

DANIEL BEDO ASSUMPÇÃO CASTRO

Análise metagenômica da microbiota de solos de ambientes de mina de cobre

CAMPINAS

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Daniel Bedo Assumpção Castro

Análise metagenômica da microbiota de solos de ambientes de mina de cobre

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Genética de Microorganismos.

ORIENTADORA: Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni CO-ORIENTADOR: Dr. Renato Vicentini dos Santos

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO DANIEL BEDO ASSUMPÇÃO CASTRO, E ORIENTADO PELA PROFA. DRA. LAURA MARIA MARISCAL OTTOBONI.

Jaura m. M. Otteloni

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2015

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Biologia Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C279a	Castro, Daniel Bedo Assumpção, 1990- Análise metagenômica da microbiota de solos de ambientes de mina de cobre / Daniel Bedo Assumpção Castro. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.
	Orientador: Laura Maria Mariscal Ottoboni. Coorientador: Renato Vicentini dos Santos. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	1. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala. 2. Metagenômica. 3. Bactérias. 4. Genomas. 5. Cobre. I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal. II. Vicentini, Renato. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Metagenomic analysis of the microbiota associated with copper mine environments Palavras-chave em inglês: High-throughput nucleotide sequencing Metagenomics

Bacteria Genomes Copper Área de concentração: Genética de Microorganismos Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular Banca examinadora: Laura Maria Mariscal Ottoboni [Orientador] Valéria Maia de Oliveira Edmilson Ricardo Gonçalves Data de defesa: 14-08-2015 Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular Campinas, 14 de agosto de 2015

BANCA EXAMINADORA

Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni (Orientadora)

Dra. Valéria Maia Merzel

Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves

Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini

Dr. Marco Aurélio Takita

Assinatura

Assinatura

Jaura m. m. Ottobeni

Assinatura

ssinatura

Assinatura

RESUMO

Várias pesquisas buscam compreender a diversidade e distribuição das comunidades microbianas na drenagem de mina, porém poucos estudos visam avaliar os genomas presentes em ambientes de mineração de cobre, sobretudo em relação a drenagem neutra e a pilha de minério que a forma. Assim, avaliações metagenômicas, de duas amostras de solos contaminados com drenagem neutra de mina e três amostras de solos de pilha de cobre, foram realizadas para identificação de genes e rotas metabólicas de interesse biotecnológico, industrial e ambiental. Todas as amostras analisadas foram obtidas na mina do Sossego e, as análises químicas das amostras apresentaram pH alcalino e grandes teores de cobre e níquel. A anotação taxonômica dos metagenomas apresentou predominância de sequências associadas aos filos Proteobacteria e Actinobacteria. Diferentemente de metagenomas de outras minas, os metagenomas da mina do Sossego revelaram maior porcentagem de sequências relacionadas ao filo Cyanobacteria. As análises estatísticas dos cinco metagenomas revelaram que as amostras de pilha de cobre estão enriquecidas com genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos, as quais estão relacionadas com a obtenção de carbono e nitrogênio. A metagenômica comparativa dos metagenomas do presente trabalho com trinta e um metagenomas disponíveis em banco de dados revelou maior quantidade de genes codificando proteínas associadas à tolerância ao cobre, subtilisinas ativas em pH alcalino e proteínas envolvidas na estabilidade celular, o que sugeriu que a microbiota já está adaptada a mina do Sossego. A busca por genes para tolerância a metais mostrou que a microbiota possui mecanismos comuns para lidar com diferentes metais e a reconstrução do metabolismo de enxofre indicou que ela é capaz de oxidar e reduzir compostos de enxofre, o que possui importância industrial e ambiental. Os metagenomas apresentaram genes que codificam proteínas para degradação de compostos aromáticos e a reconstrução

das rotas metabólicas da degradação de xenobióticos evidenciou a presença de genes que codificam proteínas envolvidas no catabolismo de fenol e benzeno e na produção de catecol. Dois genomas, pertencentes aos gêneros *Geitlerinema* (Cyanobacteria) e *Meiothermus* (Deinococcus-Thermus), foram recuperados dos metagenomas. Ambos os genomas possuem genes para hidrólise de diferentes fontes de carboidratos, obtenção de nitrogênio e resistência a antibióticos. A genômica comparativa dos genomas da *Geitlerinema* e *Meiothermus* revelou diversos genes para transposases e tolerância ao cobre, sugerindo a adaptação desses micro-organismos à mina do Sossego. Os resultados obtidos nesse trabalho auxiliam na compreensão da diversidade funcional em solos impactados por drenagem neutra de mina e da pilha de minério de cobre, gerando informações até então inexistentes em bancos de dados. Além disso, os metagenomas revelaram genes e rotas metabólicas de interesse industrial e ambiental.

ABSTRACT

Many investigations seek to understand the diversity and distribution of the microbial communities in the mine drainage, but few studies aim to assess the genomes present in the copper mine environments, especially in the neutral drainages and the ore pile that generates them. Thus, in this work, metagenomic evaluations, from two soil samples contaminated with neutral mine drainage and three samples from copper pile soil, were carried out to identify genes and metabolic pathways of biotechnological, industrial and environmental interest. All the samples were obtained in the Sossego mine, and their chemical analysis showed an alkaline pH and large contents of copper and nickel. The taxonomic annotation of the metagenomes showed a predominance of sequences associated with the phyla Proteobacteria and Actinobacteria. Differently from the metagenomes of other mines, the Sossego mine metagenomes revealed higher percentage of sequences related to the phylum Cyanobacteria. The statistical analyzes of the five metagenomes showed that the samples from copper pile soils are enriched with genes that encode proteins involved in the lipid metabolism, and are related to the acquisition of carbon and nitrogen. The comparative analyses of the metagenomes of this study with thirty-one metagenomes available in databases revealed higher amounts of protein-coding genes associated with tolerance to copper, active subtilisin at alkaline pH and proteins involved in the cell stability, which suggest that the microbiota is adapted to the Sossego mine. The search for metal tolerance genes showed that the microbiota has common mechanisms to deal with different metals and the reconstruction of the sulfur metabolism pathway indicated that the microorganisms are capable to oxidize and reduce sulfur compounds, which has industrial and environmental importance. The metagenomes revealed genes that encode proteins for the degradation of aromatic compounds and the reconstruction of the xenobiotic degradation pathways showed genes involved in the catabolism of phenol and benzene, and in the cathecol production. Two genomes, belonging to the *Geitlerinema* (Cyanobacteria) and *Meiothermus* (Deinococcus-Thermus) genus, were recovered from the metagenomes. They presented genes related to the hydrolysis of different sources of carbohydrate, acquisition of nitrogen and antibiotic resistance. The comparative genomics of the recovered *Geitlerinema* and *Meiothermus* revealed several genes for transposase and tolerance to copper, suggesting the adaptation of these microorganisms to the Sossego mine environment. The results obtained in this study help to understand the functional diversity in soils impacted by neutral mine drainage and copper ore pile, generating information that did not exist in databases. Furthermore, the metagenomes revealed genes and metabolic pathways of industrial and environmental interest.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Importância da Mineração no Brasil	13
1.2. Mineração de Cobre	14
1.3. Drenagem de Mina: aspectos gerais e principais micro-organismos	15
1.4. Metagenômica	19
2. OBJETIVOS	22
Objetivo Geral	22
Objetivos Específicos	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Coleta das Amostras e Análise Química	
3.2. Isolamento do DNA e Sequenciamento	
3.3. Pré-processamento, Montagem e Anotação	
3.4. Análise de Bioinformática	
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Geoquímica da Mina de Cobre	32
4.2. Sequenciamento e Composição Taxonômica dos Metagenomas	
4.3. Composição Funcional dos Metagenomas	46
4.3.1. Metagenômica para Resistência a Antibióticos	56
4.3.2. Metagenômica para Indústria de Mineração	58
4.3.3. Potencial para Degradação de Compostos Aromáticos	61
4.4. Recuperação de Genomas	72
4.4.1. Geitlerinema CCNMD22	79
4.4.2. Meiothermus CCNMD23	87
5. CONCLUSÕES	95
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	120

