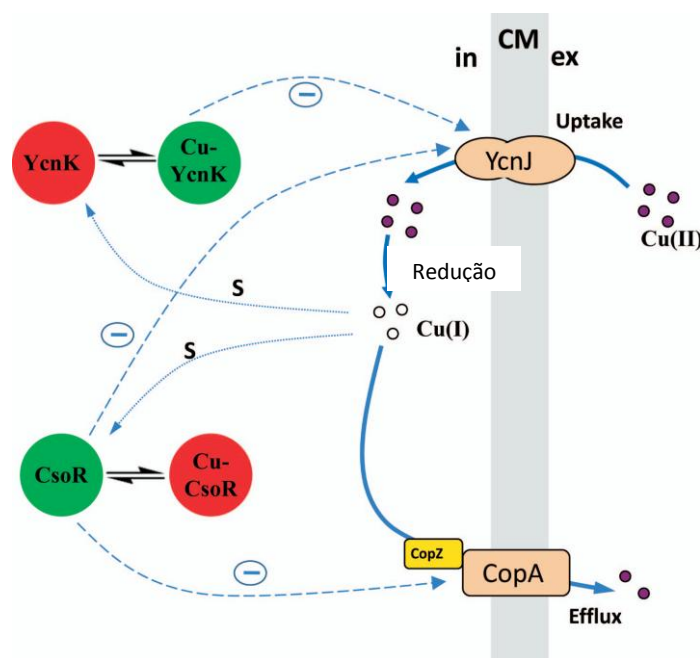


Figura 7: Modelo de homeostase do cobre para *Bacillus subtilis*. (adaptado de Chillappagari *et al*, 2009)

Os repressores transcripcionais CsoR e YcnK estão representados a verde quando ativos e a vermelho quando inativos.

Também em bactérias gram-negativas, da classe γ -*Proteobacterias* é possível encontrar diferentes mecanismos de resistência a um excesso de cobre intracelular. Estudos realizados em diversas estirpes fitopatogénicas de *Pseudomonas syringae* expostas a concentrações elevadas de cobre mostraram uma acumulação de iões Cu^{2+} no espaço periplasmático e membrana externa. Este sequestro de cobre é determinado por proteínas de ligação ao cobre, localizadas no espaço periplasmático (CopA e CopC) e na membrana (CopB e CopD) (Cooksey et al, 1991), e codificadas pelo operão de resistência ao cobre copABCD. Este operão está presente num plasmídeo, e é regulado pelos genes do operão copRS, também localizado no mesmo plasmídeo. A produção das proteínas Cop é feita por indução do cobre (Chillappagari et al, 2009).

Os sítios de ligação ao cobre da proteína periplasmática CopA mostram uma conservação com sítios de ligação ao cobre de proteínas homólogas presentes em procariotas gram-negativos como *E. coli*. Mas, apesar desta homologia os mecanismos de resistência ao excesso de cobre intracelular são distintos. A resistência ao cobre em *E.coli* faz-se por mecanismos de efluxo deste ião, enquanto que em *Pseudomonas syringae*, o cobre citosólico em excesso é sequestrado (Chillappagari et al, 2009).

Estudos reportando a resistência ao cobre por parte de membros da classe β -*proteobacteria* são praticamente inexistentes. Análises de polimorfismos de fragmentos de restrição terminais (T-RFLP) em sedimentos recolhidos num lago severamente contaminado com cobre identificaram isolados do género *Ralstonia* (Ordem *Burkholderiales*, família *Ralstoniaceae*). O mecanismo de resistência ao cobre foi identificado por microscopia eletrónica de varrimento, consistindo num mecanismo de sequestro deste elemento. A nível molecular, o mecanismo de resistência está associada à presença de um operão de resistência ao cobre copABCD, homólogo ao presente em bactérias γ -*Proteobacterias*, como a já descrita *Pseudomonas syringae* (Konstantinidis et al, 2003).

9. Métodos moleculares na análise da dinâmica de comunidades bacterianas

Devido à sua importância, diversas técnicas moleculares foram utilizadas para o estudo de comunidades microbianas nos seus ecossistemas. As técnicas ditas “clássicas” consistem no uso de sondas, por exemplo oligonucleótidos específicos usados para detetar por hibridação um dado grupo microbiano (Ravenschlag et al, 2000). Outras utilizam como base a reação de PCR. Por exemplo, a técnica ARDRA (do inglês *Amplified rDNA restriction analysis*) consiste numa amplificação com primers específicos para as regiões conservadas do gene 16S rRNA, seguida do uso de endonucleases de restrição que irão reconhecer sítios específicos no genoma. Os

fragmentos obtidos após clivagem são representativos das espécies analisadas (*Sklarz et al, 2009*)

A eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE) é uma técnica molecular de *fingerprinting* muito utilizada na caracterização estrutural e na análise da dinâmica de comunidades microbianas. De facto, este método permite demonstrar a diversidade e alterações de populações, registando diferenças não detetáveis por outros métodos de *fingerprinting*. O uso desta técnica apresenta algumas limitações, por exemplo, requer uma concentração significativa de DNA, obrigando a uma prévia amplificação por PCR (*Green, 2005*), o que significa que todos os problemas que podem estar associados a esta técnica, como a conceção de *primers*, a definição de condições ótimas de amplificação, etc., devem ser considerados.

O princípio básico desta técnica consiste na separação dos fragmentos de DNA de cadeia dupla com tamanho idêntico mas diferentes sequências nucleotídicas. A análise electroforética destes produtos de PCR é feita em gel de acrilamida contendo um gradiente de um agente desnaturante. Os fragmentos de cadeia dupla de DNA ricos em guanina e citosina (G-C) apresentam maior estabilidade devido às três ligações de hidrogénio por par. Assim a cadeia dupla dos fragmentos só irá dissociar-se quando atingir uma maior concentração de desnaturante. As moléculas de DNA de cadeia dupla apresentam assim uma maior distância de migração no gel de acrilamida, enquanto as moléculas de DNA desnaturado migram a menor velocidade ou mesmo deixam de migrar (*Green, 2005*).

O uso do DGGE como ferramenta para análise de comunidades microbianas é complementado pela análise de sequências nucleotídicas para identificação de componentes de interesse na população. Uma das desvantagens deste método na análise de comunidades bacterianas consiste na resolução dos géis utilizados: múltiplas sequências podem apresentar comigração; também podem obter-se múltiplas bandas correspondentes ao mesmo microrganismo (*Green, 2005*). Isto acontece frequentemente quando são usados os genes 16SrRNA, dada a existência nos procariontes de operões com múltiplas sequências heterogéneas desses genes. Assim, quando se recorre à excisão de bandas e após reamplificação se verifica que constituem uma mistura de sequências, o produto dessa reamplificação é triado num novo DGGE. Desse modo, é possível verificar qual subproduto de PCR reflete a banda excisada. Alternativamente, o produto de PCR pode ser usado de imediato para a obtenção de clones, os quais são triados num novo DGGE, em paralelo com o PCR da amostra ambiental (*Green, 2005*).

Objetivos gerais

- Estudo da diversidade microbiológica em solo agrícola temperado, sob efeito de diferentes temperaturas e tratamento com cobre, com especial atenção à proporção de bactérias do *Phylum Firmicutes* e *Proteobacteria*.
- Relação entre essa diversidade microbiológica e fisiologia microbiana, com relevo para a produção microbiana de amónia e sulfato.
- Isolamento de bactérias termofílicas, produtoras de sulfato e resistentes ao cobre.

Objetivos específicos

- Uso de métodos bioquímicos para determinação do conteúdo de vários elementos em amostras de solo diretas e enriquecidas.
- Aplicação de técnicas moleculares de “fingerprinting” (DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) para o estudo da diversidade e posterior sequenciação.
- Utilização de métodos clássicos de microbiologia para isolamento de bactérias resistentes ao cobre.

Metodologia

1. Recolha de amostras do solo e caracterização do local de amostragem

As amostras de solo foram recolhidas num local designado setor 1, de um olival de variedade cobrançosa, pertença da Fundação Eugénio de Almeida, freguesia de São Manços, concelho de Évora. Nesse olival, a sementeira é feita por enrelvamento linha a linha, o que resulta numa menor erosão do solo.

O solo é pobre em matéria orgânica e sob tratamento fitossanitário com Cuprital® (oxicloreto de cobre, $\text{Cl}_2\text{Cu}_4\text{H}_6\text{O}_6$) com recurso a atomizador com cone de proteção, tratamento executado aproximadamente trinta dias antes da recolha das amostras de solo. Este apresentava-se húmido devido à forte pluviosidade e baixas temperaturas características da época em que foi efetuada a recolha (novembro de 2011)

A recolha das amostras foi efetuada numa camada superficial do solo, onde é expectável a presença de grande mistura mineral com húmus e foi executada de modo a minimizar o fator humano, com uso de luvas e com limpeza do material de recolha com etanol, efetuada entre cada amostragem. As amostras recolhidas foram colocadas em tubos de *Falcon* estéreis e devidamente identificados, transportados em gelo, e também recolhidas para sacos, devidamente identificados, para posterior análise dos parâmetros físico-químicos no laboratório Químico Agrícola da Universidade de Évora.

Foram recolhidas 4 amostras compostas, constituídas por 3 furos paralelos e foram medidas a profundidade e temperatura do solo no ponto de recolha. As amostras foram designadas: T-DC-debaixo de copa com solo tratado-, T-EC -entre copas com solo tratado-NT-DC-debaixo de copas com solo não tratado- e NT-EC -entre copas com solo não tratado. As amostras foram colhidas entre 4,0-7,5cm de profundidade; as temperaturas no sítio da recolha foram distintas para as diferentes amostras sendo a mínima de 7,6°C e a máxima de 13,2°C (tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros registados na recolha de amostras

Amostras	T-DC			T-EC			NT-DC			NT-EC		
	Furos #	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II
Profundidade – recolha (cm)	4.5 - 5.0	4.5 - 7.0	4.0 - 7.0	4.5 - 7.5	4.5 - 6.0	4.0 - 6.0	5.0 - 6.5	4.5 - 7.5	5.0 - 6.0	4.0 - 6.0	3.5 - 5.5	4.0 - 5.5
Temperatura (°C)	7.6	7.9	7.8	9.3	9.1	9.3	13.2	13.2	13.1	9.6	10.0	10.6



Figura 8: Fotografia do local de amostragem (Google Earth, 2012)

A): T-DC-debaixo de copa com solo tratado; B) T-EC -entre copas com solo tratado; C) NT-DC-debaixo de copas com solo não tratado; D) NT-EC -entre copas com solo não tratado

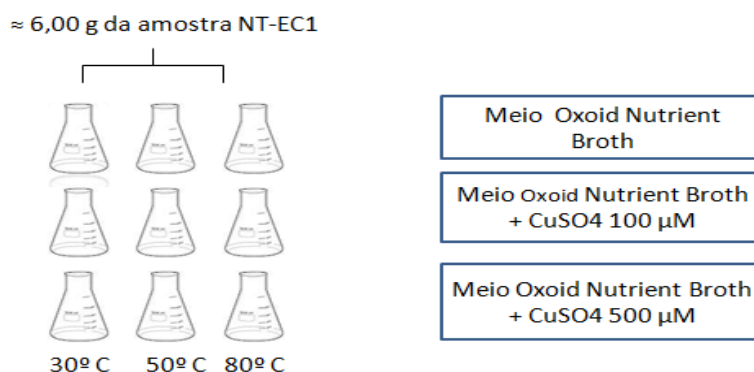
2. Enriquecimento seletivo das amostras em diferentes condições

Foram preparados previamente nove meios de cultura NB (Nutrient Brot Oxoid), em erlenmeyers de 100 mL, divididos em três séries: a primeira consiste em 15 mL de meio (controlo); a segunda em 15 mL de meio ao qual foi adicionado sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a uma concentração final de 100 μM . A terceira

série consiste em 15 mL de meio a que foi adicionado sulfato de cobre com uma concentração final de 500 µM. Procedeu-se a uma aferição do valor de pH dos meios.

A cada meio de cultura previamente esterilizado, foi adicionado 6,00 g da amostra composta NT-EC1 (entre copas com solo não tratado) em ambiente estéril, amostra esta que revelou menor conteúdo em cobre.

Os meios foram incubados cerca de 24 horas a 180 rpm e duas temperaturas diferentes: 30°C; 50°C durante cerca de 24 horas. Um dos erlenmeyers inicialmente a 50°C foi posteriormente transferido a 80°C durante cerca de 7 horas, sem agitação, conforme indicado no esquema 1:



Esquema 1: Enriquecimento seletivo das amostras a diferentes condições de temperatura e concentração de sulfato de cobre

A escolha destes valores de temperatura baseou-se nas temperaturas de crescimento de bactérias mesofílicas e termofílicas, conforme descrito na literatura (Wiegel *et al*, 1979; Mutzel *et al*, 1996; Rahman *et al*, 2004).

A par da recolha de amostras, para as quantificações descritas nas secções 2.1 e 2.2. e para extração de DNA (secção 3.), foram realizadas diluições seriadas (diluições decimais sucessivas) em meio NB a partir destes enriquecimentos. As diluições 10^{-6} e 10^{-8} foram plaqueadas em NBA (Nutrient Broth com 15% p/v Agar) por dispersão de 50 e 100 µL e as placas incubadas a 50°C durante 24 horas. Após este período, foram calculadas as unidades formadoras de colónias (*cfu/mL*) para cada enriquecimento, conforme equação 1.

$$cfu = n^{\circ}colónias \times \frac{1}{diluição} \times \frac{1}{volume\ inóculo}$$

Equação 1: Cálculo de unidades formadoras de colónias

2.1. Quantificação de amônio presente nos enriquecimentos

Para a quantificação do amônio presente em cada enriquecimento, utilizou-se o protocolo descrito por *Kartal et al* (2000), com ligeiras modificações. Este protocolo tem como base a interação entre *o*-fthalaldeído (OPA) e β -mercaptoetanol, dois dos constituintes do reagente utilizado (reagente A) com formação de *o*-fthalaldeído β -mercaptoetanol (OPAME), um agente fluorogénico. Este agente reage com aminas primárias quando excitado a 420 nm. Preparou-se previamente 50 mL de reagente A, pela adição de 5 mL de etanol (Aga®) e 45 mL de tampão fosfato a 400 mM, a 0.249 g de OPA (Fluka®). 50 μ L de β -mercaptoetanol são adicionados ao reagente A no momento da quantificação.

Para a curva de calibração, prepararam-se soluções de concentração conhecida de cloreto de amônio em água destilada. Após a adição de 40 μ L de cada solução de calibração e 40 μ L de água destilada (branco) a 760 μ L de reagente A, deixou-se repousar cada mistura à temperatura ambiente durante 20 min. As soluções homogenizadas foram transferidas em seguida para uma placa de microtitração e leu-se a absorvância a 415nm com uso do leitor de microplacas (Bio-Rad Model 680). As soluções foram lidas em triplicado.

Para a leitura das amostras, procedeu-se de início a uma centrifugação a 12 000 g durante 5 min de 1 mL de cada meio enriquecido e recolheu-se o sobrenadante, o qual foi adicionado ao Reagente A, como acima descrito; a mistura obtida foi tratada de igual modo. Foram usados como branco os meios respetivos, não inoculados, submetidos ao mesmo procedimento. A absorvância foi lida a 415nm no leitor de microplacas (Bio-Rad Model 680). Cada amostra recolhida foi lida em triplicado.

A análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios de quantificação de amônio foi realizada utilizando análises ANOVA no programa MedCalc versão 12.3.0.

2.2. Quantificação do sulfato presente nos enriquecimentos

Na determinação da concentração do sulfato presente em cada enriquecimento, utilizou-se o ensaio turbidimétrico descrito por *Kolmet et al* (2000). Este ensaio turbidimétrico é baseado na precipitação de iões SO_4^{2-} com iões Ba^{2+} após a adição de cloreto de bário; essa precipitação é seguida por espectrofotometria da suspensão resultante.

Para a curva de calibração, prepararam-se soluções de concentração conhecida de sulfato de potássio em água MilliQ. Após a adição de 1 mL de cada solução de calibração a 1 mL de reagente condicionante, a mistura foi homogeneizada. De seguida, 60 mg de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck®) foram adicionados. As misturas foram agitadas no vortex durante 30 segundos. Após esta agitação, foram transferidas de imediato para *cuvettes* e foram feitas leituras a 319nm, com recurso ao espectrofotómetro

NanoDrop[®] 2000 *c* (ThermoScientific, EUA). Um mL de água MilliQ, tratado do mesmo modo, foi usado como branco.

Para a determinação da concentração de sulfato nas amostras, foi feita uma centrifugação prévia a 12 000 *g*, durante 5 min de 1 mL de cada meio enriquecido. Ao sobrenadante recolhido, foram adicionados 1 mL de reagente condicionante e procedeu-se como para as soluções de calibração. Foram utilizados como branco, os meios de enriquecimento não inoculados, tratados do mesmo modo.

A análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios de quantificação de amónio foi realizada utilizando análises ANOVA no programa MedCalc versão 12.3.0.

3. Isolamento bacteriano e caracterização fenotípica, fisiológica e molecular.

O crescimento de populações microbianas em meios de cultura no laboratório e posterior isolamento é uma das ferramentas mais utilizadas em Microbiologia e permite a obtenção de culturas puras. O isolamento promove a separação de um microrganismo a partir de culturas com populações mistas. As culturas puras podem ser obtidas através de vários métodos, nos quais se visa o desenvolvimento de uma população a partir de uma colónia formada a partir de uma única célula, e é importante fazer subculturas a partir de uma nova colónia isolada da cultura precedente, para certificação da pureza das culturas.