Dedico essa dissertação aos meus pais, Joaquim e Elza, por serem os melhores professores que tive na vida e formarem a base do homem que sou hoje, e a minha companheira de todos os momentos, Fernanda, por ser sempre meu porto-seguro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar presente em cada passo dado e sempre iluminar meu caminho.

A meus pais, Joaquim Assumpção Castro e Elza Bedo Castro, por me ouvirem e incentivarem incondicionalmente durante todo o desenvolvimento do mestrado.

A minha noiva, Fernanda Nara Maurício, por me dar a tranquilidade necessária para concretizar essa etapa.

Aos meus amigos de laboratório, por todas as conversas, risadas e momentos felizes. Por todo apoio científico e emocional.

Aos meus amigos da vida, por serem essenciais na minha vida.

À Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni e Dr. Renato Vicentini, pela oportunidade dada, orientação e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), ao Departamento de Genética e Biologia Molecular e ao Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), pela oportunidade de execução deste trabalho.

À FAPESP, pelo financiamento da minha bolsa (2013/03382-1) e à CNPq/Vale pelo apoio financeiro ao projeto.

À Vale, por disponibilizar as amostras deste trabalho e ao Francinaldo Ferreira do Rego Sindeaux e equipe, pela coleta das amostras e atenção para tirar minhas dúvidas a respeito da mina do Sossego e das amostras enviadas.

Ao Centro de Excelência em Bioinformátca (CEBio), Anderson Dominitini, Laura Rabelo Leite e Dra. Sara Cuadros e Dr. Guilherme Oliveira, pelo apoio técnico e científico.

À secretária do programa de pós-graduação de Genética e Biologia Molecular, Lourdes, pelo auxílio e paciência.

Aos membros da banca de qualificação e pré-banca, pelas grandiosas sugestões e críticas para aprimoramento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o meu convite.

"O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.".

João Guimarães Rosa

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância da Mineração no Brasil

A mineração brasileira tem origem no século XVI e a partir do ano 1693 passou a ter papel fundamental na economia nacional (CUSHING *et al.*, 2012; FERRAN, 2007). Segundo o Instituto Brasileiro de Mineração (IBRAM, 2013), no período de 2012 a 2016, haverá investimentos de US\$ 75 bilhões a serem feitos pelas mineradoras. O instituto também ressalta que em 2012 o saldo da balança comercial nacional atingiu US\$ 19.415 bilhões, enquanto o saldo mineral, US\$ 29.550 bilhões, o que corresponde a um valor 52% acima do saldo comercial brasileiro. Em 2011, o setor mineral conseguiu empregar diretamente 2 milhões de trabalhadores, sem contabilizar as vagas nas áreas de pesquisa, planejamento, prospecção e garimpo, já que o setor possui a capacidade de englobar os três ramos da economia, através de atividades que envolvem desde a mineração (primário), passando pela transformação dos minérios (secundário) até alcançar o mercado (terciário) (GULLI *et al.*, 2006; IBRAM, 2011).

No que tange as características da mineração brasileira, as lavras são predominantemente de pequeno e médio porte, totalizando aproximadamente 95% das lavras no Brasil, sendo a geodiversidade distribuída pelo sudeste, centro-oeste e norte, regiões detentoras de 51%, 26% e 8,8% da produção mineral, respectivamente. Em relação aos estados, Minas Gerais, Pará, São Paulo, Goiás e Bahia são os maiores produtores minerais, onde estão presentes algumas importantes províncias minerais como a de Carajás e Quadrilátero Ferrífero (DNPM, 2010; GULLI *et al.*, 2006).

Deste modo o Brasil ocupa posição de prestígio no cenário mundial, visto que é considerado um dos principais exportadores e produtores de diversos produtos. Em 2013, ocupou lugar de maior produtor de nióbio e tântalo, e teve destaque na produção de ferro,

bauxita, grafita natural, amianto, bentonita, vermicuta, talco e pirofilita (LIMA; NEVES, 2014).

1.2. Mineração de Cobre

Em 2013, o Brasil teve produção anual de cobre concentrado de 270.979 toneladas e a exportação do metal atingiu o valor de 940.816.000 reais (LIMA; NEVES, 2014). O cobre possui alto valor no mercado internacional e aparece na lista dos metais brasileiros mais produzidos e exportados, sendo utilizado na construção civil, no ramo da refrigeração, nas indústrias eletroeletrônica, química, petroquímica, automobilística, naval, aeronáutica, ferroviária (ANDRADE; CUNHA; GANDRA, 2001; CUSHING *et al.*, 2012; GURMENDI, 2012; LIMA; NEVES, 2014).

Sua produção concentra-se em poucas unidades mineiras, tendo como as maiores corporações a Vale S.A., Mineração Maracá, Mineração Caraíba, Votorantim Metais Níquel, Mineração Parabrás e Prometálica Mineração Centro Oeste. Em termos de localização das jazidas, destacam-se os estados de Goiás, Bahia e principalmente Pará, estado possuidor de mais de 83% das reservas minerais brasileiras e que produz essencialmente em Canaã dos Carajás no complexo mineiro Sossego/Sequeirinho, e em Salobo no complexo de Marabá, ambas as minas beneficiadas pela Vale S.A. (GURMENDI, 2012; LIMA; NEVES, 2014).

O minério de cobre pode ser encontrado em menor teor na superfície da crosta terrestre, sendo assim nomeado como oxidado (secundário) ou em maior teor e de origem mais profunda, classificado então como sulfetado (primário), porém dificilmente é obtido puro (cobre nativo) (ANDRADE; CUNHA; GANDRA, 2001; TAIOLI *et al.*, 2009). No Brasil predomina reservas sulfetadas, onde o cobre está geralmente associado a outros elementos químicos formando minérios como a calcopirita (CuFeS₂), um dos minérios de cobre mais abundante na natureza, calcocita (Cu₂S), bornita (Cu₅FeS₄), covelita (CuS) e

1.3. Drenagem de Mina: aspectos gerais e principais micro-organismos

Tanto nas etapas de processamento dos minérios quanto na mineração das lavras de cobre, formam-se materiais ricos em enxofre, sejam eles rejeitos, estéreis ou o próprio estoque de minério, que muitas vezes são mantidos ao ar livre e em pilhas. Por possuírem compostos sulfetados e em contato com o oxigênio e água do ambiente, esses materiais são oxidados, liberando um percolado com diferentes teores de metais como o cobre, zinco, ferro, alumínio, manganês, arsênio e pH extremamente baixo devido a formação de ácido sulfúrico. Esse percolado, denominado drenagem ácida de mina, é o principal impacto da atividade mineradora, já que consegue contaminar rios e solos, permanecendo por um longo tempo nesses ecossistemas (AKCIL; KOLDAS, 2006; BENVENUTI *et al.*, 1997; BORMA; SOARES, 2002; D'AGOSTINO, 2008; FARFAN; BARBOSA FILHO; SOUZA, 2004; JOHNSON; HALLBERG, 2005; LONG; PENG; BRADSHAW, 2012; NÓBREGA; LIMA; LEITE, 2008; PEPPAS; KOMNITSAS; HALIKIA, 2000; VIEIRA, 2011).

A drenagem ácida de mina ocorre principalmente na presença de minérios sulfetados como a pirita (FeS₂), o minério sulfetado mais abundante no mundo, em condições de pH e temperatura ideais e de bactérias, as quais agem biolixiviando os minérios. As bactérias envolvidas na bioloxiviação possuem papel fundamental na geração da drenagem ácida de mina, podendo diminuir sua velocidade de formação caso sejam inibidas (AKCIL; KOLDAS, 2006; FIGUEIREDO, 2000b; JOHNSON; HALLBERG, 2005). Alguns estudos mostram que alguns micro-organismos eucariotos como fungos e protozoários encontrados no ambiente de mina podem auxiliar na

$$2FeS_{2(s)} + 7O_{2(aq)} + 2H_2O \rightarrow 2Fe^{2+}_{(aq)} + 4SO_4^{2-}_{(aq)} + 4H^+_{(aq)} (1)$$

Quando há oxigênio e água, a pirita é oxidada, produzindo sulfato, íons H^+ e Fe²⁺ (1). Se o potencial de oxidação se mantiver alto, o íon Fe²⁺ também será oxidado, consumindo parte dos prótons de acordo com a equação (2). Essa fase é catalisada quando certos micro-organismos estão presentes, aumentando as taxas de formação da drenagem ácida de mina:

$$4Fe^{2+}_{(aq)} + O_{2(aq)} + 4H^{+}_{(aq)} \rightarrow 4Fe^{3+}_{(aq)} + 2H_2O(2)$$

O íon Fe^{3+} participará então de outra reação, oxidando FeS_2 e levando a diminuição do pH do meio, formação de Fe^{2+} e sulfato (3):

$$\text{FeS}_{2(s)} + 14\text{Fe}^{3+}_{(aq)} + 8\text{H}_2\text{O} \rightarrow 15\text{Fe}^{2+}_{(aq)} + 2\text{SO}_4^{2-}_{(aq)} + 16\text{H}^+_{(aq)}(3)$$

Ao se manter as mesmas condições do ambiente ocorrerá realimentação positiva ou autocatálise, onde o íon Fe^{2+} será utilizado como substrato para a geração de mais íons Fe^{3+} conforme a equação (2) e consequentemente aumentará a solubilização de metais devido a maior produção de ácido sulfúrico e diminuição do pH. De modo similar, as reações ocorrerão também para os minérios de cobre como a calcopirita, covelita, bornita e calcocita (GRAY, 1997). A habilidade dessas bactérias é uma alternativa que vem sendo empregada na indústria mineral em processamento chamado biohidrometalurgia (AHMADI, 2012; ANJUM; SHAHID; AKCIL, 2012; JOHNSON, 2012; NORRIS *et al.*, 2012; PANDA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012). Após a formação da drenagem ácida e se houver a presença de minerais possuidores de carbonato como a dolomita (CaMg(CO₃)₂) e calcita (CaCO₃), a neutralização poderá ocorrer naturalmente, gerando então a drenagem neutra de mina. Outra forma de geração da drenagem neutra é pela aplicação de calcário ou cal para elevação do pH como medida de remediação do impacto causado ao ambiente pela drenagem ácida de mina (MAJZLAN *et al.*, 2011). Como exemplificado por JURJOVEC; PTACEK; BLOWES (2002), a solubilização da dolomita leva a liberação dos íons de cálcio e magnésio, e ao consumo de prótons, o que por sua vez eleva o pH da drenagem (4).

$$CaMg(CO_3)_2 + 2H^+ \rightarrow Ca^{2+} + Mg^{2+} + 2HCO_3^{-}(4)$$

Algumas das bactérias envolvidas na formação da drenagem ácida e biolixiviação de minérios de cobre são mostradas na Tabela 1.

Micro-organismo	Minério de Cobre	Referências
Acidithiobacillus	Calcopirita e	BEVILAQUA et al., 2002; DONATI
ferrooxidans (Q)	Covelita	et al., 1996; KELLY; WOOD, 2000a
Acidithiobacillus caldus (M)	Calcopirita	HALLBERG; LINDSTRÖM, 1994; KELLY; WOOD, 2000a; SASAKI; TAKATSUGI; TUOVINEN, 2012
Acidithiobacillus thiooxidans (Q)	Calcopirita e Covelita	BEVILAQUA <i>et al.</i> , 2002; DONATI <i>et al.</i> , 1996; DOPSON; JOHNSON, 2012
Thiomonas cuprinus (M)	Calcopirita	HUBER; STETTER, 1990; MOREIRA; AMILS, 1997
Sulfobacillus thermosulfidooxidans (Q)	Calcocita e Bornita	TOUROVA <i>et al.</i> , 1995; VELOSO <i>et al.</i> , 2012
Leptospirillum ferrooxidans (Q)	Covelita, Calcopirita e Bornita	FALCO et al., 2003; SCHRENK et al., 1998

Tabela 1. Principais micro-organismos envolvidos na biolixiviação de minérios de cobre.