Foram plaqueados 100µL em meio NBA, em duplicado, provenientes de diluições seriadas (ver secção 2) 10^{-4} a 10^{-7} , efetuadas a partir do enriquecimento em meio NB a 80°C contendo 500 µM de cobre. Após incubação das placas a 50°C, durante cerca de 24 horas, foram recolhidas colónias isoladas com distintas morfologias, tendo sido cada uma purificada em placa NBA, pela técnica do riscado. O objetivo do riscado é o de produzir colónias bem separadas umas das outras. No riscado é usada uma ansa, que é flamejada antes da mudança de cada direção de arrastamento da colónia no meio, o que causa uma diminuição do número de células arrastadas ao longo do riscado, e a formação de colónias isoladas no final deste. Após a execução do riscado, as placas de Petri foram incubadas a 50°C, durante cerca de 24 horas.

Após esta última incubação, cada uma das colónias isoladas foi utilizada como inóculo para crescimento em meio NB, a 50°C, 180 rpm e posterior congelamento de alíquotas a -80°C, mediante a adição de glicerol a 15% (v/v). Amostras do crescimento de um dos isolados obtidos foram usadas para análise morfológica por observação ao microscópio ótico e para identificação pela coloração de Gram (ver secção 3. 1.).

3.1. Análise fenotípica

Para observação de microrganismos pode recorrer-se a preparações a fresco – por exemplo para observar a mobilidade e o tipo de locomoção. Há, porém, objetivos que tornam conveniente a coloração das preparações, como por exemplo na diferenciação de organismos que reagem de modo diferente ao mesmo corante (colorações diferenciais) e/ou na observação de estruturas particulares (por exemplo, material nucleico, esporos, cápsulas, etc.)

A coloração de Gram é uma coloração diferencial específica para bactérias. Quando são usados certos corantes básicos, as bactérias Gram-negativas podem ser facilmente descoradas com solventes orgânicos (por exemplo, etanol, acetona), enquanto as Gram-positivas resistem a esta descoloração, retendo o corante. A capacidade das células reterem ou perderem o corante reflete diferenças na estrutura fundamental da parede celular, nomeadamente ao nível da camada de peptidoglicano. A solução de cristal violeta penetra nas células bacterianas mas, ligada á solução de lugol, apenas consegue sair através das células Gram-negativas, que possuem uma parede mais simples e frágil, ficando retida nas Gram-positivas, que adquirem a cor do corante. A resposta à coloração de Gram é uma característica taxonómica importante, usada numa fase inicial da identificação das bactérias.

A coloração de *Gram* foi usada no isolado obtido tanto como meio fenotípico de identificação como teste complementar da pureza do isolado. Após preparação de um esfregaço em lâmina de observação microscópica e fixação das células pelo calor, estas foram coradas com uma solução de Cristal violeta (Merck®), cerca de um minuto, e foi adicionada uma solução mordente de Lugol (Merck®), também durante um minuto. Seguidamente, as células foram lavadas com uma solução de descoloração, basicamente constituída por etanol, durante cerca de trinta segundos. Entre a adição de cada reagente, foi efetuada uma breve lavagem com água destilada. Para uma melhor visualização das bactérias Gram-negativas, foi depois adicionado durante 5 minutos, um corante de contraste, a solução de Safranina (Merck®), que apresenta uma coloração rosada.

A análise morfológica do isolado e identificação *Gram*, foram realizadas recorrendo a um Microscópio Ótico *Olympus BX41* e Software *Olympus Soft Imaging GelTM*.

3.2. Análise fisiológica

3.2.1 Culturas do isolado

O crescimento do isolado em meio NB a 50°C, com e sem adição de sulfato de cobre a 500 µM, foi monitorizado pela medição da densidade ótica a 600 nm com o espectrofotómetro *Beckman DU530*. Procedeu-se à quantificação do sulfato produzido em meio NB com 500 µM de cobre, tal como descrito na secção 2.2.

Para contabilizar os esporos formados em cultura, foram retiradas alíquotas e aquecidas a 100°C durante 10'. Foram efetuadas diluições seriadas em meio NB e 50 µL de cada diluição foram plaqueados em meio NBA; as placas foram retiradas ca 24h depois para estimativa do número de esporos germinados

3.2.2 Quantificação da Proteína celular total do isolado

O ensaio de quantificação de proteína baseou-se no método do Coomassie, também conhecido por Bradford (*Bradford et al, 1976*). Este ensaio tem como base a alteração da absorvância do reagente azul brilhante de Coomassie G-250 de 465 nm para 595 nm, devido à formação de um complexo aniônico quando o corante se liga a resíduos de proteína. Este método é sensível, com um nível de quantificação mínimo de 1µg de proteína. O método sofre interferências na presença de detergentes, mas não é afetado pela presença de agentes redutores e de íons metálicos.

Foi feita uma curva de calibração, com soluções de concentração conhecida de soro de albumina bovina (BSA, Promega®) em água destilada. A 250µL de cada solução de calibração adicionou-se, num microtubo, 250µL de hidróxido de sódio 1M. A solução foi homogeneizada e incubada a 99°C, durante 10 minutos. Após arrefecimento da solução à temperatura ambiente durante 15 minutos, esta foi neutralizada pela adição de 50µL de ácido clorídrico 6M. Foram de seguida adicionados 500µL de reagente de Bradford (Sigma®). A mistura foi agitada no vortex e deixada à temperatura ambiente durante 15 minutos. Por fim, a absorvância foi lida a um comprimento de onda de 595nm, contra água destilada, tratada de igual modo. Para a leitura da absorvância foi utilizado o espectrofotómetro *Beckman DU530*.

As amostras a quantificar foram retiradas do crescimento do isolado em meio nutritivo e centrifugadas a 12 000 *g*, durante 3 minutos; o sobrenadante foi usado para quantificar o sulfato produzido, enquanto o *pellet* é ressuscitado em água destilada, previamente esterilizada, e submetido a um tratamento de lise com hidróxido de sódio e subsequente neutralização com ácido clorídrico, como descrito no parágrafo anterior. Foram então adicionados 500µL de reagente de Bradford a 500µL do lisado e feita a leitura da absorvância a 595nm como acima mencionado.

3.3. Análise molecular

Para obter uma afiliação taxonómica de isolados, recorre-se a uma amplificação por PCR do gene 16S rRNA. A técnica de PCR – “Polymerase chain reaction” é muito usada em Biologia Molecular, pela sua praticabilidade. Consiste na capacidade de desnaturação da cadeia dupla da molécula de DNA, seguida de uma renaturação das cadeias complementares, amplificadas pela ação de uma polimerase termoestável. São efetuados vários ciclos de desnaturação, amplificação e renaturação, pelo uso de diferentes temperaturas em cada ciclo. A técnica é realizada *in vitro*, no interior de tubos adequados.

Cada tubo contém uma solução aquosa com a amostra de DNA a amplificar, uma mistura de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs mix), cloreto de magnésio, pois o Mg^{2+} atua com cofator da polimerase, tampão PCR para estabilizar o pH da reação, uma solução de dois oligonucleótidos iniciadores (também denominados primers) de 18-30 pb e complementares à extremidade 3' de cada cadeia da sequência alvo e um dado volume de enzima. De salientar que em alguns tampões comerciais, o $MgCl_2$ já se encontra presente.

O processo de amplificação inicia-se então com a etapa de desnaturação onde ocorre uma separação da cadeia dupla do DNA. As cadeias simples resultantes constituem cadeias molde onde se associam os *primers* por emparelhamento (*annealing*). O emparelhamento ocorre a uma temperatura condicionada pela temperatura de dissociação dos *primers* à cadeia molde. A última etapa corresponde ao alongamento das cadeias complementares por ação da enzima DNA polimerase que adiciona dNTP's complementares à cadeia molde. A temperatura desta última etapa corresponde à temperatura de máxima atividade da polimerase. Cada ciclo do processo permite duplicar a concentração de DNA.

Para a obtenção da sequência parcial do gene 16S rRNA do isolado, procedeu-se de início à lise celular de uma única colônia. Com um palito estéril retirou-se uma porção de uma colônia, a qual foi colocada num microtubo com 50 μ L de água MilliQ. O microtubo foi colocado a 60°C, durante 15 minutos, depois a -20°C, durante cerca de 45 minutos e novamente a 60°C, durante 15 minutos. Este choque térmico em água permite a lise celular e libertação do DNA molde a ser amplificado.

Após arrefecimento à temperatura ambiente, uma alíquota do lisado foi utilizada para a reação de PCR. Os *primers* usados foram 341F (5'-CC TAC GGG AGG CAG CAG-3') e o 907R (5' -C CGT CAA TTC MTT TGA GTT T-3') (*Muyzer, 1993*). Estes são *primers* universais bacterianos que têm como alvo de hibridação regiões conservadas do gene 16S rRNA, mas permitem a amplificação de variantes informativas na atribuição a um dado grupo taxonómico. As letras F e R referem-se aos termos em inglês *Forward* e *Reverse*, respetivamente. O *primer forward*, encontra-se próximo da extremidade 5' do DNA e tem sequência igual à da cadeia modelo, o *primer reverse* encontra-se próximo da extremidade 3' e tem sequência complementar e reversa à da cadeia modelo. A amplificação foi efetuada num volume total de 50 μ L, contendo Tampão de PCR 1X, 0.2mM de dNTP's, 0.4 μ M de cada *primer*, 0.25 μ L de enzima Fidelity DNA Polimerase 5U/ μ L (USB®, EUA) e 5 μ L do lisado.

A reação de PCR foi realizada no termociclador (Bio-Rad MyCycler) e iniciou-se com uma etapa de desnaturação a 95°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos, cada um com três etapas consecutivas: desnaturação a 95°C, durante 30 segundos, *annealing* a 54°C, durante 30 segundos e extensão a 68°C, durante 50 segundos. O último ciclo foi seguido de uma etapa de extensão adicional a 68°C, durante 5 minutos.

Para verificar o tamanho do produto amplificado (ca 600 pb) e para estimar a sua concentração, foram depositados 5µL do mesmo num gel de agarose (2% p/v em tampão de corrida TAE 1x). Foi aplicado num dos poços do gel 5µL de marcador de peso molecular de DNA *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen®) a 100ng/µL. A deposição em gel necessita da adição prévia no DNA a visualizar de um tampão de depósito (2µL), o qual contém um componente viscoso, neste caso o glicerol, e um corante, neste caso o azul de bromofenol, permitindo, respetivamente, a fácil deposição e a visualização da migração em gel; a migração durou cerca de duas horas a uma diferença de potencial de 70 volts. Após a migração, o gel foi colocado numa tina com brometo de etídio (0.5mg/L) durante 10 minutos. Este agente intercalante do DNA é usado com frequência para a visualização de ácidos nucleicos, devido à sua fluorescência quando exposto à luz ultravioleta. Assim, o gel foi retirado da tina e colocado num transiluminador sob luz UV e fotografado com o Software *Kodak Gel Logic 200* (Kodak, EUA).

O fragmento amplificado foi cortado do gel com uma lâmina de bisturi e purificado com o kit *DNA Clean & Concentration™* (Zymo Research®, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído e purificado foi posteriormente sequenciado, com uso dos *primers* acima referidos, nos Laboratórios da Empresa MacroGen Inc.®.

4. Extração de DNA total e quantificação

O sucesso da técnica de DGGE, como outras de “fingerprinting”, depende da obtenção de ácidos nucleicos íntegros, livres de nucleases e de inibidores da reação de PCR. Ora, o solo inclui, entre muitas outras enzimas, nucleases libertadas pelos microrganismos em proliferação ou pela decomposição de animais e plantas após a morte. Estas enzimas são resistentes à inativação e encontram-se adsorvidas às partículas de argila, mantendo a sua atividade.

Na camada superficial do solo é comum existir húmus, um material amorfo, de composição variada e muito higroscópico. Os coloides húmicos têm capacidade de permuta catiónica, e têm poder tamponizante e portanto existe uma certa semelhança entre as propriedades do húmus e as da argila. Pode também ocorrer a formação de complexos argilo-húmicos, estando as partículas de argila recobertas por materiais húmicos. Estes complexos de matéria orgânica contêm inibidores da reação de PCR, de difícil separação durante o processo de extração de ácidos nucleicos (*Correia*, 1986).

A extração de DNA do solo é pois um processo delicado, devido à presença de húmus no solo. Geralmente é iniciado com uma homogeneização do material recolhido e lise celular por métodos mecânicos e químicos. A adição de hidróxido de sódio durante a lise é usada em alguns casos, já que soluções alcalinas extraem os

ácidos húmicos do solo (*Benites et al*, 2003). Hoje em dia, encontram-se comercialmente disponíveis vários *kits* de extração do DNA do solo que incluem reagentes para uma lise celular eficaz com proteção do ácido nucleico e a purificação deste com recurso a algum tipo de gel ou coluna de sílica. A sílica liga-se inicialmente a materiais húmicos que podem ser subsequentemente eluídos da matriz.

O kit de isolamento de DNA *PowerSoil*[®] (Mo Bio Laboratories Inc, EUA) foi utilizado para a extração de DNA a partir das amostras de solo e dos enriquecimentos, Este kit é destinado a ser usado em amostras de solo contendo alto teor de ácido húmico, incluindo vários tipos de solos críticos, como a compostagem, sedimentos e excremento. De acordo com as instruções do protocolo fornecido, adicionou-se cerca de 0.25g de cada amostra de solo ou do *pellet* recolhido por centrifugação dos enriquecimentos a 12 000 *g*, durante 5 minutos, para um tubo fornecido *PowerBead*. De seguida, procedeu-se a uma suave homogeneização e à lise celular. Após centrifugação a 10 000 *g* durante 30 segundos, o sobrenadante foi sujeito a vários procedimentos para eliminar materiais húmicos e outros contaminantes orgânicos e inorgânicos. Por fim, a concentração salina do sobrenadante é ajustada para a ligação do DNA a uma membrana de sílica e segue-se uma lavagem com etanol afim de remover o sal residual e outros contaminantes. No final desta etapa, procede-se à eluição do DNA com uma solução apropriada, que carece de sal.

Após a extração, foi realizada uma análise electroforética para concluir da integridade do DNA extraído. Fez-se um gel de agarose de 0.8% em tampão de corrida TAE 1x. Foram aplicados 3 μ L de marcador molecular 1Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen[®]; 100ng/ μ L) num dos poços e 5 μ L de DNA genómico extraído nos restantes. As condições de corrida foram 80 volts, durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida, o gel foi colocado numa tina com brometo de etídio (0.5 mg/L) durante 10 minutos, visualizado no transiluminador e fotografado com o *software Kodak Gel Logic 200* (Kodak, EUA).

Para a determinação da concentração do DNA extraído, utilizou-se o espectrofotómetro (*ThermoScientific NanoDrop*[®] 2000 *c*) através da leitura da absorvância a 260 nm. O sistema fornece também o valor da razão A_{260}/A_{280} , útil para verificar a contaminação com proteínas típicas do solo, uma vez que as proteínas também absorvem a 280nm.

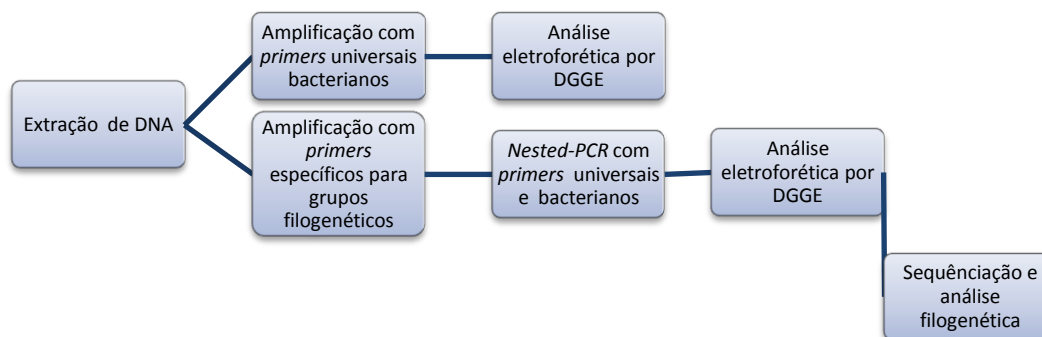
5. PCR-DGGE

5.1. Amplificação do gene 16S rRNA

Para a amplificação do gene 16S rRNA das amostras diretas e enriquecimentos seletivos, foram realizadas duas estratégias distintas: na primeira usaram-se *primers* universais bacterianos, para avaliação da diversidade global da comunidade. Na

segunda, realizou-se uma estratégia de “*nested PCR*” (ver esquema 2), na qual são inicialmente utilizados *primers* concebidos para a amplificação do 16S rDNA de um determinado grupo taxonómico, seguida de uma reação de PCR sobre o produto amplificado obtido, com uso de *primers* capazes de permitir a amplificação de uma região interna de qualquer fragmento de DNA obtido na etapa precedente. O último PCR realizado, nesta estratégia permite obter fragmentos de dimensões adequadas para efetuar o DGGE, já que os fragmentos a colocar em gel DGGE não devem ultrapassar 600 pb.

Os grupos taxonómicos escolhidos foram o *Phylum Firmicutes*, que contém as bactérias termofílicas produtoras de sulfato e amónio, a classe *β-Proteobacteria* que contém as bactérias oxidativas de amónia. Por fim, escolhemos as *δ-Proteobacteria* que incluem as bactérias sulfato-redutoras. Foram utilizados *primers* já estabelecidos para cada grupo, e reportados na bibliografia (Muhling et al, 2008). No entanto, não foram encontrados *primers* para as *δ-Proteobacteria*, apenas para grupos específicos de sulfato-redutoras dentro desta classe (Daly et al, 2000; Dar et al, 2005; Muyzer, 2005) Por isso, escolhemos *primers* descritos como específicos para sulfato-redutoras dos géneros *Desulfovibrio* e *Desulfomicrobium*, estes frequentemente encontrados em solos temperados. (Postgate, 1984).



Esquema 2. Esquema das metodologias utilizadas, de amplificação direta e por *nested-PCR*.

5.2. Primers e reações de PCR

Para a amplificação do gene 16S rRNA a partir das amostras do solo e enriquecimentos, na abordagem direta, foram escolhidos os *primers* universais *foward*, 341F GC (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG -3') e o *primer reverse* 518 R (5' -ATT ACC GCG GCT GCT GG -3') (Muyzer et al, 1993). A extensão de 40 bases, rica em G-C no *primer forward*, confere maior estabilidade aos fragmentos amplificados, o que é crucial para evitar

que as duas cadeias de DNA do produto de PCR se dissociem completamente durante a eletroforese. As reações foram efetuadas num volume total de 25µL, contendo Tampão de PCR 1X, dNTP's 0.2 mM, cada *primer* a 0.4µM, 0.3µL de enzima *DreamTaq* DNA Polimerase 5U/µL (Fermentas®, EUA). De seguida, foram adicionados aos microtubos, 10 ng de DNA genómico extraído das amostras do solo ou dos enriquecimentos.

Para a estratégia *de nested* –PCR utilizaram-se, tal como mencionado na secção 5.1, os *primers* referidos por *Muhling et al*, (2008) e *Dar et al*, (2005), conforme tabela 2.

Para a classe das *β-Proteobacteria*, a primeira amplificação foi efetuada com uso dos *primers* Beta 359 F (5' – GGG GAA TTT TGG ACA ATG GG – 3') e Beta 682 R (5' – ACG CAT TTC ACT GCT ACA CG – 3') de modo a obter fragmentos de cerca de 340pb pertencentes a este grupo filogenético. Para a amplificação posterior, foram utilizados, os *primers* 518 F GC (5' - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC AGC AGC CGC GGT AAT – 3') e Beta 682 R, acima referido, com obtenção de um segundo fragmento de cerca de 180pb, originado a partir do produto obtido no PCR anterior.

Para os géneros *Desulfovibrio* e *Desulfomicrobium*, foram usados os *primers forward* DSV 230 (5' - GRG YCY GCG TYY CAT TAG C -3') e *reverse* DSV 838 (5' – SYC CGR CAY CTA GYR TYC ATC – 3'). A amplificação posterior foi realizada sobre o fragmento obtido, de *ca* de 600 pb, com os *primers* supra – referidos 341FGC e 518R, obtendo-se um produto de amplificação de *ca* de 190 pb.

Para o *Phylum Firmicutes* foi usado o *primer* 9bfm (5' – GAG TTT GAT YHT GGC TCA G -3') e o *primer reverse* 1512 uR (5' – ACG GHT ACC TTG TTA CGA CTT - 3'), específicos para amplificação de bactérias para uma primeira amplificação, obtendo-se um fragmento de *ca* de 1.5 Kb. De seguida, foram usados os *primers* específicos para o *Phylum Firmicutes* Firm 350 F (5' – GGC AGC AGT RGG GAA TCT TC - 3') e o *primer reverse* Firm 814 R (5' – ACA CYT AGY ACT CAT CGT TT – 3'), obtendo-se um fragmento de PCR de *ca* 480 pb, a partir do de 1.5Kb. Por fim, foram usados o *primer* 518FGC, acima descrito e o *primer reverse* 785 R (5' - CTA CCA GGG TAT CTA ATC C -3'), sendo gerado um fragmento de *ca* 280 pb.

As primeiras reações de PCR, definidas para esta estratégia, foram feitas num volume total de 50µL, contendo Tampão PCR 1X, 0.2mM de dNTP's, 0.4µM de cada *primer* e 0.2µL de Enzima *FideliTaq* DNA Polimerase 5U/µL (USB®, EUA). De seguida, foram adicionados aos microtubos, 10 ng de DNA genómico extraído das amostras do solo ou dos enriquecimentos. No caso da segunda amplificação definida para o *Phylum Firmicutes*, foram usados 2µL do produto de PCR obtido na primeira amplificação.

As últimas reações de PCR, precedendo a deposição em gel DGGE, foram também efetuadas num volume total de 50µL, contendo Tampão de PCR 1X, dNTP's 0.2mM, 0.4µM de cada *primer* e 0.3µL de Enzima *DreamTaq* DNA Polimerase 5U/µL (Fermentas®, EUA). Foram usados 2µL do produto de PCR obtido na amplificação precedente.

5.3.Etapas de amplificação

A amplificação dos genes 16S rRNA pela abordagem direta e de “*nested-PCR*” fez-se no Termociclador (*Bio-Rad MyCycler*).

Para a abordagem direta, procedeu-se a uma etapa de desnaturação a 95°C, durante 2 minutos, e, seguidamente, realizaram-se 35ciclos, cada um com três etapas consecutivas: uma desnaturação a 95°C, durante 30 segundos, seguida de *annealing* a 54°C, durante 30 segundos e extensão a 72°C, durante 30 segundos O último ciclo foi seguido de uma etapa de extensão adicional a 72°C, durante 5 minutos.

Para a amplificação das cadeias molde pela estratégia de *nested-PCR*, a temperatura de *annealing* foi dependente do par de *primers* utilizado. Para as amplificações com uso da enzima *FideliTaq* DNA Polimerase, após uma desnaturação inicial a 95°C durante 2 min, seguiram-se 35 ciclos incluindo cada um: uma etapa de desnaturação a 95°C durante 30 s, seguida de *annealing* à temperatura apropriada para cada par de *primers* (ver tabela 2) durante 30 s, e extensão a 68°C durante 1 minuto (para o *primer* 9bfm/1512 Ur, a extensão foi de 90 s). O último ciclo foi seguido de uma etapa de extensão adicional a 68°C, durante 5 minutos.

Para as amplificações finais da estratégia referida, realizadas com uso dos “*primers F-GC*” e enzima *DreamTaq*, procedeu-se a uma etapa de desnaturação a 95°C, durante 2 minutos, seguida de 25 ciclos, cada um com três etapas: uma desnaturação a 95°C, durante 30 segundos, *annealing* à temperatura apropriada para cada par de *primers* (ver tabela 2) durante 30 segundos e extensão a 72°C, durante 30 segundos. O último ciclo foi seguido de uma etapa de extensão adicional a 72°C, durante 5 minutos.

Tabela 2: Sumário dos *primers* 16S rRNA universais e específicos para os subgrupos filogenéticos em estudo, a sua posição em *E. coli* e a temperatura de *annealing*

Estratégia	Primer	Grupo alvo	Posição em <i>E. coli</i> (kb)	Nº de bases	Temperatura de <i>annealing</i>		Referência
						(°C)	
Direta	341 F GC	Universal	341-398	57	56		<i>Muyzer et al, 1993</i>
	518 R	Bactérias	518-534	17			
Nested- PCR (Primeiro PCR Firmicutes)	9 bFM	<i>Bactérias</i>	9-27	18	52		<i>Muhling et al, 2008</i>
	1512 uR		1492-1512	20			
Nested –PCR (Segundo PCR Firmicutes)	Firm 350 F	<i>Firmicutes</i>	350-369	19	57		<i>Muhling et al, 2008</i>
	Firm 814 R		814-833	19			
Nested – PCR (Pré –DGGE Firmicutes)	518 F GC	<i>Firmicutes</i>	518-534	17	56		<i>Muhling et al, 2008</i>
	785 R		785-803	18			
Nested-PCR (Primeiro PCR β-Proteobacteria)	Beta 359 F	<i>B -Proteobacterias</i>	359-378	19	63		<i>Muhling et al, 2008</i>
	Beta 682 R		682-701	19			
Nested – PCR (Pré- DGGE B-Proteobacteria)	518 F GC	<i>B - Proteobacterias</i>	518-534	17	60		<i>Muhling et al, 2008</i>
	Beta 682 R		682-701	19			
Nested – PCR (Primeiro PCR)	DSV 230	<i>Desulfovibrio/Desulfomicrobium</i>	230-248	18	61		<i>Dar et al, 2005</i>
	DSV 838		818-838	20			
Nested – PCR (Pré- DGGE <i>Desulfovibrio</i> e <i>Desulfomicrobium</i>)	341 F GC	<i>Desulfovibrio/Desulfomicrobium</i>	341-398	57	56		<i>Muyzer et al, 1993</i>
	518 R		518-534	17			

5.4. Visualização dos produtos de PCR

Após cada amplificação, foi realizada uma análise de eletroforese em gel de agarose de 2% p/v em tampão TAE 1x, para concluir da sua eficácia. Foram aplicados 3 µL de marcador molecular 1Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen®; 100ng/µL) num dos poços e 5 µL de cada produto de PCR nos restantes poços do gel. A migração em gel é feita a uma diferença de potencial de 80 volts, durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida, o gel foi colocado em brometo de etídio (0-5 mg/L) durante 10 minutos, e seguidamente visualizado no transiluminador e fotografado com o *software Kodak Gel Logic 200* (Kodak, EUA)

5.5. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

A análise electroforética em gel de gradiente de desnaturação (DGGE) foi baseada nos procedimentos descritos por *Muyzer et al* (1993) e *Muhling et al* (2008). Para o efeito, recorreu-se a um sistema de DGGE -2001 acoplado a uma bomba de agitação, com aquecimento e uma fonte de alimentação EPS-300 II (CBS Scientific®, EUA).

Foram preparados géis a 8% (p/v) de poliacrilamida, contendo ureia e formamida como agentes desnaturantes, para a migração dos produtos amplificados. Utilizou-se um marcador contendo uma mistura de fragmentos de amplificação dos genes 16S rRNA de espécies bacterianas, representativas de diferentes classes filogenéticas. Esses fragmentos, obtidos com os *primers* 341F GC – 518R, foram amplificados a partir do DNA dos seguintes microrganismos: *Escherichia coli K12*, e *Pseudomonas aeruginosa* (*γ-Proteobacteria*), *Paenibacillus sp. DSM 34* (*Bacilli*), *Streptomyces caviscabies* (*Actinobacteria*).

5.5.1. Preparação dos géis

Os géis a 8% (p/v) de poliacrilamida foram preparados a partir de duas soluções desnaturantes a 30% e a 50%, por forma a variar o gradiente de desnaturação entre estes dois valores, com recurso a um formador de gradiente de 20 mL e a uma mini bomba peristáltica MPP-100 (CBS Scientific®, EUA).

Prepararam-se soluções stock a 0% (1.5 mL de TAE 50x; 30 ml de acrilamida a 39% - acrilamida: 1% - bis-acrilamida (Sigma-Aldrich®); 120 mL de H₂O destilada) e a 80% (1.5 mL de TAE 50x; 30 ml de acrilamida a 39% - acrilamida: 1% - bis-acrilamida ; 30mL de água destilada; 48 mL de formamida deionizada (PlusOne®); 50.4 g de ureia (PlusOne®).

A solução 30 % foi preparada pela adição de 7 mL de solução stock a 0% a 4 mL de solução stock a 80%. Para obter a solução 50%, foram adicionadas 4.1 mL de solução stock a 0% a 6.9 mL de solução stock a 80%. A cada solução foram adicionados 7.7 µL do agente polimerizador tetrametilenodiamina (TEMED).

Imediatamente antes de inserir as soluções no formador de gradiente, foram adicionados 55µL de persulfato de amónia a 10% (APS, 0.1g/mL. PlusOne®), um agente oxidante que atua na polimerização da acrilamida. O formador de gradiente é utilizado, até o interior das duas placas de vidro, usadas para a montagem do gel, ser preenchido na quase totalidade (o gel liquefeito fica a uma distância de cerca de 2 cm do topo do sistema de placas). No topo, são rapidamente adicionados, com uma pipeta *Pasteur*, 10mL de solução *stock* a 0%, contendo 7.7µL de TEMED e 38µL de APS a 10%. Por fim, é colocado o pente para formar os poços de deposição das amostras.

5.5.2. Condições de corrida

A eletroforese foi realizada em tampão tris-acetato-ETDA a 0.5X com uma voltagem constante de 200 volts, a 60°C, durante 3.5 horas.

Seguindo a metodologia aconselhada (*Green, 2005*), o tampão TAE 0.5x foi aquecido no sistema de DGGE até atingir uma temperatura de 60°C. Findo este passo, os géis foram montados numa cassette específica e colocados no interior do sistema. Foi realizada uma pré-corrída de 30 minutos, de modo a testar a migração a realizar, pois foram colocados nos poços do gel 5µL de tampão de depósito contendo Azul de Bromofenol (C₁₉H₁₀Br₄O₅S, Sigma-Aldrich®).

Os volumes dos produtos de PCR a depositar foram determinados após a análise electroforética referida em 5.4. Assim foram utilizadas para a migração 7 µL de cada produto de PCR obtido para o grupo *Desulfovibrio/Desulfomicrobium* e 8 µL para os produtos de PCR relativos ao *Phylum Firmicutes* e classe *β-Proteobacteria*. No caso dos produtos de PCR obtidos pela abordagem direta, foram usados 10 µL. Os produtos de PCR foram homogeneizados com tampão de depósito (4 µL e 5 µL) e depositados nos poços do gel.

Após a corrida, cada gel foi colocado numa tina com brometo de etídio (0.5 mg/L) durante 2 minutos, visualizado no transiluminador e fotografado com o *software Kodak Gel Logic 200* (Kodak, EUA).

O programa *ImageJ*®, desenvolvido pelo NIH (National Institute of Health, USA), foi usado para a determinação da área e intensidade relativa das bandas obtidas, por análise das imagens obtidas em formato tiff.

5.6. Excisão de bandas e purificação

As bandas de interesse foram excisadas a partir dos géis com uma lâmina de bisturi estéril, sob luz UV e trituradas com bisturi ou uma ponta estéril. Adicionaram-se 50 µL de tampão TE aos tubos contendo as bandas. Os tubos são submetidos a ciclos de variação térmica entre -20 e 65°C de modo a libertar o DNA da acrilamida. Após centrifugação a 12 000 *g* durante 3 min, 5 µL do sobrenadante são utilizados para reamplificação por PCR com *primers* de sequência idêntica à da dos *primers* usados na

última etapa da estratégia de *nested-PCR*, exceto que o *primer forward* não possui qualquer extensão GC.

As reações de PCR foram efetuadas num volume total de 50 μ L com tampão de PCR 1x, 0.2 mM dNTPs, 0.6 uM de cada *primer* e 0.3 μ L de Dream Taq 5U/ μ L (Fermentas®, EUA). Inicialmente o DNA é desnaturado a 95°C durante 2 min e seguem-se 35 ciclos, cada um com três etapas: uma desnaturação a 95°C 30 seg, seguida do emparelhamento dos *primers* à temperatura de *annealing* respetiva (ver tabela 2) durante 30 seg, e de extensão a 72°C a 30 seg. Após o último ciclo, foi efetuada uma extensão adicional a 72°C durante 5 min.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit *Gel Band Purification*® (GE Healthcare, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v). Após estimativa da sua concentração, foram enviados para sequenciação automática executada nos laboratórios da empresa MacroGen®.

Para uma identificação preliminar das sequências obtidas foi feita uma análise comparativa com as sequências de genes 16S rRNA presentes na base de dados *GEnBank*, NCBI (National Center for Biotechnology Information) com recurso ao *Blast* (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool).

Resultados e discussão

1. Parâmetros físico-químicos

Os resultados dos parâmetros físico-químicos, conforme dados do Laboratório Químico-Agrícola da Universidade de Évora, encontram-se na tabela 3:

Tabela 3: Parâmetros físico-químicos das amostras recolhidas no solo do olival

Amostras	T-DC	T-EC	NT-DC	NT-EC
Fósforo (P ₂ O ₅) (mol/kg)	7.326x10 ⁻⁴	5.494x10 ⁻⁴	6.199x10 ⁻⁴	2.958x10 ⁻⁴
Nitrato (NO ₃) (mol/kg)	7.257x10 ⁻⁵	7.257x10 ⁻⁵	1.128x10 ⁻⁴	1.048x10 ⁻⁴
Potássio (K ₂ O) (mol/kg)	4.980x10 ⁻³	1.860x10 ⁻³	1.990x10 ⁻³	1.120x10 ⁻³
Cobre (Cu) (mol/kg)	1.640x10 ⁻³	2.187x10 ⁻⁴	1.510x10 ⁻³	5.507x10 ⁻⁵
Textura	Média	Média	Média	Média
pH (H ₂ O)	6.80	6.60	7.30	7.50

O solo do olival sob estudo apresenta textura média, o que significa que apresenta um equilíbrio entre os teores de areia, silte e argila. Normalmente, estes solos apresentam boa capacidade de drenagem, bem como de retenção de água e índice médio de erodibilidade. Assim, não requerem cuidados especiais, adequando-se a todos os métodos de irrigação. As amostras das zonas tratadas com Cuprital® (T-DC; T-EC) revelaram-se ligeiramente ácidas, o que pode indicar um efeito deste composto (que apresenta pH 6.5 a 1% em água) sobre o pH do solo.

Pela análise da tabela verifica-se que as concentrações de nitrato nas amostras dos solos tratados eram inferiores às dos solos não tratados. Este resultado poderá estar relacionado com algum efeito direto do tratamento, por exemplo, um aumento da lixiviação do nitrato, causada por repulsão com cargas negativas acumuladas no solo, e/ou indireto, pela proliferação de bactérias resistentes ao cobre que usam o nitrato.