Micro-organismos Quimiolitotróficos (Q) ou Mixotróficos (M). Os micro-organismos mencionados não fazem biolixiviação somente dos minérios de cobre citados.

Os micro-organismos que participam da biolixiviação podem ser divididos em quimiolitotróficos, quimoorganotróficos ou ainda mixotróficos, quando conseguem obter energia de fontes inorgânicas e orgânicas. Os quimiolitotróficos fixam gás carbônico e obtém energia da oxidação de compostos reduzidos de enxofre e/ou da oxidação do ferro. Como consequência dessas oxidações e por esses micro-organismos serem normalmente acidófilos (crescem bem em pH inferior a 3), os materiais sulfetados são solubilizados e o pH diminui, o que por sua vez, aumenta a solubilização dos metais. Em contrapartida, os quimoorganotróficos necessitam de fontes de carbono orgânico para obter energia, produzindo ácidos fracos que podem liberar os metais dos materiais sulfetados (ANJUM; SHAHID; AKCIL, 2012; KONDRAT'EVA *et al.*, 2012).

De acordo com BAKER; BANFIELD (2003), os micro-organismos presentes no ambiente de mina são alvos de pesquisas voltadas para a descoberta de novas enzimas de interesse industrial, podendo ser analisados também no que se diz respeito a mecanismos de resistência, homeostase, participação individual de cada espécie na biolixiviação, associações simbióticas e a compreensão da drenagem ácida de mina em nível molecular e metabólico. Os pesquisadores ressaltam que estudos baseados em DNA fornecem informações sobre diversidade microbiana na drenagem ácida de mina e que os progressos nessa área ocorrem devido à disponibilidade de sequências dos isolados desses ambientes, todavia a dificuldade em cultivar a maior parte dos micro-organismos gera a necessidade de se utilizar técnicas que sejam livres de cultivo (CHEN *et al.*, 2008). Em relação à drenagem neutra, PEREIRA; VICENTINI; OTTOBONI (2014) demonstraram através do pirosequenciamento de rDNA 16S da comunidade bacteriana existente nesse ambiente, que os filos *Deinococcus-Thermus* e *Proteobacteria* são os predominantes. Os autores também correlacionaram a dominância do filo *Deinococcus-Thermus* aos teores de cobre encontrado nos solos da mina do Sossego contaminados com drenagem neutra.

RODRIGUES; TORRES; OTTOBONI (2014) estudando a mesma mina e também utilizando o pirosequenciamento de rDNA 16S de amostras de solos de taludes da mina e de solos do entorno da drenagem, revelaram que o filo Firmicutes domina o talude e que as comunidades de bactérias desses solos são diferentes em estrutura e composição. Ambos os estudos tiveram um foco ecológico e mostraram como fatores ambientais como a quantidade de cobre e de matéria orgânica podem afetar as comunidades microbianas do local, porém nenhuma análise a respeito dos recursos genéticos presente nesse ambiente foi feita.

1.4. Metagenômica

Recebe o nome de metagenômica a análise simultânea de vários genomas de um local sem a necessidade de cultivar os micro-organismos. Essa técnica foi inicialmente feita através da extração de DNA da amostra e utilização de enzimas de restrição, seguida pela clonagem em vetores e posterior *screenings* para descoberta de novos produtos e atividade biológica (HANDELSMAN *et al.*, 1998). Com a vinda do Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing* ou NGS) os números de genomas sequenciados aumentaram e as facilidades atualmente encontradas para se sequenciar (baixo custo somado ao avanço da tecnologia) auxiliou na expansão e aprimoramento da metagenômica (SCHOLZ; LO; CHAIN, 2012).

Diversos métodos em bioinformática foram e são desenvolvidos para auxiliar na predição de genes (TANG; ANTONOV; BORODOVSKY, 2013), em estatísticas univariadas, multivariadas e clusterização (ARNDT *et al.*, 2012), entre outras funções relacionadas aos metagenomas (CHIVIAN *et al.*, 2013; CLARK *et al.*, 2013). No que diz respeito a abordagens metagenômicas já realizadas, alguns exemplos são os estudos associativos entre genômica, proteômica e metagenômica na biomineração (VALENZUELA *et al.*, 2006), pesquisas da diversidade e abundância de genes de

resistência a cobre em comunidades microbianas (BESAURY *et al.*, 2013). Um dos primeiros estudos metagenômicos associado à drenagem ácida de mina foi feito com o biofilme formado na superfície das drenagens da mina de *Iron Montain*, California, por TYSON *et al.* (2004). Nesse trabalho, devido à dominância de poucas espécies nas amostras, os autores conseguiram montar dois genomas quase completos (*Leptospirillum* grupo II e *Ferroplasma* tipo II) e encontraram genes de resistência a metais e vias metabólicas relacionadas ao ambiente. Outros trabalhos que envolveram a metagenômica e drenagem de mina foram feitos nos Estados Unidos, China e Espanha em minas de níquel, pirita, cobre, magnetita, hematita, zinco e calcopirita (GONZÁLEZ-PASTOR; MIRETE, 2010; GUO *et al.*, 2013; KUANG *et al.*, 2013).

Em 2008, foram disponibilizadas duas ferramentas de bioinformática para auxiliar no estudo de metagenomas: o MG-RAST (MEYER *et al.*, 2008) e o *Integrated Microbial Genomes with Microbiome Samples* (IMG/M) (MARKOWITZ *et al.*, 2008). Essas plataformas para análise, armazenamento e intercâmbio de metagenomas permitem que dados gerados em um determinado projeto possam ser diretamente comparados em nível de genes, redes metabólicas, diversidade e estrutura microbiana com os dados obtidos em outro projeto.