O valor mais elevado de concentração de cobre foi medido na amostra composta do solo tratado, recolhida debaixo de copa, como era esperado. De facto, o tratamento com Cuprital® é realizado por projeção sobre a copa das árvores, ocorrendo fenómenos de deposição de fungicida por lixiviação da copa e escorrimento pelo tronco. Apesar de se tratar de um solo de textura média, com boa drenagem, foram encontrados níveis de cobre entre 5,507x 10⁻⁵ (NT-EC) e 1,6 x 10⁻³ mol/Kg (T-DC) este último valor é superior ao valor de referência (ca 2x 10⁻⁴ mol/kg), utilizado em

laboratórios de análises de solos usado para classificar um solo como “de teor elevado em cobre” (*Manual de fertilização das culturas*, 2ª Ed. 2006). Este valor foi obtido, apesar de se terem passado aproximadamente 30 dias, entre o tratamento fitossanitário e a recolha das amostras, podendo já ter ocorrido assimilação pela comunidade microbiana presente e pelas plantas.

A amostra de solo NT-DC apresenta aqui um valor mais elevado que a amostra T-EC, o que é questionável, dado que no “setor NT” ainda não tinha sido efetuado o tratamento fitossanitário. Sendo o tratamento feito sobre as copas das oliveiras e de modo rotativo (isto é, solos não tratados são sujeitos periodicamente a novo tratamento), poderia prever-se uma semelhança de valores para alguns elementos entre estas amostras, dependendo da diferente capacidade de retenção do solo em relação a diferentes elementos. Neste contexto, é importante recordar que a recolha das amostras foi feita em solo húmido, devido à ocorrência de precipitação nos dias anteriores, o que pode ter levado a uma diluição dos iões no solo. O alto teor em cobre pode ser portanto um resultado pontual, devido a algum fator localizado. Contudo, só a recolha de um número muito maior de amostras permitiria alguma indicação sobre o valor de cobre determinado.

2 Quantificação nos enriquecimentos

2.1 Produção de amónio

A quantificação de amónio presente foi efetuada nos enriquecimentos seletivos, de modo a avaliar o efeito do cobre e da temperatura. Os resultados estão expressos na Figura 9.

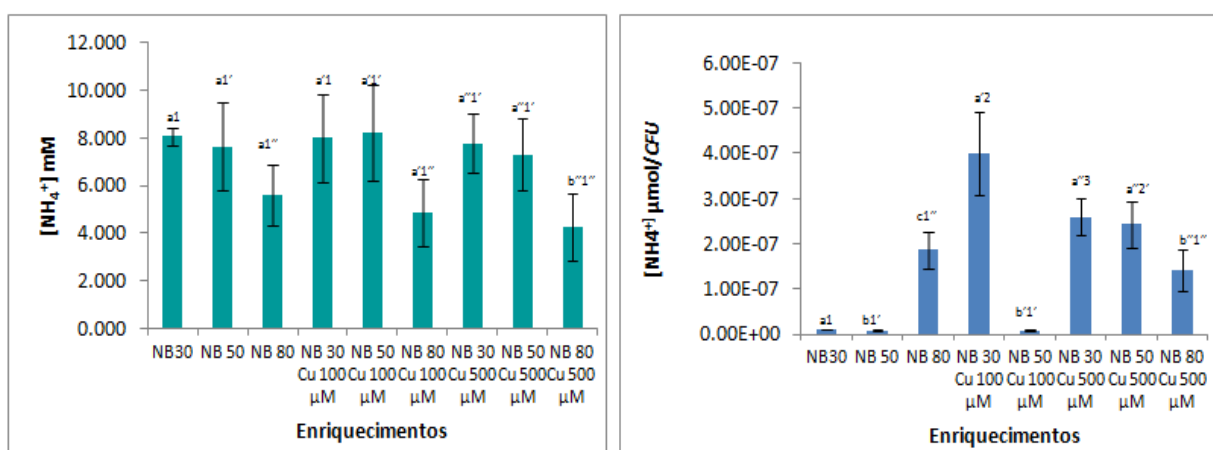


Figura 9: Quantificação de amónio nos enriquecimentos seletivos A) Produção absoluta de amónio B) Produção de amónio normalizada por unidades formadoras de colónias

Letras diferentes (a,b, a', b', etc) e algarismos diferentes (1, 2,1', 2', etc) representam diferenças estatisticamente significativas para o fator temperatura e concentração de cobre respetivamente (p < 0.05).

Todos os enriquecimentos apresentaram uma produção similar de amónio (figura 9, A) embora ligeiramente inferior a 80°C. As comunidades microbianas implicadas nessa produção serão distintas a 30°C e a 50°C, e ambas produzem amónio na mesma amplitude. Dado que os enriquecimentos a 80°C são obtidos pela transferência das culturas a 50°C, o decréscimo observado estará associado a um decréscimo metabólico dessa comunidade microbiana a 80°C, sugerindo que essa comunidade será constituída na base por microrganismos moderadamente termofílicos e não hipertermofílicos.

Experiências similares efetuadas por *Portillo et al* (2012), e apenas focando o efeito da temperatura, 25°C versus 50°C, revelaram resultados diferentes, tendo sido observado um incremento da produção a 50°C ou não, de acordo com o tipo de solo agrícola (recolhas em solo florestal ou pastagem, por exemplo). Este fenómeno sugere que não só o tipo de solo como a natureza da espécie agrícola cultivada pode influenciar os resultados obtidos. Uma característica não poderá ser dissociada da outra e é possível, por exemplo, que a absorção preferencial de algumas culturas agrícolas de amónio versus nitrato, ou o inverso, influencie a dinâmica da comunidade microbiana do solo.

Ao avaliarmos a produção de amónio normalizada por unidades formadoras de colónias, é notório um aumento de produção de amónio nos enriquecimentos à concentração de cobre mais elevada. Antes de mais, convém lembrar que a determinação de *cfu* termofílicos foi feita por plaqueamento a 50°C. Isso significa que as colónias obtidas serão maioritariamente as formadas por termofílicos moderados, que conseguem proliferar ou sobreviver às restantes temperaturas sob estudo. Por motivos técnicos, foi-nos impossível quantificar a proteína total nestes enriquecimentos ou realizar uma contagem das células totais nos mesmos, por intermédio da qual teríamos resultados distintos. Assim, os resultados observados traduzem a natureza da população termofílica que está sob seleção em cada enriquecimento, donde os valores obtidos para os enriquecimentos com maior concentração de cobre, indicarão a presença de bactérias termofílicas produtoras de amónia e resistentes ao cobre.

2.2 Produção de sulfato

A quantificação do sulfato presente nos enriquecimentos foi também avaliada pela normalização por unidades formadoras de colónias.

Os resultados estão expressos na Figura 10:

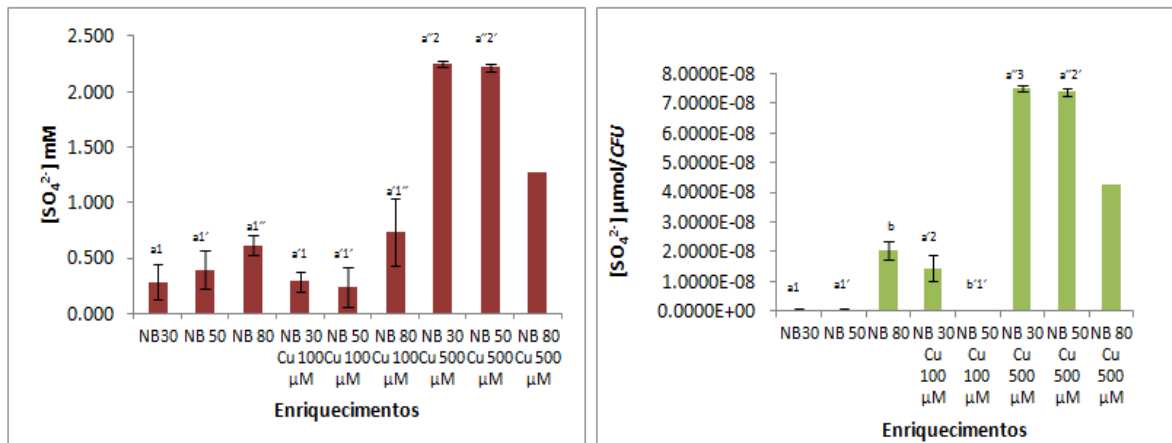


Figura 10: Quantificação de sulfato nos enriquecimentos seletivos A) Produção absoluta de sulfato B) Produção de sulfato normalizada por unidades formadoras de colónias.

Letras diferentes (a,b, a', b', etc) e algarismos diferentes (1, 2, 1', 2', etc) representam diferenças estatisticamente significativas para o fator temperatura e concentração de cobre respetivamente (p <0.05).

É importante referir a dificuldade inerente ao método de quantificação do sulfato; é um método sensível, muito dependente do tempo de agitação aquando da adição de cloreto de bário e sujeito a variações importantes de absorvância, variações essas que tendem a aumentar com a concentração de sulfato (*Kolmert et al*, 2000). Isso obriga a um número elevado de ensaios e leituras, que de facto não efetuamos, não tendo mesmo havido a possibilidade de determinar o desvio padrão no caso do enriquecimento a 80°C e 500 μM de cobre. Os ensaios efetuados mostraram uma tendência de aumento da produção de sulfato com a temperatura, em particular a 80°C e a uma concentração de cobre de 100 μM de cobre.

Em estudos similares descritos por *Portillo et al* (2012), relativos ao efeito da temperatura, foi também observado um aumento da produção de sulfato a 50°C, sendo esse aumento muito mais significativo. Esta diferença poderá estar associada ao tempo de incubação, o qual foi de 4 dias no estudo referido, ao invés de 24 h, como no nosso caso. *Santana et al* (não publicado) descreveram um aumento na produção de sulfato por isolados termofílicos, em fase estacionária de crescimento, o que pode estar na base desta diferença.

Curiosamente, a produção de sulfato normalizada por unidades formadoras de colónias, segue um padrão similar ao registado para a produção de amónio. Atendendo, ao mencionado na secção precedente, também aqui os valores obtidos para os enriquecimentos com maior concentração de cobre, indicarão a presença de bactérias termofílicas produtoras de sulfato (e amónio) e resistentes ao cobre. Em suma, os dados sugerem a presença de microrganismos termofílicos resistentes ao cobre e capazes de processar o enxofre e azoto orgânicos presentes no meio de cultura, produzindo sulfato e amónio.

A presença de bactérias termofílicas nos enriquecimentos ocorreu, apesar de a temperatura média registada, aquando da recolha da amostra composta NT-EC, ter sido de apenas 10°C. Os solos temperados podem, no entanto, apresentar valores muito superiores, tendo já sido registados valores de 60°C (Portillo *et al.*, 2012). Também em Évora, já foram registados valores próximos de 40°C a 4 cm de profundidade em solo de olival, durante o verão (Santana *et al.*, não publicado). Será nesta estação mais quente, que as bactérias termofílicas poderão proliferar.

3 Caracterização fenotípica, fisiológica e molecular do isolado

3.1 Análise fenotípica e fisiológica

Dado que foi nos enriquecimentos com maior concentração de cobre que se registaram valores elevados de produção de sulfato, a qual se manteve alta a 80°C, o enriquecimento em meio NB 80°C Cu 500µM foi utilizado para a obtenção de isolados potencialmente capazes de participar na produção observada. Assim, procedeu-se ao isolamento como indicado na secção 3 da metodologia; obtiveram-se várias colónias isoladas, no entanto apenas uma foi capaz de crescer em meio NB e NB Cu500µM.

Quando plaqueado, o isolado obtido formou colónias grandes com cerca de 0.8cm de diâmetro após cerca de 20 horas de incubação a 50°C. As colónias apresentavam formato irregular, superfície lisa e cor bege. Esta morfologia de colónias foi também detetada pelo plaqueamento do enriquecimento, realizado para a contagem de unidades formadoras de colónias (ver secção 2 da metodologia). Quando observadas ao microscópio verificou-se que as células tinham forma de bastonete e encontravam-se frequentemente aos pares ou formando cadeias mais longas, com maior número de células. Algumas células apresentavam grande mobilidade. Em culturas do isolado, foi observada a formação de endósporos durante a fase estacionária de crescimento. Esta formação está associada à limitação de nutrientes no meio, durante esta fase de crescimento; os esporos estarão metabolicamente inativos mas em contínua monitorização das condições externas (Nicholson *et al.*, 2009).

A coloração diferencial de Gram identificou o isolado como Gram-Positivo. Em fase estacionária, tal como acontece com as bactérias Gram-positivas nesta fase, as células não coravam tão intensamente, (assemelhando-se a células Gram-negativas) devido à diminuição da espessura da camada de peptidoglicano nas células mais velhas. Também aqui eram visíveis os endósporos, que maduros, não absorvem o corante, devido à sua estrutura resistente e hidrofóbica; os endósporos surgiam assim como zonas dilatadas não coradas dentro da célula vegetativa (ver Figura 11).

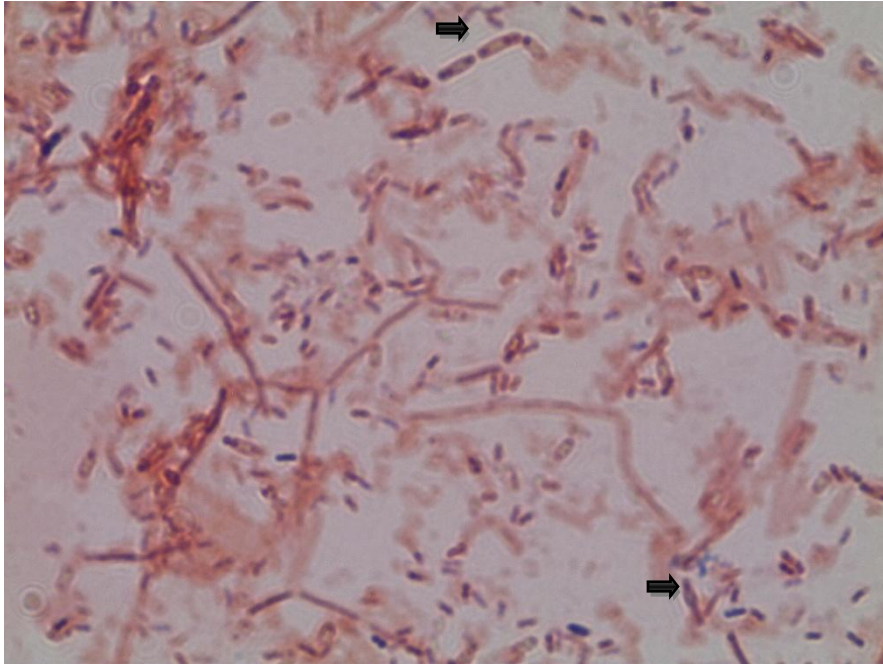


Figura 11: Visualização do isolado ao Microscópio ótico *Olympus BX41* após coloração diferencial de Gram.

As setas indicam endósporos em diferentes fases de maturação

Quando o isolado cresceu em NB a 50°C sem qualquer adição de cobre, o rendimento de crescimento foi cerca de três vezes superior àquele obtido em presença de 500 μM de cobre. Para investigar o efeito do cobre no crescimento, bem como para determinar se o isolado obtido contribuiu para a produção de sulfato na presença de cobre realizaram-se vários ensaios.

O isolado foi inoculado em meio NB Cu 500 μM a 50°C, 180 rpm durante 25 horas, e de seguida a cultura foi transferida a 80°C, sem agitação. Foram retiradas amostras ao fim dos tempos T_1 20 h, T_2 25 h, T_3 28 h e T_4 44 h. Portanto, as amostras T_1 e T_2 correspondem ao período de incubação a 50°C, e T_3 e T_4 ao período de incubação a 80°C. Para cada tempo foi medida a densidade ótica da cultura e feitas observações ao microscópio ótico a fresco e após coloração de Gram. Foi quantificada a presença de esporos a cada tempo como descrito em 3.2.1., procedeu-se também à quantificação do sulfato e de proteína nas amostras, tal como indicado em 2.2. e 3.2.2, respetivamente.

Verificou-se que a produção de sulfato aumentou de T_1 a T_4 , tal como indicado na Figura 12:

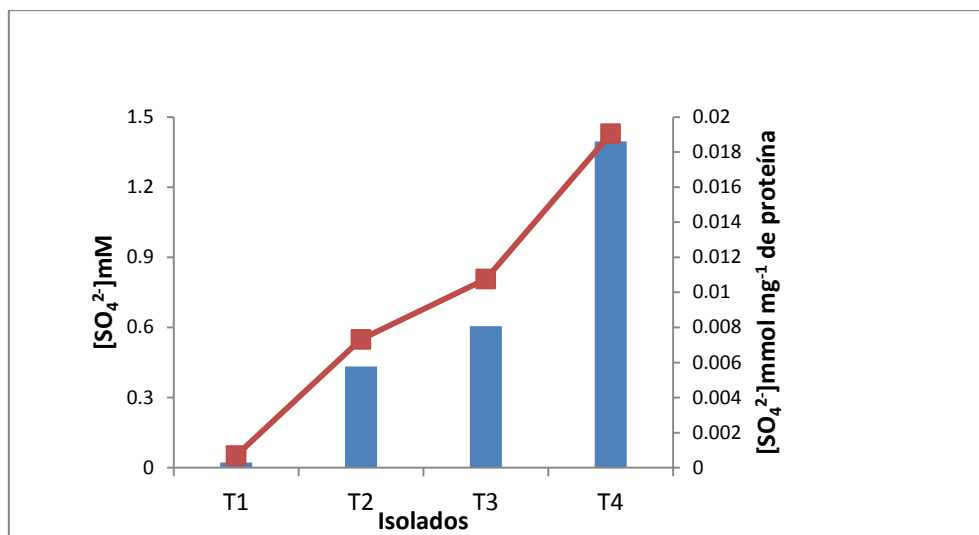


Figura 12: Produção absoluta de sulfato total (mM) (azul) e produção de sulfato normalizada em relação ao conteúdo proteico celular (mmol mg⁻¹) (vermelho), para os diferentes tempos T₁ a T₄.