Até o momento estão disponíveis no MG-RAST e IMG/M, poucos metagenomas relacionados às drenagens como os de *Richmond Mine* e *Soudan Mine* (NCBI *Project ID* 20823 e NCBI *Project ID* 17725, respectivamente, e não há dados de amostras advindas de drenagens neutras, que são pouco estudadas mundialmente (JURJOVEC; PTACEK; BLOWES, 2002; LINDSAY *et al.*, 2009; MAJZLAN *et al.*, 2011), assim como dados da pilha de minério que as geram. Nesse contexto, pesquisas que visem avaliar o conteúdo genético da população microbiana existente em solos contaminados com drenagem neutra de mina e solos de pilha de minério de cobre através de uma abordagem metagenômica

podem proporcionar conhecimento da biodiversidade e distribuição dos microorganismos comumente e excepcionalmente encontrados no ambiente de mina e especialmente, conhecimento dos genes e rotas metabólicas presentes nesses locais, gerando dessa maneira, recursos genéticos e direcionamento no isolamento de microorganismos e consórcios microbianos.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Este trabalho visa identificar genes, rotas metabólicas e composição taxonômica da microbiota presente em solos contaminados com drenagem neutra de mina de cobre e solos de pilha de minério de cobre através de uma abordagem metagenômica.

Objetivos Específicos

- Avaliar os teores de metais e outros elementos químicos dos solos amostrados;
- Isolar DNA, construir bibliotecas e sequenciar o DNA metagenômico;
- Analisar a diversidade funcional da microbiota do ambiente em estudo;
- Buscar por genes e rotas metabólicas de interesse industrial e ambiental;
- Comparar os metagenomas do ambiente em estudo com os provenientes de outros ambientes como solos de floresta, drenagens ácidas e mar;
- Recuperar genomas relacionados ao ambiente em estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta das Amostras e Análise Química

Amostras de solo foram coletadas na mina do Sossego, cava de Sequeirinho, localizada em Canaã dos Carajás, sudeste do Pará (6°25'45"S, 50°3'58"W) e consistem de solos contaminados com drenagem neutra e solos provenientes de pilha de cobre de onde escorre essa drenagem (Figura 1). A Vale S.A. coordena e opera esta mina desde 1997 e permitiu todas as coletas que foram realizadas por profissionais designados pela empresa.



Figura 1. Mapa topográfico da Mina do Sossego (cava de Sequeirinho) com a localização dos pontos de coleta das amostras. A pilha possui três pisos e a drenagem de mina está destacada em vermelho.

A mineradora retira solos superficiais com minérios de menor teor de cobre e os depositam em forma de pilha. Dessa forma, a pilha possui diferentes teores de metais ao longo de sua altura, sendo que a drenagem gerada escorre de sua base. Na parte mais alta da pilha (6°25'35.457"S, 50°3'20.422"W) foi coletada a amostra P1-2013 (Figura 2A), na altura intermediária (6°25'37.490"S, 50°3'7.411"W), P2-2013 (Figura 2B) e a amostra P3-2013, na parte inferior (6°25'39.740"S, 50°3'5.737"W) (Figura 2C).



Figura 2. Pontos de coleta das amostras de solo da pilha de minério de cobre. (A) Amostra P1-2013. (B) Amostra P2-2013. (C) Amostra P3-2013.

Em relação às duas amostras de drenagem neutra, a amostra P4-2013 foi coletada no começo da formação da drenagem de mina (6°25'35.595"S, 50°3'5.725"W) (Figura 3A), enquanto a amostra P5-2013 foi coletada na região do desague (final da drenagem) (6°25'56.901"S, 50°2'59.648"W) (Figura 3B).



Figura 3. Pontos de coleta das amostras de solo da drenagem neutra de mina. (**A**) Amostra P4-2013. (**B**) Amostra P5-2013.

Para cada amostra simples foram avaliados em triplicata: o pH (CAMARGO *et al.*, 2009) e a quantidade (mg/kg) dos elementos químicos cádmio (Cd), cálcio (Ca), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), enxofre (S), ferro (Fe), fósforo (P), magnésio (Mg), manganês (Mn), níquel (Ni), potássio (K), sódio (Na) e zinco (Zn). As quantidades dos elementos químicos foram determinadas por espectroscopia de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ANDRADE; ABREU, 2006). Valores abaixo do nível de detecção foram convertidos para o mínimo valor detectável caso não interferisse nas análises estatísticas posteriores. A significância estatística dos parâmetros químicos foi determinada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Fisher

(*Fisher's least significant difference*) com um intervalo de confiança de 95% utilizando o pacote *agricolae* do programa R (MENDIBURU, 2014; R CORE TEAM, 2014).

3.2. Isolamento do DNA e Sequenciamento

A extração do DNA foi feita de 10 g de solo com o *kit PowerMax Soil* (MOBIO, Carlsbad, CA, USA) usando o protocolo alternativo do fabricante (Anexo A). A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% e a quantidade medida pelo fluorômetro Qubit 2.0 da Invitrogen. Quantidades superiores a 20 ng/µL foram armazenadas a -20°C no final do processo. Uma nova análise de qualidade e quantidade foi realizada pelo Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), responsável pela preparação das bibliotecas e sequenciamento. As bibliotecas foram preparadas utilizando 1 µg de DNA metagenômico com o *kit* TruSeq (Illumina, San Diego, CA, USA), sendo o tamanho do inserto de 400 pb. O sequenciamento foi feito no aparelho HiSeq 2500 da Illumina, sequenciando-se as duas pontas dos fragmentos (2 x 100 pb) em uma *lane*.

3.3. Pré-processamento, Montagem e Anotação

O pré-processamento das sequências vindas do sequenciador HiSeq 2500, denominadas *reads*, foi realizado através dos programas FastQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) e NGS QC *Toolkit* v.2.3.3 (PATEL; JAIN, 2012). Primeiramente, as *reads* foram colocadas no FastQC para verificação da qualidade das bases. Posteriormente, as *reads* foram filtradas usando qualidade mínima (*phred score*) de 20 em pelo menos 70 pares de base, sendo todas as *reads* com bases indeterminadas removidas. Finalmente, a avaliação da filtragem foi refeita no programa FastQC. As reads pré-processadas foram normalizadas digitalmente para uma cobertura de 20 e k-mers com abundância de 1 foram removidos através do programa khmer e seguindo seu protocolo (BROWN *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014) antes de serem montadas. A montagem dos metagenomas foi feita para cada amostra com IDBA-UD v1.1.1 (PENG *et al.*, 2012), k-mer mínimo e máximo de 20 e 100, respectivamente, passo de contagem (*count step*) de 5 k-mers, correção prévia (*pre-correction*) ativada e tamanho mínimo da sequência contígua (*contig*) de 300 pb. O alinhador Bowtie2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012) foi utilizado para alinhar as *reads* aos *contigs. Reads* não mapeadas foram montadas novamente utilizando o IDBA-UD v1.1.1 com os mesmos parâmetros. A versão final dos *contigs* correspondem a junção das duas montagens através da ferramenta minimus2 (MINID=98 e OVERLAP=80) do programa Amos v.3.1.0 (TREANGEN *et al.*, 2011). As etapas de digitalização, normalização e montagem foram realizadas nos servidores do Centro de Excelência em Bioinformática (CEBio, http://www.cebio.org/).

Os *contigs* foram submetidos para a plataforma do servidor *Integrated Microbial Genomes with Microbiomes Samples Expert Review* (IMG/M ER) (MARKOWITZ *et al.*, 2008) para predição de genes, anotação taxonômica através do algoritmo melhor *hit* do BLAST de genes parciais ou completos contra genomas isolados e anotação funcional em COG (*Clusters of Orthologous Groups*), PFAM (*Protein families*) e ortólogos do KEGG (KO). Os genes de rRNA 16S foram identificados e recuperados do servidor IMG, filtrados para tamanho mínimo de 50 pb e anotados e normalizados pelo número de cópias através da ferramenta RDP *classifier* com *bootstrap cutoff* de 50% (COLE *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2007). A anotação taxonômica do IMG foi normalizada pelo total de *hit* de cada amostra. Todos os metagenomas estão arquivados no banco de dados IMG/M ER sob o identificador GOLD *Study* ID Gs0110185.

3.4. Análise de Bioinformática

Uma análise permutacional de variância multivariada (PERMANOVA; $\alpha = 0.05$) com índice de similaridade Bray-Curtis foi realizada para verificar se a composição funcional das amostras de pilha de minério de cobre e as de drenagem neutra são diferentes. Para investigar categorias abundantes entre as amostras, um teste exato de Fisher (duas caudas), intervalo de confiança Newcombe-Wilson (0,99) e correção de Bonferroni foi feito no programa STAMP v2.0.0 (PARKS *et al.*, 2014b).

A metagenômica comparativa foi realizada usando a análise PERMANOVA com abundância relativa das funções do COG de 31 metagenomas (Anexo B) do banco de dados público IMG/M ER (http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi) contra os 5 metagenomas da mina de cobre. Novamente o programa STAMP foi utilizado para identificar funções abundantes, através do teste t não paramétrico de White com 1000 replicações e correção de Bonferroni. A similaridade funcional entre os metagenomas foi visualizada pelo escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) pelo pacote vegan do R (DIXON, 2003).

Anotações baseadas no melhor *hit* do BLASTP v2.2.27+ (CAMACHO *et al.*, 2009) com os parâmetros de *e-value* igual a 1e⁻¹⁰ e cobertura do gene maior que 50 foram feitas utilizando os bancos de dados BacMet (PAL *et al.*, 2014) para resistência e tolerância a metais, RHObase e Aromadeg (CHAKRABORTY *et al.*, 2014; DUARTE *et al.*, 2014) para biodegradação de compostos aromáticos, e ARDB (LIU; POP, 2009) para resistência a antibióticos. As sequências blastadas foram confirmadas utilizando o banco de dados de genomas completos de bactérias e arquéias do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e filtradas no *MEtaGenome ANalyzer* v5.2.3 (MEGAN) (HUSON *et al.*, 2007). Também foram feitas reconstruções das rotas metabólicas dos metagenomas para verificar a existência de mecanismos envolvidos na biolixiviação do

cobre e bioremediação de áreas impactadas por xenobióticos usando as rotas metabólicas KEGG através do KEGG mapper (KANEHISA *et al.*, 2012)

A recuperação de genomas foi dividida em 6 etapas:

(i) particionamento dos metagenomas pelo método de *binning*: o programa MaxBin (WU *et al.*, 2014) foi utilizado para particionamento dos metagenomas em *bins* utilizando a frequência de tetranucleotídeos, cobertura dos *contigs*, genes marcadores de cópia única e o algoritmo de expectativa da maximização, calculando-se o conteúdo GC, a integridade e abundância das *bins*. As *bins* foram então alinhadas localmente contra genomas completos de bactérias e arquéias do NCBI com o parâmetro *e-value* de 1e⁻¹⁰, gerando o arquivo de entrada do MEGAN (HUSON *et al.*, 2007).

(ii) atribuição taxonômica e recuperação dos *contigs* relacionados a um determinado gênero: o MEGAN (HUSON *et al.*, 2007) utilizou o algoritmo do menor ancestral comum (LCA-*assignment*) para fazer a classificação taxonômica com os parâmetros *bitscore* 80, *e-value* de 1e⁻¹⁰, *top percent* de 10, *minimum support* 5, *minimum complexity* 0 e a opção *use minimal coverage heuristic* ativada. No nível taxonômico de gênero, as *bins* de todos metagenomas foram analisadas quanto a distribuição dos *contigs* e estes foram recuperados caso estivessem predominantes em algum gênero.

(iii) avaliação da integridade e contaminação dos possíveis genomas: após a anotação taxonômica, as *bins* foram analisadas pelo programa CheckM (PARKS *et al.*, 2014a) o qual utiliza marcadores bacterianos específicos para verificação da integridade e contaminação.

(iv) recuperação das *reads*, montagem dos genomas e reavaliação da integridade e contaminação: as *bins* que apresentaram integridade maior que 90% e contaminação menor que 5% foram utilizadas para recuperação das *reads* que as compõe através da ferramenta Bowtie2. As *reads* dos dois grupos foram comparadas para encontrar possíveis sequências em comum. Novos contigs foram montados através do programa SPADES v.3.1.0 (BANKEVICH *et al.*, 2012) com o parâmetro –careful ativado, utilizando os k-mers 21, 33 e 55. Novamente o programa CheckM foi utilizado para avaliar a integridade e contaminação dos genomas.