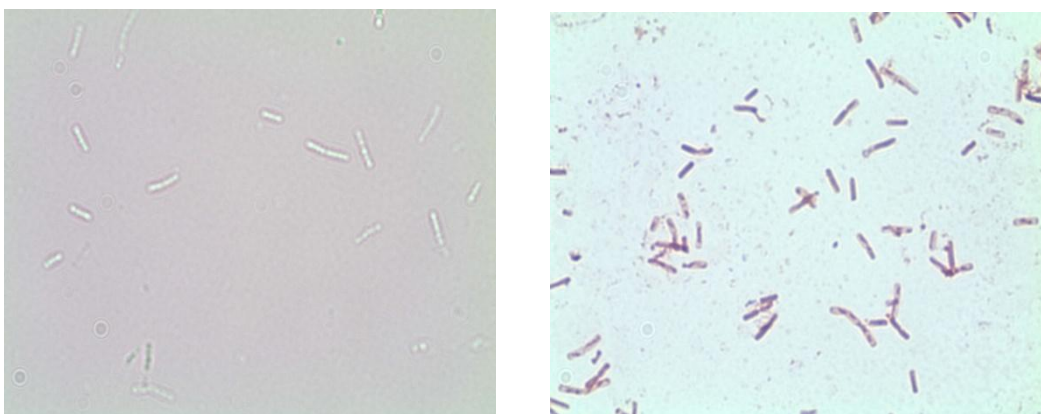


Figura 13: Visualização do isolado ao Microscópio ótico Olympus BX41 ao tempo T₃. a) Preparação a fresco, b)) após coloração diferencial de Gram

A leitura da densidade ótica não mostrou diferenças significativas entre T₁-T₃. Em T₁ a cultura já se encontrava em fase estacionária, e apenas em T₄ se registou uma queda de 24% no valor lido em relação ao valor máximo encontrado em T₂. O ensaio de choque térmico, bem como a observação microscópica revelaram a total ausência de esporos. Quer nas preparações frescas, como nas resultantes de Gram, as células apresentavam-se muito segmentadas. Nas preparações Gram, as células tinham zonas coradas intervaladas com zonas não coradas, em particular aos tempos T₃ e T₄ (ver Figura 13), e não foram observadas cadeias longas. Nas preparações a fresco não se observaram células móveis. Estas observações sugerem que o isolado termofílico obtido, produtor de sulfato, está sujeito a *stress* celular na presença de sulfato de cobre a 500 µM. A resistência ao cobre observada, acarreta custos celulares, já que se verificou uma diminuição do rendimento de crescimento; a morfologia das células também foi alterada: não foram observadas longas cadeias de células e a coloração de

Gram sugere uma distribuição irregular dos componentes da parede celular. Além disso, não foram observados esporos; o efeito inibitório do cobre na esporulação já foi referido para outros membros da classe *Bacilli* (Rodriguez et al, 2010).

Quanto ao aumento da produção de sulfato, que é excretado no meio, é também provável que este aumento esteja relacionado ao processamento de moléculas orgânicas para a manutenção celular em condições de *stress*. Portillo et al (2011) e Santana et al (não publicado) já tinham relatado uma dependência da produção de sulfato com a temperatura, que é distinta para diferentes isolados termofílicos, alguns apresentam maior produção de sulfato á temperatura ótima de crescimento, outros, contudo, podem apresenta-la a temperaturas próximas dos limites máximos e/ou mínimos de crescimento.

3.2. Análise molecular

Para obter uma atribuição filogenética preliminar do isolado, foi feita a análise da sequência de 16SrDNA obtida, de 259 bp, com recurso ao *Blast*.

A tabela 4 apresenta o resultado obtido. Embora o valor E obtido, bem como a percentagem de identidade indiquem uma igualdade absoluta entre o fragmento sequenciado e outros do género *Bacillus* e *Geobacillus*, não podemos concluir seguramente quanto a uma afiliação taxonómica a um ou outro género e muito menos a qualquer espécie. Seria necessário efetuar uma análise filogenética por comparação com sequências de genes 16S rRNA próximos destes grupos, de modo a estabelecer um dendograma filogenético. A obtenção de um fragmento maior seria desejável para uma maior robustez da análise. Contudo, e em associação com os testes fenotípicos, sabemos tratar-se de uma bactéria da classe *Bacilli*, *Phylum Firmicutes*.

Tabela 4: Resultados da análise Blast da sequência parcial do gene 16S rDNA do isolado

Microrganismo	Número de acesso	Valor E	Máxima Identidade
Bacillus subtilis estirpe P38	JQ669676.1	0.0	100%
Clone procaríota não cultivado MB7-77	JQ693078.1	0.0	100%
Bacillus sp. MBK-z1	JQ729680.1	0.0	100%
Bacillus sp. MBK-d2	JQ729678.1	0.0	100%
Bacillus subtilis ASC582	JQ796006.1	0.0	100%
Bacillus tequilensis BVC67	JQ660650.1	0.0	100%
Bacillus amyloliquefaciens BVC48	JQ660631.1	0.0	100%
Bacillus tequilensis CRR1-HN4	JQ695931.1	0.0	100%
Geobacillus sp. estirpe CRR1-HN1	JQ695928.1	0.0	100%

4. Análise dos géis de DGGE e sequenciação

4.1. PCR-DGGE de amostras de DNA do solo

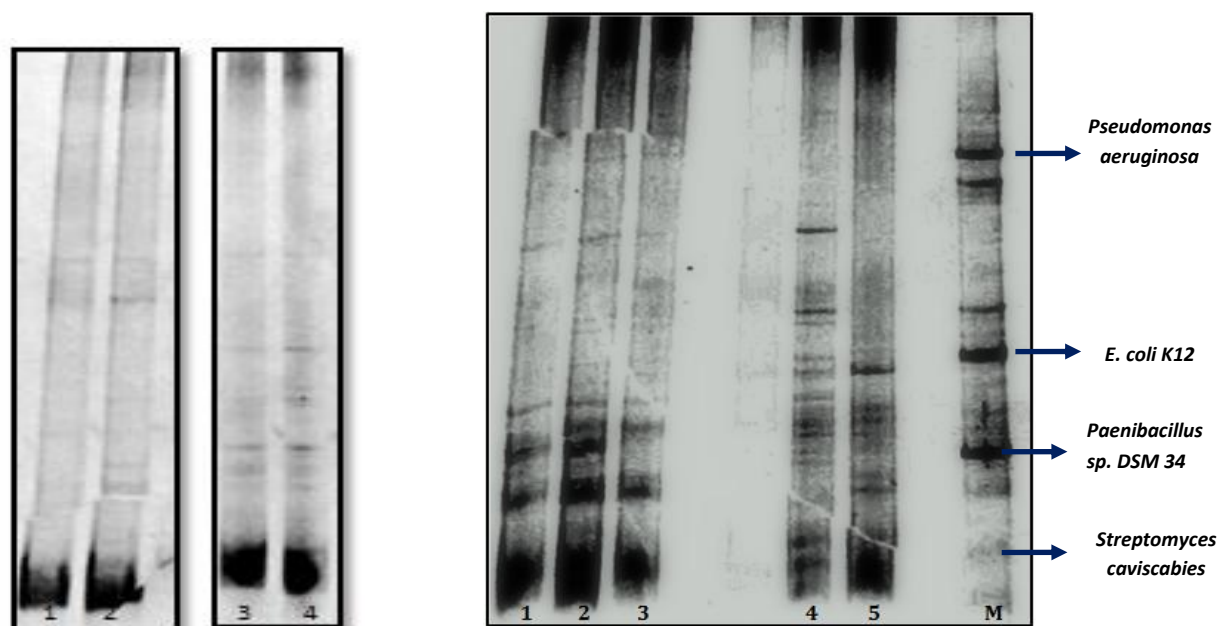


Figura 14: Géis de DGGE das amostras resultantes de amplificação por *nested-PCR* sobre o DNA extraído das amostras compostas do solo A- Gel resultante da amplificação com os *primers* para os géneros *Desulfovibrio* e *Desulfomicrobium*; B - Gel resultante da amplificação com os *primers* para a classe β -*Proteobacteria*.

A) 1 – TDC II; 2 – TEC II; 3 – NTDC; 4 – NTEC. B) M – marcador; 1 – TDC; 2 – TDC II; 3 – TEC II; 4 – NTDC; 5 – NTEC

Foram efetuados géis de DGGE com os produtos de PCR resultantes de amplificação sobre o DNA extraído das amostras de solo. A amplificação foi feita quer com uso dos *primers* universais, quer pela estratégia de *nested-PCR* (ver Esquema 2 secção 5.1). No primeiro caso, a resolução dos géis foi muito fraca para todas as condições de corrida testadas, sendo contudo percebido um *fingerprint* diferente entre amostras provenientes de solos tratados, por um lado, e não tratado com cobre, por outro (resultados não apresentados). O uso de *primers* dirigidos para grupos taxonómicos específicos, levou a uma melhoria da resolução dos géis, em particular no que se refere às β -*Proteobacteria*, abundantes no solo (Figura 14).

O gel resultante da amplificação com os *primers* para os géneros *Desulfovibrio/Desulfomicrobium* apresenta uma fraca resolução, sendo possível verificar que as amostras recolhidas em solo tratado, tanto debaixo de copas como entre copas, apresentam um *fingerprint* semelhante, embora a análise da intensidade relativa entre algumas bandas, efetuada com recurso ao *ImageJ*[®], seja distinta nos dois casos. Isto sugere que o tratamento fitossanitário efetuado no setor de solo definido

para tal, levou a uma seleção de microrganismos resistentes ao tratamento. As amostras de solo não tratado têm *fingerprint* distinto das amostras tratadas, e semelhante entre si, como já referido; no caso das *β-Proteobacteria* verificou-se também que a amostra NT-EC apresentou o *fingerprint* mais distinto, entre todas as amostras, não apresentando algumas das bandas dominantes presentes em todos os *fingerprints*. Por outro lado, NT-DC apresenta uma maior similaridade no *fingerprint* com o das amostras T, o que não pode deixar de nos lembrar os resultados obtidos aquando da medição dos teores em cobre para esta amostra, a qual apresentava um teor também elevado para este elemento (ver tabela 3).

Acreditamos que uma maior quantidade de DNA molde, bem como o ensaio de mais condições de corrida poderiam ter levado à obtenção de informação mais detalhada a partir destas amostras. A quantidade limitante de DNA molde levará à amplificação de genes 16SrRNA dominantes na população. Contudo, sabe-se que o uso do Kit *PowerSoil*[®], resulta numa eficiente remoção de contaminantes que podem limitar a reação de amplificação da Polimerase, mas em contrapartida na diminuição do rendimento de DNA extraído (Dineen *et al*, 2010).

4.2.PCR-DGGE de amostras de DNA extraído dos enriquecimentos

A realização de enriquecimentos seletivos diminuiu a representatividade dos microrganismos do solo, enquanto permitiu o aumento da resolução dos géis. Contudo, os enriquecimentos foram perspetivados precisamente para que fossem representados os grupos alvo que queremos estudar; os enriquecimentos tinham como propósito a obtenção de bactérias termofílicas do *Phylum Firmicutes*, grupo, como já referido, heterotrófico e produtor de amónio e sulfato. As *β-Proteobacteria*, também alvo do nosso estudo, serão capazes de proliferar no mesmo meio, por utilização direta deste e/ou dos produtos metabólicos produzidos pelas bactérias termofílicas, provavelmente incluindo as bactérias oxidativas da amónia, pertencentes a esta classe. Do mesmo modo, poderão ser encontrados sulfato-redutores, que inicialmente presentes no solo vão proliferar nos enriquecimentos, graças à produção de sulfato pelas bactérias termofílicas. As *β-Proteobacteria* oxidativas de amónia, bem como os sulfato-redutores poderão ser encarados como microrganismos competidores de amónia e sulfato, tornando-os menos disponíveis para as plantas, em especial para aquelas que utilizam preferencialmente a amónia.

Os enriquecimentos procuravam também estudar o efeito do cobre e identificar quais os microrganismos resistentes dentro dos grupos taxonómicos escolhidos. Caso esses não incluam bactérias termofílicas, isso indicará um efeito negativo do tratamento de cobre sobre este grupo e levará a uma diminuição do teor em sulfato e amónio no solo, a menos que se trate de solos submetidos à adição de fertilizantes. A concentração máxima de cobre escolhida (500 µM) é, grosso modo, três

vezes inferior à concentração máxima registada para a amostra recolhida T-DC (Tabela 3). A escolha das concentrações a usar baseou-se na maior disponibilidade do cobre em solução, quando comparada com aquela do solo, onde o cobre se encontra associado à carga negativa do húmus, bem como em referências bibliográficas várias sobre o estudo de bactérias resistentes ao cobre (Chillappagari et al, 2009).

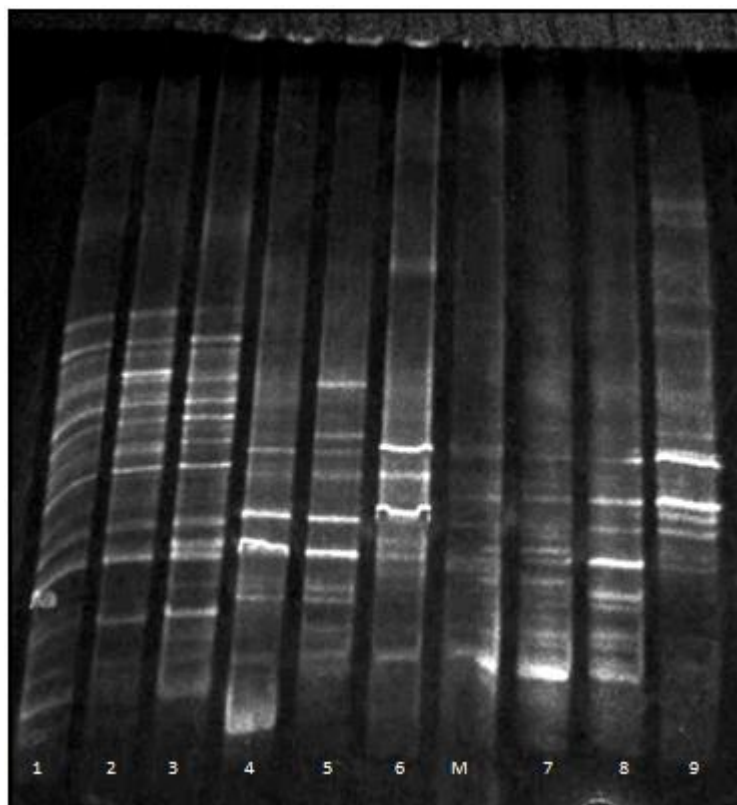


Figura 15: Gel de DGGE das amostras resultantes de amplificação direta sobre o DNA extraído dos enriquecimentos.

1 – NB30; 2 – NB30 Cu100; 3 – NB30 Cu500; 4 – NB50; 5 – NB50 Cu100; 6 – NB50 Cu500; M – marcador 7 – NB80; 8 – NB80 Cu100; 9 – NB80 Cu500;

A Figura 15 mostra um agrupamento de *fingerprints* similares segundo a temperatura, o que sugere ter ocorrido um efeito mais seletivo da temperatura e não do cobre sobre a comunidade microbiana. No entanto, o efeito da adição de cobre sobre a diversidade foi mais drástico para valores mais elevados de temperatura, e à concentração mais elevada de cobre.

Os resultados sugeriram também que poderiam ser revelados, pelo uso da estratégia de *nested-PCR*, presença de micróbios resistentes ao cobre para os distintos grupos taxonómicos, dada a presença de bandas correspondentes a microrganismos resistentes ao cobre para as diferentes temperaturas.

4.2.1. *Phylum Firmicutes*

O gel de DGGE com os produtos de PCR resultantes da amplificação com os *primers* específicos para o *Phylum Firmicutes* sobre o DNA extraído dos enriquecimentos está na figura 16.

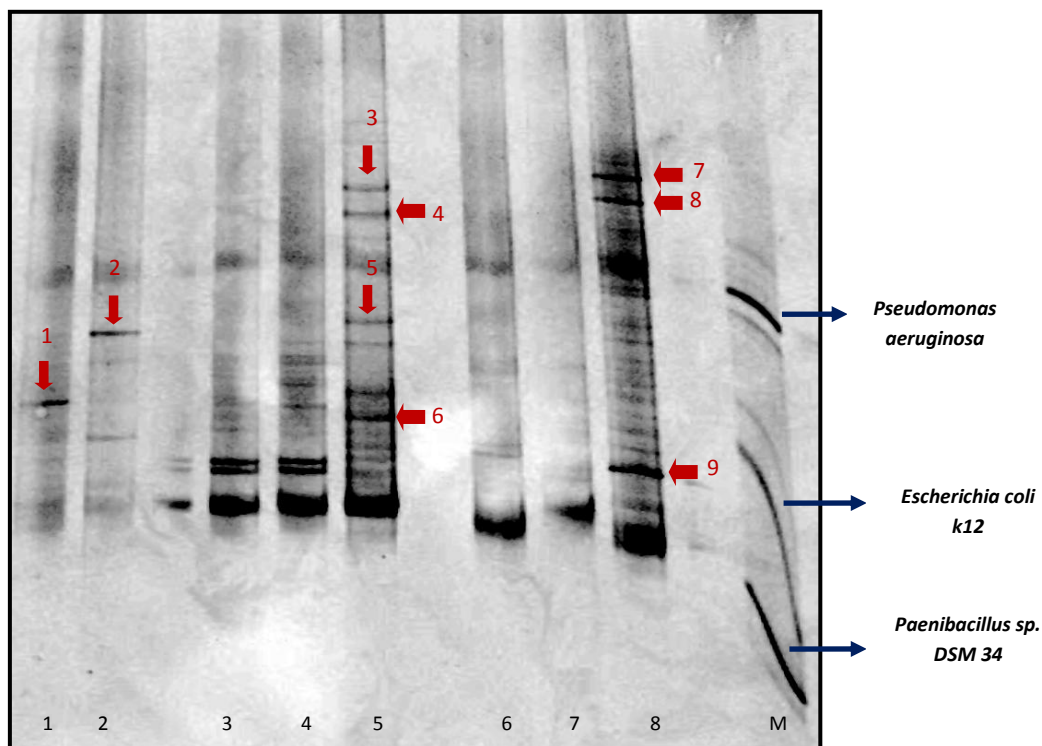


Figura 16: Gel de DGGE das amostras de DNA extraído dos enriquecimentos seletivos, amplificadas com o par de *primers* específicos para o subgrupo filogenético *Firmicutes*.

M – Marcador; 1 - NB30 Cu100; 2 - NB30 Cu500; 3 – NB50; 4 – NB50 Cu100; 5 – NB50 Cu500; 6 – NB80; 7 – NB80 Cu100; 8 – NB80 Cu500. As setas a vermelho representam as bandas que foram sequenciadas.

Foram escolhidas as bandas assinaladas para posterior sequenciação. A análise conjunta das sequências- com recurso ao *Blast*- e da sua intensidade relativa em cada enriquecimento-com recurso ao *ImageJ*[®] - permitiu a identificação preliminar dos microrganismos sob efeito da temperatura e do cobre (ver Tabela 5).

A utilização do programa *ImageJ*[®] permitiu-nos de facto inferir da proporção relativa de cada banda, dentro da mesma amostra e comparativamente às amostras restantes, por comparação da área de cada uma, determinada após descontar o “ruído de fundo” (Figura 17), Deste modo, qualquer erro resultante da deposição de diferentes quantidades de DNA obtido nas distintas amplificações, é eliminado.

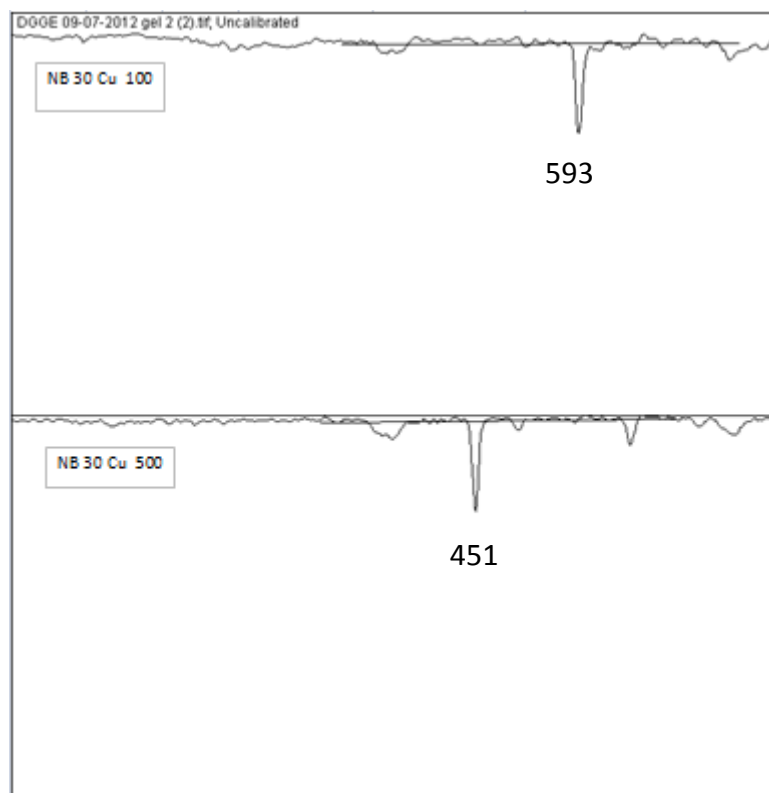


Figura 17: Perfil dos picos obtidos para as bandas da amostra NB30 Cu100, e da amostra NB30 Cu500; o cálculo da área de algumas bandas está indicado

As identidades encontradas foram exploradas, pela consulta dos números de acesso fornecidos pelo *Blast*. *Lysinibacillus sp.* e *Bacillus cereus* são mesofílicos, frequentemente encontrados no solo, o que está de acordo com o padrão obtido pelas bandas correspondentes, conseqüente ao aumento da temperatura. Também se encontra em concordância com os dados conhecidos, a presença de bandas correspondentes a estes microrganismos na presença de cobre; a base de dados do EMBL revela a existência de proteínas de resistência ao cobre nos dois casos.

A temperaturas mais elevadas, são identificados os gêneros *Brevibacillus* e *Geobacillus*. Isolados pertencentes a estes gêneros já foram descritos como importantes na mineralização do enxofre e azoto, produzindo sulfato e amônia (Portillo et al, 2012; Santana, não publicado (ver secção 6)) Atendendo à distribuição das sequências apresentada na tabela 5, poderão ser membros destes gêneros que intervêm na produção de amônio e sulfato, nos enriquecimentos a 50°C com e sem cobre. Em membros deste género, foi encontrado o gene codificante da molécula *chaperone CopZ*, responsável no efluxo de cobre (ver secção 8). É importante referir que o facto de se ter observado o aumento de intensidade de algumas bandas na presença de cobre, não significa que haja um estímulo à proliferação de um dado microrganismo pela ação direta do cobre, mas sim uma inibição da competição ao seu crescimento por parte de outros micróbios não resistentes.

Dentro das sequências obtidas, é de salientar, as correspondentes às bandas 8 e 9, com grande intensidade a NB80Cu500. A sequência da banda 9 é idêntica à sequência do isolado obtido (ver secção 3.2), alinhando exatamente entre as posições 201 e 449 pb desta última, e corroborando a abundância do isolado no enriquecimento mencionado. Por outro lado, é idêntica à de *Bacillus vallismortis*, uma espécie isolada a partir de dunas de areia no Vale da Morte, Califórnia. (Roberts *et al*, 1996). A sequenciação total do gene 16SrRNA do isolado irá revelar se esta espécie poderá também estar presente no solo húmido de um olival em Évora.

Tabela 5: Tabela resultante da análise conjunta da sequência e da intensidade relativa de bandas selecionadas no gel-Figura16

Bandas (amostras)		Resultados BLAST	Valor E	Amostras							Aumento da temperatura	Aumento de [Cu] no meio	
				NB30 Cu100	NB30 Cu500	NB50	NB50 Cu100	NB50 Cu500	NB80	NB80 Cu100	NB80 Cu500		
1	NB30 Cu100	Lysinibacillus fusiformis strain Ulm26	6e ⁻¹²⁶	+	(+)	(+)	(+)					↓	
2	NB30 Cu500	Bacillus cereus strain YAP13 Bacillus cereus strain SPD	6e ⁻¹²⁶	(-)	+							↓	↑
5	NB50 Cu500	Uncultured bacterium clone ncd957e10c1 Brevibacillus limnophilus strain DSM 6472	3e ⁻¹²³				(+)	+			(+)	↑	↑
6	NB50 Cu500	Uncultured bacterium clone ncd957e10c1 Brevibacillus limnophilus strain DSM 6472	2e ⁻¹²⁵	(-)	(-)	(+)	(+)	+			(-)	↑	
7	NB80 Cu500	Uncultured organism clone Anoxybacillus sp. 3nP4 Geobacillus sp. JAM-FM0901 Geobacillus sp. MKK-2005	2e ⁻¹²⁶					(-)		(+)	+	↑	↑
8	NB80 Cu500	Bacillus atrophaeus strain Uz1106 Bacillus subtilis QB928 Bacillus vallismortis strain UAC-21 Bacillus amyloliquefaciens strain UAC-19 Brevibacterium halotolerans strain UAC-13	7e ⁻¹²⁰				(-)	(-)		(+)	+	↑	↑
9	NB80 Cu500	Bacillus atrophaeus strain Uz1106 Bacillus subtilis QB928 Bacillus vallismortis strain UAC-21 Bacillus amyloliquefaciens strain UAC-19 [Brevibacterium] halotolerans strain UAC-13	2e ⁻¹²⁶	(+)	(-)	+	+		(-)	+	+	↑	

Nota: Os símbolos (+) e (-) simbolizam uma diminuição de intensidade e grande diminuição de intensidade, relativa ao total de bandas para cada poço, respetivamente

4.2.2. Subgrupo filogenético β -Proteobacteria

Foram efetuados géis de DGGE com os produtos de PCR resultantes da amplificação por *nested-PCR*, com os *primers* específicos para as β -Proteobacteria (figura 18).

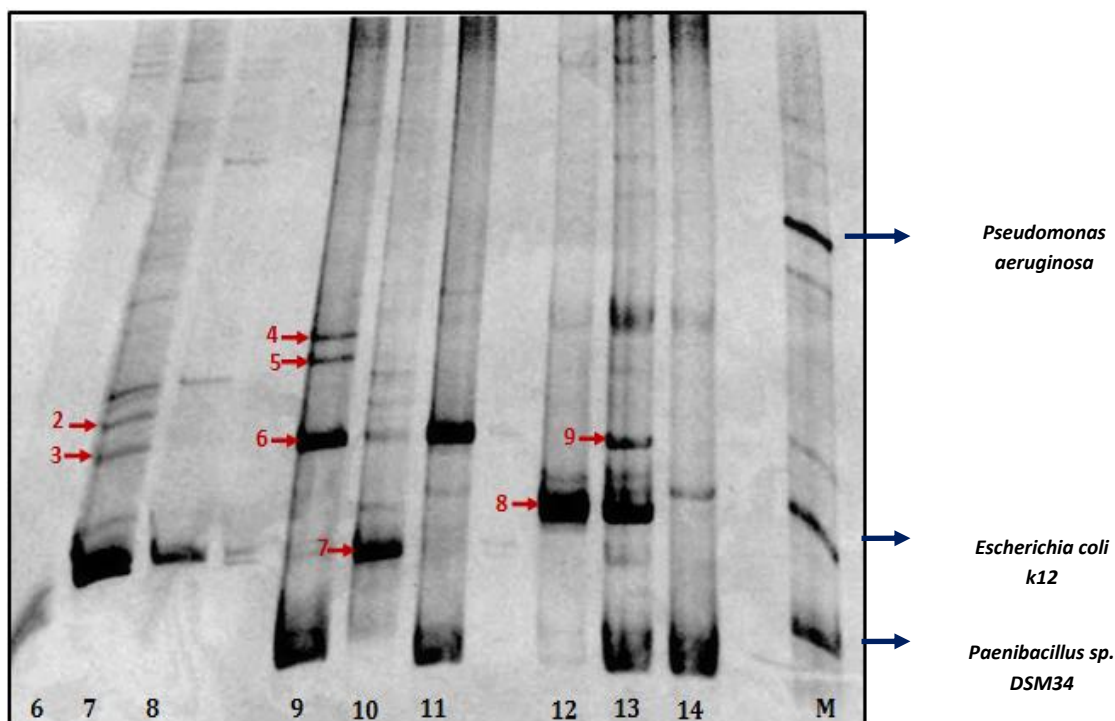


Figura 18: Gel de DGGE das amostras de DNA extraído dos enriquecimentos seletivos, amplificadas com o par de *primers* específicos para o subgrupo filogenético β -Proteobacteria

M – marcador composto por uma mistura bacteriana; 6 – NB30; 7 – NB30 Cu100; 8 – NB30 Cu500; 9 – NB50; 10 – NB50 Cu100; 11 – NB50 Cu500; 12 – NB80; 13 – NB80 Cu100; 14 – NB80 Cu500. As setas a vermelho representam as bandas que foram sequenciadas.

Foram escolhidas as bandas assinaladas para posterior sequenciação. A análise conjunta das sequências- com recurso ao *Blast*- e da sua intensidade relativa em cada enriquecimento-com recurso ao *ImageJ*®- permitiu a identificação preliminar dos microrganismos sob efeito da temperatura e do cobre (ver Tabela 6).

As identidades encontradas foram exploradas, pela consulta dos números de acesso fornecidos por *Blast*. O género *Massilia* pertence à classe β -Proteobacteria, ordem *Burkholderiales*, família *Oxalobacteraceae*. Esta inclui grande número de bactérias saprófitas, de enorme versatilidade; muitas são utilizadas como agentes de controlo antifúngico e de bioremediação, dada à sua capacidade de metabolização de inúmeros compostos orgânicos, incluindo herbicidas (*Sangodkar et al*, 1988). Os relatos sobre a resistência ao cobre por parte de membros da classe β -Proteobacteria são escassos. Recentemente foram isolados duas espécies de *Massilia* a partir de superfícies metálicas de cobre (*Espírito Santo et al*, 2010). Esta descoberta é

consistente com os nossos resultados, os quais incluíram o género *Massilia* nas sequências derivadas dos enriquecimentos com cobre.

Ochrobactrum foi um género igualmente identificado nas sequências obtidas. Surpreendentemente, apenas surge no enriquecimento efetuado a 50°C, não se tendo encontrado qualquer registo bibliográfico desse género a essa temperatura. Trata-se de um género da ordem *Rhizobiales*, família *Brucellacea*, cujos membros são quimiorganotróficos aeróbios. Contrariamente ao esperado é uma α -*Proteobacteria*, mas, *Muhling et al* (2008) obtiveram também com a estratégia de *nested-PCR* mencionada, 17% de sequências não-pertencentes ao grupo alvo β -*Proteobacteria*. A base de dados UniProt (EMBL) regista a presença de proteínas de resistência ao cobre similares ao sistema *Cop* já descrito (ver secção 8), também em *Ochrobactrum*. Este organismo também já foi detetado aquando do isolamento de bactérias oxidativas da amónia com metabolismo mixotrófico. Algumas espécies serão assim capazes de crescer sob modo heterotrófico e autotrófico, oxidando a amónia com produção de nitrito (*Kouki et al*, 2011). Assim, a proliferação de bactérias termofílicas poderá estar associada à proliferação de bactérias de crescimento mixotrófico, oxidando a amónia disponibilizada pelas primeiras.

Tabela 6: Tabela resultante da análise conjunta da sequência e da intensidade relativa de bandas, selecionadas no Gel-Figura 18

		Amostras											
Bandas (amostras)	Resultados BLAST	Valor E	NB30 Cu100	NB30 Cu500	NB50	NB50 Cu100	NB50 Cu500	NB80	NB80 Cu100	NB80 Cu500	Aumento da temperatura	Aumento de [Cu] no meio	
1	NB30	Não Determinado											
2	NB30 Cu100	Uncultured bacterium clone YJ-114 Massilia sp. C1804	1e ⁻⁷⁰	+		(+)			(-)		↓	↑	
3	NB30 Cu100	Unculture bacterium clone YJ-114 Massilia sp. C1804 Naxibacter sp. UFLAO 4-292	9e ⁻⁷²	+		(-)					↓	↑	
4	NB50	Similar a banda 5											
5	NB50	Ochrobactrum sp. FDK2 Ochrobactrum sp. He-Xw Uncultured bacterium isolate Uncultured beta proteobacterium	2e ⁻⁵⁵	(-)	+	(-)							
6	NB50	Ochrobactrum sp. FDK2 Ochrobactrum sp. He-Xw	2e ⁻⁶⁴		+	(+)	+		(+)		↑		
7	NB50 Cu100	Uncultured bacterium clone YJ-114 Massilia sp. C1804	9e ⁻⁷²	+	+	(-)	+		(-)			↑	
8	NB80	Pantoea agglomerans strain ZFJ-15	1e ⁻⁴⁷			(-)	(+)	+	(+)		↑		
9	NB80 Cu100	Ochrobactrum sp. FDK2 Ochrobactrum sp. He-Xw	3e ⁻⁶³		+	(+)	+		(+)		↑		

NOTA - a banda 5 apresenta comigração de duas sequências distintas. Os símbolos (+) e (-) simbolizam uma diminuição de intensidade e grande diminuição de intensidade, relativa ao total de bandas para cada poço, respetivamente

4.2.3. Subgrupo filogenético *Desulfovibrio/Desulfomicrobium*

Foram também efetuados géis de DGGE com os produtos de PCR resultantes da amplificação com os *primers* específicos para o subgrupo filogenético *Desulfovibrio/Desulfomicrobium* sobre o DNA extraído dos enriquecimentos (figura 19).