(v) análise filogenética, frequência de tetranucleotídeos e identidade média de nucleotídeos: por fim, uma análise filogenética foi feita identificando 29 proteínas com sequências conservadas em bactérias (dnaG, frr, infC, nusA, pgk, pyrG, rplA, rplB, rplC, rplD, rplE, rplF, rplK, rplL, rplM, rplN, rplP, rplS, rplT, rpmA, rpoB, rpsB, rpsC, rpsE, rpsI, rpsJ, rpsM, rpsS e smpB) através do programa AMPHORA2 (WU; SCOTT, 2012). Os genomas utilizados na análise foram os recuperados, genomas completos relacionados aos filos recuperados e os *outgruoups*, totalizando 82 espécies. Um alinhamento múltiplo de cada gene foi feito utilizando o programa Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011) e as sequências de proteínas foram concatenadas individualmente através de um script em Perl desenvolvido para esse propósito. As sequências concatenadas foram então refinadas pelo programa GBlocks (CASTRESANA, 2000), colocadas no programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v.6.0.6 (TAMURA et al., 2013) para buscar o melhor modelo de construção de árvores de proteínas (Find Best DNA/Protein Models) e construção da árvore filogenética através do método Maximum Likelihood (ML) com 1000 de bootstrap. Após a montagem, a árvore foi manuseada no editor TreeGraph2 (STÖVER; MÜLLER, 2010). Micro-organismos do mesmo gênero dos genomas recuperados e que possuíssem genomas completos foram utilizados para uma análise pareada de frequência de tetranucleotídeos e identidade média de nucleotídeo (ANI) usando o alinhador MUMmer pelo programa JSpecies v.1.2.1 (GORIS et al., 2007; KURTZ et al., 2004; RICHTER; ROSSELLÓ-MÓRA, 2009; TEELING et al., 2004)

(vi) anotação funcional e identificação de homólogos: a busca de ORFs (*opening reading frames* ou fase aberta de leitura) e posterior anotação funcional foi realizada no servidor IMG/M ER. Os genes preditos foram utilizados para encontrar enzimas relacionadas a degradação de carboidratos através da ferramenta *Cazymes Analysis Toolkit* (CAT) do banco de dados Cazyme (LOMBARD *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2010). Através do programa antiSmash v2.0 foi feita a busca por genes associados a metabólitos secundários (BLIN *et al.*, 2013). As duas anotações foram confirmadas com a realizada pelo IMG/M ER. Para identificar o grupo de homólogos entre os genomas recuperados e espécies próximas, foi utilizada a ferramenta Get_Homologues, a qual baseia-se no HMMER (http://hmmer.org) para buscar domínios do PFAM e no BLAST+, utilizando os algoritmos do OrthoMCL v.1.4 e COGtriangles (CONTRERAS-MOREIRA; VINUESA, 2013; FINN *et al.*, 2010; KRISTENSEN *et al.*, 2010; LI; STOECKERT; ROOS, 2003). A ferramenta BLAST Ring Image Generator (BRIG) foi utilizada para fazer comparações entre as sequências dos genomas recuperados e de genomas de banco de dados (ALIKHAN *et al.*, 2011) utilizando identidade mínima de 70%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Geoquímica da Mina de Cobre

No total foram avaliados 15 parâmetros químicos e observada a existência de diferenças significativas somente entre as médias de potássio, manganês, cobre, níquel e pH (Tabela 2). A mina do Sossego é um depósito de óxidos de cobre e ouro formada por minérios como calcopirita (CuFeS₂), pirita (FeS₂), magnetita (Fe₃O₄), pentlandita ((Fe,Ni)₉S₈), apatita ((Ca₃(PO₄)₂(OH,F,Cl)), bornita (Cu₅FeS₄) e minérios pertencentes as famílias feldspato e anfíbola, as quais contêm potássio, cálcio, sódio e outros elementos (MONTEIRO *et al.*, 2008a, 2008b; VALE S.A., 2013).

A salinidade em solos está relacionada principalmente aos íons sódio, cloreto, sulfato, carbonato, bicarbonato, potássio, magnésio e cálcio, os quais estão presentes em águas subterrâneas e em compostos do ambiente como os minérios (COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2009). De fato, naturalmente as águas de regiões de mineração já possuem maiores concentrações de sais (NICOLLE *et al.*, 2009) e a decomposição de minerais como a actinolita, um mineral do grupo dos anfibólios cuja composição química é dada pela fórmula Ca₂(Mg,Fe)₅Si₈O₂₂(OH)₂, assim como de outros minérios explicam a quantidade de sais e de alguns dos elementos químicos determinados nas amostras, refletindo a dinâmica existente na cava de Sequeirinho, onde há um caráter natural, além do antropogênico, que produz diferentes quantidades desses elementos no ambiente.

	P1-2013	P2-2013	P3-2013	P4-2013	P5-2013
рН	7,98±0,04ab	7,66±0,04cd	7,84±0,09bc	7,57±0,05d	8,12±0,08a
Cádmio	1,53±1,79a	1,53±1,44a	0,73±0,58a	1,2±1,39a	1,17±1,33a
Cálcio	29266,67±1504,44a	23466,67±17905,96a	8533,33±1625,83a	95166,67±150574,98a	5733,33±4819,06a
Chumbo	7,47±2,97a	5,67±2,93a	2,9±0,17a	5,27±1,53a	5,07±2,68a
Cromo	26,1±5,14a	25,87±5,87a	14,3±3,96a	20,53±7,42a	10,37±6,8a
Enxofre	9666,67±1750,24a	6000±1609,35a	80466,67±75786,37a	22900±36633,73a	3143,33±5072,08a
Ferro	37066,33±5939,12a	40962,67±11428,13a	20547,33±8353,96a	23955±8210,25a	20412±17616,87a
Fosfóro	3266,67±1415,39a	2864,53±2705,74a	2066,67±321,46a	48000±80540,42a	323,33±35,12a
Magnésio	11900±3019,93a	13133,33±4261,85a	78900±127407,26a	216933,33±238158,8a	19833,33±31844,05a
Sódio	455,67±499,46a	260±75,19a	159,33±96,01a	236,73±182,67a	20,33±17,9a
Zinco	15,1±0,26a	25,53±4,12a	16,47±2,26a	15,73±3,35a	21,03±9,58a
Manganês	214,67±28,99a	179,33±26,08ab	108,77±25,87b	177,33±21,55ab	240±54,01a
Potássio	3744,67±982,86a	1344,67±240,28b	889,67±241,06b	524,33±177,02b	358,33±141,74b
Níquel	164,67±62,07a	197±30,2a	69,6±9,58b	109±5,57ab	62,77±8,5b
Cobre	9734,67±2711,15a	8612±643,97a	2484,33±382,23b	5916,67±430,7ab	5860,33±863,03ab

Tabela 2. Teste de Fisher LSD ($p \le 0.05$) dos 15 parâmetros químicos das amostras de solo de pilha de mina e drenagem neutra de mina.

Valores expressos em mg/kg, exceto o pH. Letras diferentes entre colunas demonstram diferença entre as médias e em negrito estão representados os valores significativos na análise estatística.

Quantidades distintas de metais foram encontradas em outros solos de mina (HALTER *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2013), sendo que todas as amostras apresentaram níveis de cobre e níquel superiores aos comumente encontrados em alguns tipos de solos brasileiros que variam de 3 a 238 mg/kg de cobre e 5 a 45 mg/kg de níquel (CAMPOS *et al.*, 2003; FADIGAS *et al.*, 2002). Todavia, os dois metais estão dentro do limite aceitável de cobre (10000 mg/kg) e níque (3800 mg/kg) para áreas industriais, enquanto o valor de cádmio está dentro do limite de prevenção e os de chumbo, cromo e zinco, dentro dos valores de referência de qualidade para solos do Estado de São Paulo (CETESB, 2014).