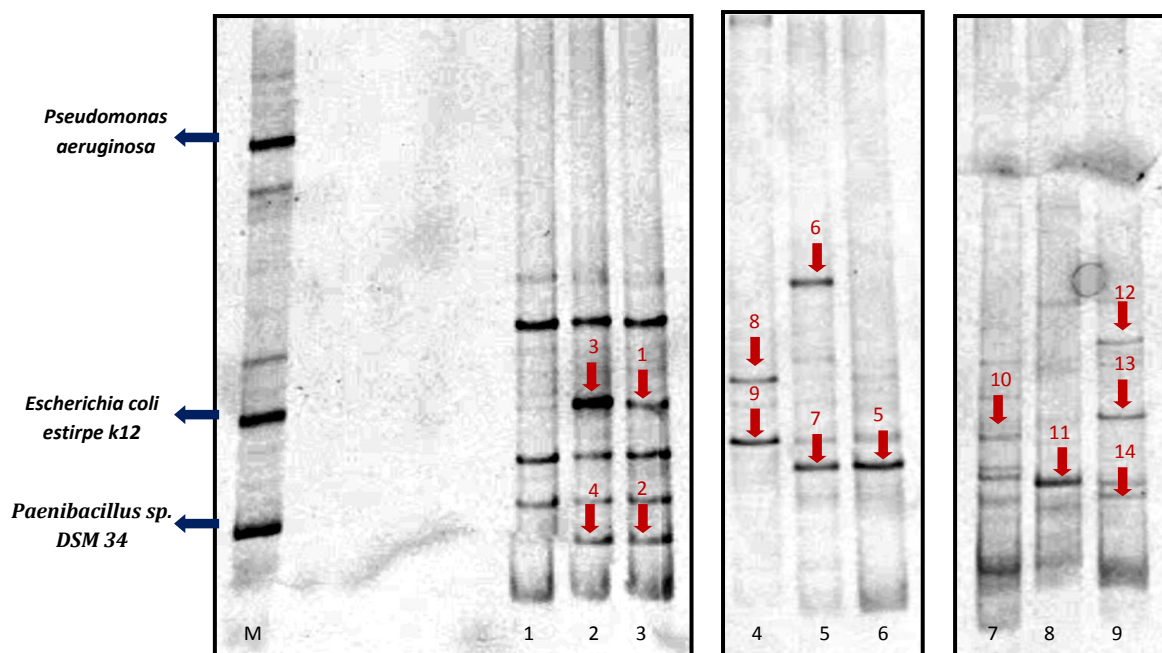


Figura 19: Montagem do gel de DGGE das amostras de DNA extraído dos enriquecimentos seletivos, amplificadas com o par de *primers* específicos para os géneros *Desulfovibrio/Desulfomicrobium*.

M – Marcador; 1 - NB30 Cu500; 2 - NB30 Cu100, 3 – NB30, 4 – NB50 Cu500; 5 – NB50 Cu100; 6 – NB50 C; 7 – NB80; 8 – NB80 Cu100; 9 – NB80 Cu500. As setas a vermelho representam as bandas que foram sequenciadas.

Foram escolhidas as bandas assinaladas para posterior sequenciação. Os resultados obtidos através da análise das sequências pelo *Blast*, foram, não obstante, distintos dos esperados. Obtiveram-se sequências correspondentes a microrganismos, todos eles da classe *Bacilli*, família *Paenibacillaceae*. Em particular, várias sequências mostravam identidade com membros do género *Paenibacillus*, género não detetado na estratégia prévia de *nested-PCR* usada para o *Phylum Firmicutes*. Verificou-se de facto, com uso do *Primer-Blast* (NCBI), que os *primers* DSV (ver secção 5.2) podem emparelhar com o gene 16SrRNA de *Brevibacillus* e *Paenibacillus*, originando um fragmento de tamanho similar ao esperado pelo emparelhamento com o gene 16SrRNA de membros do grupo-alvo. Esta observação está aliás associada à degenerescência dos *primers* usados. Assim, estes *primers* descritos por *Dar et al* (2005), na definição de uma estratégia para a deteção de baixos números de bactérias sulfato-redutoras em comunidades microbianas complexas, revelam-se úteis apenas quando usados para aquelas condições que favoreçam a proliferação de sulfato-

redutores. Este foi aliás, o caso estudado pelos autores, que analisaram a diversidade microbiana em reatores de tratamento de águas residuais.

Ao conjugar os resultados do *Blast* com os do *ImageJ*[®] (Tabela 7), várias informações importantes foram colhidas. Além da deteção de *Paenibacillus sp.*, como acima mencionado, anaeróbios facultativos, mesofílicos e esporulantes, frequentemente encontrados no solo, em particular na rizosfera, encontrámos membros do género *Brevibacillus*, com um padrão de resposta similar ao observado anteriormente (ver tabela 5). De reparar por exemplo, nas sequências das bandas 8 e 9, reportando identidade a *Brevibacillus*, presentes nos enriquecimentos a 50°C e na presença de cobre, tal como já tinha sucedido quando da análise em 4.2.1.

Apenas uma banda (banda 11) correspondia a uma sequência de um clone bacteriano não cultivado, a qual pode corresponder a um membro do género *Desulfomicrobium*.

Tabela 7: Tabela resultante da análise conjunta da sequência e da intensidade relativa de bandas, selecionadas no Gel-Figura 19

Amostras													
Bandas (amostras)	Resultados BLAST	Valor E	NB30	NB30 Cu100	NB30 Cu500	NB50	NB50 Cu100	NB50 Cu500	NB80	NB80 Cu100	NB80 Cu500	Aumento da temperatura	Aumento de [Cu] no meio
3	NB30 Cu100	Não determinado											
4	NB30 Cu100	Paenibacillus sp. CAU1055 Paenibacillus glebae strain EA14	3e ⁻⁶⁶	+	+	(-)						↓	
5	NB50	Brevibacillus borstelensis strain MA5	8e ⁻⁷³			+	(+)					↑	
6	NB50 Cu100	Paenibacillus residui strain R8-313 Paenibacillus sp. R-27413	3e ⁻⁶⁶		(-)		+	(-)				↑	↑
7	NB50 Cu100	Brevibacillus borstelensis strain MA5	1e ⁻⁷¹			+	(+)					↑	
8	NB50 Cu500	Uncultured bacterium clone ncd957e10c1	1e ⁻⁷¹			(+)	(+)	+	(-)			↑	↑
9	NB50 Cu500	Uncultured compost bacterium partial Brevibacillus limnophilus strain E10	2e ⁻⁵⁹			(+)	(+)	+		(-)		↑	↑
10	NB80	Brevibacillus sp. enrichment culture clone phylotype P25	3e ⁻⁶⁷			(+)				+		↑	
11	NB80 Cu100	Uncultured bacterium clone 65_51	2e ⁻⁷³					(-)		+	(+)	↑	
12	NB80 Cu500	Não determinado											
13	NB80 Cu500	Não determinado											
14	NB80 Cu500	Paenibacillus barengoltzii 16S	3e ⁻⁷²			(-)	(-)			(-)	+	↑	↑

NOTA: Os símbolos (+) e (-) simbolizam uma diminuição de intensidade e grande diminuição de intensidade, relativa ao total de bandas para cada poço, respectivamente

Conclusões e perspectivas futuras

A descoberta recente do papel das bactérias termofílicas como produtoras de amónio e sulfato, incita a vários estudos sobre a sua potencial aplicação como bio-fertilizantes ou adjuvantes na fertilização dos solos e a considerá-las como elementos de importância na elaboração de futuros modelos agrícolas, mais sustentáveis. Num trabalho recente, *Santana et al*, (não publicado) mostraram um efeito do sobrenadante de cultura de alguns isolados termofílicos do *Phylum Firmicutes*, na estimulação da germinação de sementes de *Nicotiana benthamiana in vitro*. É assim possível conceber uma utilização para as bactérias termofílicas a médio prazo, em ambientes controlados, como em estufa, e em etapas iniciais do desenvolvimento de plantas agrícolas. Contudo, o seu uso direto em solos agrícolas requer um estudo deveras aprofundado. Esse estudo deve ter em consideração a influência de vários fatores físico-químicos, aqueles inerentes à composição mineral do solo e fatores climáticos, bem como fatores associados à quantidade, atividade e diversidade microbiana do solo, que agem sobre os primeiros.

Será sempre impossível de compreender a interação global entre os vários microrganismos do solo, mas é possível visar grupos específicos e realizar inúmeros ensaios em campo, quando for desejada uma futura aplicação dos resultados laboratoriais. Assim, na execução deste trabalho focamo-nos sobre grupos taxonómicos de interesse: as bactérias termofílicas supramencionadas, e as bactérias oxidativas de amónia (*β -Proteobacteria*) e redutoras de sulfato (*Desulfovibrio* e *Desulfomicrobium*), potencialmente competidoras com as plantas na absorção de amónio e sulfato, respetivamente, estes produzidos pelas primeiras. Foi estudado o efeito da temperatura e do cobre sobre a dinâmica desses grupos. A temperatura tem uma importância evidente sobre a proliferação das bactérias termofílicas. O cobre, amplamente usado como elemento fitossanitário, a maioria das vezes sob a forma de sulfato de cobre, pode ser extremamente tóxico como referido na secção 8. As alterações na comunidade microbiana foram avaliadas sobre enriquecimentos seletivos, obtidos a partir de uma amostra composta de solo de olival, visando primariamente o enriquecimento em bactérias termofílicas presentes na amostra. A técnica molecular de *fingerprint* – PCR-DGGE, foi a utilizada para tal estudo, já que constitui uma ferramenta poderosa no estudo da diversidade microbiana, ao permitir incluso a identificação de membros da comunidade, impossíveis de obter com os tradicionais métodos de cultivo.

Entre os resultados obtidos, consequentes a esta análise, são importantes de referir:

- O aumento da temperatura e do cobre permitiram a proliferação de membros do *Phylum Firmicutes*, dos géneros *Bacillus*, e em particular de *Brevibacillus*, géneros com genes codificantes de proteínas resistentes ao cobre. Estes são também os géneros reportados como produtores de amónio e sulfato, o que mostrou que o tratamento com cobre (o qual foi usado nos ensaios em teor similar ao encontrado no solo sob tratamento) não foi limitativo para o crescimento destes microrganismos.
- O teor de sulfato produzido foi aumentado a temperatura mais elevada, e em particular à maior concentração de cobre utilizada, mostrando que o tratamento com cobre não limita a produção de sulfato. Esse aumento, concomitante à atividade dos géneros *Bacillus* e *Brevibacillus* detetados, poderá estar associado a um mecanismo de *stress* despoletado pelo cobre, já que um isolado produtor de sulfato, obtido a partir de um enriquecimento à concentração de 500 µM de cobre, mostrou uma diminuição do rendimento de crescimento.
- O tratamento com cobre não influencia a produção total de amónia, a qual é similar nos vários enriquecimentos.
- A maior proliferação das bactérias termofílicas produtoras de sulfato e amónia a temperatura mais elevada levou também à deteção de *Proteobacteria* (género *Ochrobactrum*) capazes de utilizar amónio em crescimento mixotrófico.

Estes dados sugerem algumas estratégias a ter em conta no tratamento dos solos agrícolas com cobre. Se considerarmos o potencial das bactérias termofílicas na fertilização e que estas incluem membros resistentes ao cobre, então uma aplicação preventiva deste elemento durante um período sazonal quente, teria menos impacto sobre a população termofílica do solo, a qual, embora resistente ao cobre, terá um fator limitante adicional ao seu crescimento durante uma estação fria (o fator temperatura). Dado que a proliferação das bactérias termofílicas incentivar a proliferação de populações mixotróficas com a conseqüente formação de nitrito e nitrato, o uso potencial destas espécies endógenas como fertilizantes seria mais adequado para as culturas agrícolas que utilizem o nitrato, bem como a amónia.

Pretendemos, num futuro próximo, repetir ensaios de DGGE similares, todavia com recurso a *primers* para genes codificantes de enzimas, como os genes codificantes da amónia monooxigenase (AMO) e da sulfito reductase (DSR), para deste modo proceder a uma análise comparativa, bem como a eliminar a frequente comigração nos géis de DGGE, associada à existência de cópias múltiplas dos genes de RNA ribossomal. Também perspetivamos a elaboração de bancos genómicos a partir do DNA extraído dos enriquecimentos, e a utilização dos fragmentos sequenciados como sondas a hibridar nesses bancos, de modo a obter a sequência total dos genes

16SrRNA aqui amplificados parcialmente. Por fim, a realização de PCR quantitativo em tempo real, com recurso a *primers* específicos para os géneros aqui determinados fornecerá uma informação mais completa sobre a sua interdinâmica.

Referências Bibliográficas

Ahmed, I., A Yokota, A., Yamazoe, A., Fujiwara, T. (2007): "Proposal of Lysinibacillus boronitolerans gen. nov. sp. nov., and transfer of Bacillus fusiformis to Lysinibacillus fusiformis comb. nov. and Bacillus sphaericus to Lysinibacillus sphaericus comb. nov". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, p. 1117–1125

Appl, M. (2006): "Ammonia. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, DOI: 10.1002/14356007.a02_143.pub2.

Benites, V., Madari, B. (2003):" Extração e Fracionamento Quantitativo de Substâncias Húmicas do Solo". *Embrapa Solos*. Rio de Janeiro, Brasil.

Bradford, M. M. (1976):"Protein Concentration Determination by the Bradford Assay". *Analysis Biochemical*. 72, p. 248.

Brady, N., Weil, R. (2010): *Elements of the Nature and Properties of Soil*. Upper Saddle River, NJ.Prentice-Hall Inc.

Chillappagari, S., Miethke, M., Trip H., Kuipers O. P., Marahiel, M. A. (2009): "Copper Acquisition Is Mediated by YcnJ and Regulated by YcnK and CsoR in *Bacillus subtilis*", *J. Bacteriol*. 2009, 191, (7), p. 2362-2370.

Cha. J., Cooksey, D.A. (1993):" Copper hypersensitivity and uptake in *Pseudomonas syringae* containing cloned components of the copper resistance operon". *Appl Environ Microbiol*, 59, p. 1671–1674.

Cha. J., Cooksey, D.A. (1991):"Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* ,Vol. 88, p. 8915-8919

Correia, A. (1986):" Bioquímica dos Solos, nas Pastagens e Forragens". *Edições da Fundação Calouste Gulbenkian*. Porto. p. 789

Dahllof I., Baillie H., Kjelleberg S. (2000): "rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity". *Appl. Environ. Microbiol*, 66, p. 3376-3380.

Daly, K., Sharp, R., McCarthy, A. (2000): "Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria". *Microbiology*, 146, p. 1693-1705.

Dar, S. A., Yao, L., Dongon, U., Kuenen, J.G., Muyer, G. (2007):" Analysis of Diversity and Activity of Sulfate-Reducing Bacterial Communities in Sulfidogenic Bioreactors

Using 16S rRNA and dsrB Genes as Molecular Markers". *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 73, No. 2, p. 594-604.

Dar, S., Kuenen, G., Muyzer, G. (2005): "Nested PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Approach To Determine the Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in Complex Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*", Vol. 71, No 5, p. 2325-2333

De Boer, W., Tietema, A., Klein Gunnewiek, P.J.A., Laanbroek, H.J. (1992): "The autotrophic ammonium-oxidizing community in a nitrogen-saturated acid forest soil in relation to pH-dependent nitrifying activity". *Soil Biology & Biochemistry* 24, p. 229-234.

De Boer, W., Kowalchuk, G.A. (2001): "Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms". *Soil Biology & Biochemistry* 33, p. 853-866

Dineen, S.M., Aranda, R., Anders, D.L., Robertson, J.M. (2010): "An evaluation of commercial DNA extraction kits for the isolation of bacterial spore DNA from soil". *Journal of Applied Microbiology* 109, (6), p. 1886–1896

Dilling, W., Cypionka, H. (1990). "Aerobic respiration in sulphate-reducing bacteria". *Arch. Microbiol.* 71, p. 123–128

Eriksen, J. (1996): "Incorporation of S into soil organic matter in the field as determined by the natural abundance of stable S isotopes". *Biol. Fertil. Soils.* 22, p. 149-155.

Eriksen, J. (2008): "Soil sulfur cycling in temperate agricultural systems". Em: Jez J (ed) Sulfur: a missing link between soils, crops and nutrition. *American Society of Agronomy Inc.*, Madison, WI, p. 25–44

Espírito Santo, C., Morais, P. V., Grass, G. (2010): "Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic copper surfaces". *Applied and Environmental Microbiology*, 76, p. 1341-1348.

Ghani, A., McLaren, R. G., Swift, R. S. (1993): "Mobilization of recently-formed soil organic sulphur". *Soil Biol. Biochem.*, 25, p. 1739-1744.

Ghosh, W., Dam B. (2009): "Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfuroxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and Archaea". *FEMS Microbiol Rev.*, 33 p. 999–1043

Gonzalez, J. M., Portillo, M.C. (2012): "Microbial organic-S oxidation in terrestrial environments is enhanced by global warming". *Instituto de Recursos Naturais e Agrobiologia, Sevilha, Espanha.*

Gonzalez, J., Portillo, M., Belda-Ferre, P., Mira, A. (2012): "Amplification by PCR Artificially Reduces the Proportion of the Rare Biosphere in Microbial Communities." *PLoS ONE*. Vol. 7.

Green, S. (2005): "A guide to Denaturing Gradient Gel Electrophoresis". Version 2.

Huber, C., Loy, A., Nickel, M., Arnosti, C., Baranyi, C., Brüchert, V., Ferdelman, T., Finster, K., Christensen, F. M., de Rezende, J. R., Vandieken, V., Jørgensen, B. B. (2009) "A constant flux of diverse thermophilic bacteria into the cold arctic seabed". *Science*, 325, p. 1541–1544

Huber, C., Arnosti, C., Brüchert, V., Loy, A., Vandieken, V., Jørgensen, B. B. (2010) "Thermophilic anaerobes in arctic marine sediments induced to mineralize complex organic matter at high temperature". *Environ Microbiol*, 12, p. 1089–1104

Janssen, P. (2006): "Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes". *Applied and Environmental Microbiology*, 72, p. 1719–1728.

Jones, D. L. (1999): "Amino acid biodegradation and its potential effects on organic nitrogen capture by plants". *Soil Biology and Biochemistry*, 31, p. 613–622

Jones, D.L., Healey, J.R., Willett, V. B., Farrar, J. F., Hodge, A. (2005): "Dissolved organic nitrogen uptake by plants—an important N uptake pathway?" *Soil Biology & Biochemistry*, 37, p 413–423

Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K. H., Pommerening-Roser, A., et al. (1998): "Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations". *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, p. 3042–51

Kartal, B., Koleva, M., Arsov, R., van der Star, W., Jetten, M.S.M., Strous, M. (2006): "Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater". *J Biotechnol*, 126, p. 546–553

Khammar, N., Malhautier, L., Degrange, V., Lensi, R., Godon, J.J., Fanlo, J.L. (2005): "Link between spatial structure of microbial communities and degradation of a complex mixture of volatile organic compounds in peat biofilters". *J Appl Microbiol*, 98, p. 476–490.

Kiikkila, O., Pennanen, T., Pietikainen, J., Hurme, K.R., Fritze, H.. (2000). "Some observations on the copper tolerance of bacterial communities determined by (3H)-thymidine incorporation method in heavy metal polluted humus". *Soil Biology and Biochemistry*. 32(6), p. 883–885.

Kolmert, A., Wikström, P., Hallberg, K. B. (2000): "A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures". *Journal of Microbiological and Methods*, 41, p. 179-184.

Konstantinidis, K.T., Isaacs, N., Fett, J., Simpson, S., Long, D.T. & Marsh T.L. (2003): "Microbial Diversity and Resistance to Copper in Metal-Contaminated Lake Sediment". *Microbial Ecology*, 45, (2), p. 191-202

Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R. (2001): "AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA: A Model for Molecular Microbial Ecology". *Annu. Rev. Microbiol.*, 55, P. 485–529

Krekeler, D., Sigalevich, P., Teske, A., Cohen, Y., Cypionka, H. (1997):" A sulfate-reducing bacterium from the oxic layer of a microbial mat from Solar Lake (Sinai), *Desulfovibrio oxycloinae* sp". *Nov Arch Microbiol*, 167, p. 369-375.

Kouki, S., Saidi, N. (2011): "Isolation and characterization of facultative mixotrophic ammonia-oxidizing bacteria from constructed wetlands". *J. Env. Sci*, 23, p. 1699-1708.

Lim, C. K., Cooksey, D. A. (1993):"Characterization of chromosomal homologs of the plasmid-borne copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*". *Journal of Bacteriology*. 175(14), p. 4492-4498.

Lejon, D.P.H., Pascault, N., Ranjard, L. (2010):" Differential copper impact on density, diversity and resistance of adapted culturable bacterial population according to 8026soil organic status". *European Journal of Soil Biology*, 46(2), p. 168-174.

Macomber, L., Imlay, J.A. (2009):" The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 108, p. 8344-8349.

Madigan, M., Martinko, J.M., Parker, J. (2003): Brock biology of microorganisms. 11ª Edição. Prentice Hall Inc., New Jersey.

Manual de fertilização das culturas (2ª Edição) (2006). Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva. Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, MADRP. Lisboa. p. 282.

Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T. J., Berzano, M. (2002): "The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments." *Environ. Microbiol.* Vol.4, p. 595-602.

Marchant, R., Franzetti, A., Pavlostathis, S. G., Tas, D. O., Erdbrügger, I., Unyayar, A., Mazmanci, M. A., Banat, I. M. (2008): "Thermophilic bacteria in cool temperate soils: are they metabolically active or continually added by global atmospheric transport ?". *Appl Microbiol Biotechnol* , 78, p. 841–852

- Marschner, H. (1995) "Mineral Nutrition of Higher Plants". London: Academic Press
- Meincke, M., Kreig, E., Bock, E. (1989): "Nitrosovibrio spp., the dominant ammonia oxidizing bacteria in building stones." *Appl. Environ. Microbiol.* 55, p. 2108–2110
- Meincke, M., Bock, E., Kastrau, D., Kroneck, P. M. H. (1992). "Nitrite oxidoreductase from Nitrobacter hamburgensis: redox centers and their catalytic role". *Arch Microbiol.*, 158, (2), p. 127–131
- Meyer, B., Kuever, J. (2007): "Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-59 phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes – origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway". *Microbiology*, 153, p. 2026–2044
- Mühling, M., Woolve-Allen, J., Murrell, J., Joint, I. (2008): "Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities". *International Society for Microbial Ecology*. Paper 2, p. 379-392.
- Muyzer, G., Waal, E., Uitterlinden, A. (1993): "Prolifiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA". *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59, número 3, p. 695-700.
- Muyzer, G., Stams, A.J.M.(2008):" The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria". *Nature Reviews – Microbiology*, 26, p. 441-454
- Mutzel, A., Reinscheid, U. M., Antranikian, G., Müller, R (1996):" Isolation and characterization of a thermophilic Bacillus strain that degrades phenol and cresols as sole carbon and energy source at 70°C". *Appl Microbiol Biotechnol* , 46, p. 593–596
- NanoDrop Products – Spectrophometers and Fluorospectrometers, ThermoScientific Inc. (2012) (www.nanodrop.com).
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., Setlow, P. (2000):" Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, p. 548–572
- Portillo, M.C., Gonzalez, J.M. (2008): "Microbial communities and immigration in volcanic environments of Canary Islands (Spain)". *Naturwissenschaften.*, 95, p. 307-315.
- Portillo, M.C., Santana, M., Gonzalez, J.M. (2011): "Presence and potential role of thermophilic bacteria in temperate terrestrial environments". *Naturwissenschaften.*, 99, p. 43-53.

Postgate, J.R. (1984) *The Sulphate-Reducing Bacteria* (2nd ed.) Cambridge University Press, Cambridge, London

Ramsing, N. B., Kühl, M. & Jørgensen, B. B. (1993):" Distribution of sulfate-reducing bacteria, O₂, and H₂S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes". *Appl. Environ. Microbiol.* 59, p. 3840–3849

Ridge, P. G., Zhang, Y., Gladyshev, V.N. (2008) "Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen". *PLoS One*, 3,(1), p. 1378

Roberts, M. S., Nakamura, L. K., Cohan, F. M. (1996): "Bacillus vallismortis sp. nov., a close relative of Bacillus subtilis, isolated from soil in Death Valley, California" *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, p. 470-475.

Rotthauwe, J., Witzel, K., Liesack, W. (1997). "The Ammonia Monooxygenase Structural Gene amoA as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations". *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 63, No 12, p. 4704-4712.

Rodriguez, L. M., Alatosava, T. (2010):"Effects of copper on germination, growth and sporulation of Clostridium tyrobutyricum". *Food Microbiology*, 27, p. 434 - 437

Saffary, R., Nandakumar, R., Spencer, D., Robb, F. T., Davila, J. M., Swartz, M., Ofman, L., Thomas, R. J., DiRuggiero, J. (2002):"Microbial survival of space vacuum and extreme ultraviolet irradiation: strain isolation and analysis during a rocket flight". *FEMS Microbiol Lett.*, 215 (1), p. 163-168

Sangodkar, U., Chapman, P., Chakrabarty, A. (1988): "Cloning physical mapping and expression of chromosomal genes specifying degradation of the herbicide 2,4,5-T by Pseudomonas cepacia ". *AC110*, 71, p. 267-277.

Santana, M., Portillo, M. C., Gonzalez, J. M., Clara, I. "Characterization of new soil thermophilic bacteria potentially involved in soil fertilization". *J. Plant Nut&Soil Sci.* In press.

Sauvé, V., Bruno S., Berks B.C., Hemmings, A.M. (2007):"The SoxYZ complex carries sulfur cycle intermediates on a peptide swinging arm". *J Bio Chem.*, 282, p. 23194-23204

Singer, M.J., Munns, D.N. (1987):" Soils: An Introduction". New York, NY: Macmillan Publishing

Sklarz, M., Angel, R., Gillor, O., Soares, MIM. (2009):" Evaluating amplified rDNA restriction analysis assay for identification of bacterial communities". *Ant van Leeuwenhoek* , 96, p. 659–664

Solioz, M., Stoyanov, J.V. (2003):" Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*." *FEMS Microbiol Rev*, 27, p. 183–195.

Solioz, M., Abicht, H. K., Mermoud, M. (2010): "Response of Gram-positive bacteria to copper stress". *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15, p. 3-14.

Stahl, D.A., Fishbain, S., Klein, M., Baker, B., Wagner, M. (2002): "Origins and diversification of sulfate-respiring microorganisms". *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, p. 189–195

Suzuki, I., Dular, U., Kwok, S. C. (1974):" Ammonia or Ammonium Ion as Substrate for Oxidation by *Nitrosomonas europaea* Cells and Extracts". *J. Bacteriol.*, 120(1), p. 556-558

Teske, A., Alm, E., Regan, J. M., Toze, S., Rittmann, B. E., Stahl, D. A. (1994): "Evolutionary relationships among ammonia and nitrite-oxidizing bacteria". *J. Bacteriol.*, 176(21), p. 6623.

Torsvik, V., Goksøyr, J., Daae, F. L. (1990): "High diversity in DNA of soil bacteria". *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (3), p. 782 – 787.

Von Wirén, N., Gazzarrini, S., Frommer, W. B. (1997): "Regulation of mineral nitrogen uptake in plants". *Plant and Soil*, 196, p. 191-199

Wagner, M., Roger A. J., Flax JL, Brusseau GA & Stahl DA (1998):" Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration". *J. Bacteriol*, 180, p. 2975–2982.

Whitehead, T. R., Cotta, M. A. (2004):" Isolation and identification of hyper-ammonia producing bacteria from swine manure storage pits". *Curr. Microbiol.* 48, p. 20-26.

Wiegel, J., Ljungdahl, L. G. , Rawson, J. R. (1979):" Isolation from soil and properties of the extreme thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum*". *J Bacteriol*, 139, p. 800–810

Willey, J., Sherwood, L., Woolverton, C. (2009): *Precott's Principles of Microbiology*. McGraw-Hill Higher Education.

Anexos

i. Tabelas referentes à quantificação de sulfato e amónia nos enriquecimentos

Tabela 8 - Quantificação de amónio nos enriquecimentos.

Stock (mM)	Média [NH ₄] mM	Desvio padrão (±)	Média [NH ₄]/(CFU/ml)	Desvio padrão (±)
NB30	8.048	0.365836523	1.13349E-08	5.15263E-10
NB50	7.628	1.852541115	7.62812E-09	1.85254E-09
NB80	5.579	1.27166156	1.85977E-07	4.23887E-08
NB 30 Cu100	7.990	1.827855889	3.99484E-07	9.13928E-08
NB50 Cu100	8.228	2.008670577	8.22846E-09	2.00867E-09
NB80 Cu100	4.852	1.411358757	Não determinado	
NB30 Cu500	7.777	1.229623121	2.59223E-07	4.09874E-08
NB50 Cu500	7.297	1.507482157	2.43233E-07	5.02494E-08
NB 80 Cu500	4.267	1.401566585	1.42239E-07	4.67189E-08

Tabela 9 - Quantificação de sulfato nos enriquecimentos

Stock (mM)	Média [SO ₄ ²⁻] mM	Desvio padrão (±)	Média [SO ₄ ²⁻]/(CFU/ml)	Desvio padrão (±)
NB30	0.287	0.153512882	4.0359E-10	2.16215E-10
NB50	0.392	0.171473394	3.9225E-10	1.71473E-10
NB80	0.615	0.092744125	2.0486E-08	3.09147E-09
NB 30 Cu100	0.288	0.089236876	1.4405E-08	4.46184E-09
NB50 Cu100	0.238	0.178120198	2.3795E-10	1.7812E-10
NB80 Cu100	0.735	0.301298199	Não determinado	
NB30 Cu500	2.254	0.025950819	7.5145E-08	8.65027E-10
NB50 Cu500	2.219	0.035143207	7.3962E-08	1.17144E-09
NB 80 Cu500	1.271	Não determinado	4.2368E-08	Não determinado

ii. Sequência do 16S rDNA do isolado

Tabela 10 – Sequência 16S rDNA do isolado obtido a partir do enriquecimento.

Amostra	Sequência
Isolado	<p> <u>AG</u>TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTC GAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT AAAGGGCTCGCAGGCGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGG GGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAGTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTC CACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGC GACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGT TTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG TCGCAAGACTGAAACT </p>

iii. Sequências das bandas recolhidas do gel DGGE

a. Firmicutes

Tabela 11 - Sequências obtidas a partir das bandas recolhidas do gel de DGGE.

Bandas	Amostras	Sequências
1	NB30 Cu100	CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGA AAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGC AGAAGAGGAAAGTGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATITGG AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCG CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG*
2	NB30 Cu500	CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA AGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCA GAAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGGA GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGC GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
5	NB50 Cu500	CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTGTTA AAGCCCGGGGCTCAACCCGGTACGCATCGGAACTGTGTAGCTTGAGTGCA GAAGAGGAAAGCGGTATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGRCTYTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCG CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
6	NB50 Cu500	CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTGTTA AAGCCCGGGGCTCAACCCGGTACGCATCGGAACTGTGTAGCTTGAGTGCA GAAGAGGAAAGCGGTATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCG CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
7	NB80 Cu500	CCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGA AAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGAGTGC AGAAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
8	NB80 Cu500	CCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCKCGCAGGCGGTTYCTTAAGTCTGATGTGA AAGCCCGGGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGAGTGC AGAAGAGGAGAGYGGAAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGRCTCTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGM GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
9	NB80 Cu500	CCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGA AAGCCCCGGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGAGTGC AGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGA GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG

NOTA – a sublinhado encontra-se a sequência do *primer Reverse* (785R) usada na amplificação por PCR das bandas recolhidas.

b. β -Proteobacteria

Tabela 12 - Sequências obtidas a partir das bandas recolhidas do gel de DGGE.

Bandas	Amostras	Sequências
1	NB30	-
2	NB30 Cu100	TAAATCGGAAATTACTGGGCGTAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGTAAGTC TGTCGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCGATGGAGACTGC AAGGCTTGAATCTGGCAGWGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGT GAAATGCGT
3	NB30 Cu100	TAAATCGGAAATTACTGGGCGTAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGTAAGTC TGTCGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCGATGGAGACTGC AAGGCTTGAATCTGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTG AAATGCGT
4	NB50	Similar a banda 5.
5	NB50	TCCGGAATTATTGGGCGTAAGCGYGCGCAGGCGGYTMTGTAAGTCT GGTGTAAAGCCCSGGGCTCAACCCCGTTTCGCATCGGAAACTGTGTA GCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGTATTCCMCGTGRKCASTGAAA TGCCT
6	NB50	TCCGGAATTATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTG GTGTAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGTTTCGCATCGGAAACTGTGTAG CTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGTATTCCACGTGTAGCAGTGAAT GCGT
7	NB50 Cu100	TAAATCGGAAATTACTGGGCGTAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGTAAGTC TGTCGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCGATGGAGACTGC AAGGCTTGAATCTGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTG AAATGCGT
8	NB80	TCCGGAATTATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGCGGTCTGGGTAAGTCT GATGTCAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTACGCATTGGAAACTGCTCG ACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCAGTGA TGCCT
9	NB80 Cu100	TCCGGAATTATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTG GTGTAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTTTCGCATCGGAAACTGTGTAG CTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGWATTCCACGTGTAGCAGTGAAT GCGT

NOTA – a sublinhado encontra-se a sequência do *primer Reverse* (682R) usada na amplificação por PCR das bandas recolhidas.

c. *Desulfovibrio/Desulfomicrobium*

Tabela 13 - Sequências obtidas a partir das bandas recolhidas do gel de DGGE.

Bandas	Amostras	Sequências
3	NB30 Cu100	-
4	NB30 Cu100	GYCKGAMTARAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAARGTTTTCGGATCGT AAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTTGGGAGAGTAACTGCTCTCAA GGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAAT*
5	NB50	SAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTG TAAAGTTCTGTTGTCAGAGACGAACAAGTACCGTTCGAACAGGGCGGT ACCTTGACGGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCARCA GCCGCGGTAAT
6	NB50 Cu100	GCCTGACAGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTA AAACTCTGTTGCCAGAGAAGAAAGCTAAGGAGAGTCACTGCTCTTGG TTGACGGTATCTGARAAGAAAGCCCCGGCTAACTACSTGCCAGCAGCC SCGGTAAT
7	NB50 Cu100	GTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAARGTCTTCGGATTGTAA AGTTCTGTTGTCAGAGACGAACAAGTACCGTTCGAACAGGGCGGTACC TTGACGGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC GCGGTAAT
8	NB50 Cu500	GAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAARGTCTTCGGATT GTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACAAGTACTGTTCGAATARGGCAG TACCTTGACGGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGGTAAT
9	NB50 Cu500	GCGGAATAAGSACGCCGCGTGACGATKATAGTCTTCGGATTGTAAAG TTCTGTTGTCAGGGACGAACAAGTACCGTTTGAACAAGGCGGTACCTT GACGGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG CGGTAAT
10	NB80	GAAGGAGCAACGCCGCGTGAACGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGT TCTGTTGTCAGGGACGAACAAGTACCGTTCGAACAGGGCGGTACCTTG ACGGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACTAAGTGCCAGCAGCCGC GGTAAT
11	NB80 Cu100	GACGAAAGTCTGATGAAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAAGTCTTCG GATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACAAGTACCGTTCGAACAGG GCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC CAGCAGCCGCGGTAAT
12	NB80 Cu500	-
13	NB80 Cu500	-
14	NB80 Cu500	AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCG TAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGARGTCCGTTAGAGTAACTGCTAACG GAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCA GCCGCGGTAAT

NOTA – a sublinhado encontra-se a sequência do *primer Reverse* (518R) usada na amplificação por PCR das bandas recolhidas.