Grandes quantidades de cobre, ferro e níquel foram vistas em todas as amostras, já que esses elementos constituem alguns dos minérios que fazem parte da mineralogia local, porém diferenças significativas entre as amostras foram encontradas apenas para os metais níquel e cobre (Tabela 2). Durante a retirada de solos superficiais para atingir camadas mais profundas e com maior teor de cobre, a mineradora gera uma pilha com diferentes minérios. Essa pilha apresenta maior quantidade de minérios de cobre no topo, que corresponde às camadas mais profundas do solo, e menor teor na base, que corresponde à superfície do solo. Dessa forma, a amostra da base da pilha, P3-2013, apresentou diferença na média de cobre em relação às amostras mais elevadas da pilha, P1-2013 e P2-2013, demostrando que a parte mais baixa da pilha é composta por minérios com baixo teor de cobre (Tabela 2). Conforme a drenagem se forma, os níveis de cobre fora da pilha aumentam como pode ser visto nas amostras P4-2013 e P5-2013, as quais não apresentaram diferenças significativas com as amostra da pilha P1-2013 e P2-2013. Para o metal níquel, comportamento semelhante foi observado, embora apenas a amostra P4-2013 apresentou a mesma diferença significativa em relação às amostras de pilha.

Tanto a amostra P4-2013 quanto a P5-2013 apresentaram pH alcalino (7,57 e 8,12, respectivamente) (Tabela 2), o que as caracterizam como drenagem neutra de mina. As

drenagens neutras podem ser formadas naturalmente devido à alcalinidade de carbonatos presentes no solo e em minérios que irão neutralizar o pH ácido da drenagem ou artificialmente, devido ao emprego de cal, calcário e outros compostos alcalinos para elevação desse pH e precipitação de metais em áreas afetadas pela drenagem ácida (BANKS *et al.*, 1997; MAJZLAN *et al.*, 2011). A alcalinidade das amostras de solos de drenagem neutra (P4-2013 e P5-2013) advém principalmente da aplicação de calcário no caminho da drenagem de mina, todavia os valores de pH medidos nas amostras P1-2013, P2-2013 e P3-2013 também foram básicos, indicando que podem existir minérios com alto ou médio potencial de neutralização na cava de Sequeirinho como a calcita, epídoto e biotita (LAWRENCE; SCHESKE, 1997), os quais contribuem para a elevação do pH da drenagem formada na pilha.

Em geral, os valores medidos nas cinco amostras foram altos, principalmente em relação à concentração de cobre e níquel. Sabe-se que em pH básicos, os metais tendem a permanecer precipitados e que flutuações na concentração de H⁺ e no potencial redox levam a uma maior ou menor interação dos micro-organismos com os metais (BALISTRIERI; MURRAY; PAUL, 1994; RAMÍREZ-PÉREZ *et al.*, 2013). Essa interação afeta a comunidade microbiana, selecionando organismos tolerantes e diminuindo os sensíveis (KUNITO *et al.*, 1997a, 1997b, 1999; PEREIRA; VICENTINI; OTTOBONI, 2014). Esse fato pode ser exemplificado pela detecção de genes para a multicobre oxidases de bactérias de áreas contaminadas por cobre, as quais mostraram também, resistência a níquel, mercúrio e óxidos de metais (ALTIMIRA *et al.*, 2012). Dessa forma, a investigação dos genes presentes nos dois ambientes da mina do Sossego pode revelar características interessantes como quais micro-organismos estão presentes, como eles lidam com os teores de metais, o que mais eles são capazes de fazer e se possuem diferenças na abundância de genes entre as amostras e em comparação com

outros ambientes, o que pode ser feito através da abordagem metagenômica escolhida neste estudo.

4.2. Sequenciamento e Composição Taxonômica dos Metagenomas

O sequenciamento gerou aproximadamente 35,6 Gb de dados para todas as amostras e após o pré-processamento, aproximadamente 20% das reads foram descartadas. As *reads* processadas foram então utilizadas nas montagens independentes dos metagenomas que totalizou 829,838 contigs ≥300 pb com conteúdo GC similares (aproximadamente 65%). O número de contigs entre as amostras variou de 131.640 a 197.605, sendo que os maiores contigs são das amostras P2-2013 e P5-2013 com 1,1 e 0,5 Mbp, respectivamente, e o maior N50 (3752 pb) é da amostra P1-2013 (Tabela 3). Os maiores contigs de cada metagenoma tiveram a taxonomia atribuída pelo servidor IMG. O maior contig do metagenoma P1-2013 foi atribuído ao gênero Thiobacillus com uma similaridade de 75%, P2-2013 ao filo Cyanobacteria (89%) e P3-2013 não obteve atribuição. Já os metagenomas P4-2013 foram atribuídos a Geitlerinema sp. PCC7407 (90%) e P5-2013 ao domínio Bacteria (63%). De 1.839.714 genes, por volta de 1% foram anotados como gene de RNA e 99% como sequência codificante de proteínas (CDS) (Tabela 3). A identificação dos genes de rRNA 16S e filtragem do tamanho (\geq 50 pb) resultou em 96, 121, 122, 90 e 102 genes para os metagenomas de P1-2013, P2-2013, P3-2013, P4-2013 e P5-2013, respectivamente. Os genes de rRNA 16S tiveram média de 500 pb e maior tamanho de 1400 pb nas cinco amostras. Cerca de 60% do CDS tiveram uma função atribuída no COG ou PFAM, com uma cobertura de 89% dos clusters do COG e 33% dos *clusters* do PFAM, e pelo menos 20% dos CDS foram anotados em um grupo de ortólogo das rotas metabólicas do KEGG (Tabela 3).
Categoria	P1-2013	P2-2013	P3-2013	P4-2013	P5-2013
Reads					
Bruta	65466224 PE	79155130 PE	69857388 PE	63359700 PE	78668510 PE
Filtrada	47121606 PE	59559072 PE	51147612 PE	48158148 PE	59047412 PE
	7557897 SE	8164528 SE	7732193 SE	6228069 SE	8085916 SE
Montagem					
Sequências	131640	197605	171562	148752	180266
Tamanho	240569980	302503132	263654823	178621212	250061647
N50 (pb)	3752	2628	2727	1524	2364
%GC	67.95	64.19	66.99	62.81	63.17
Maior Contig	173466	1112876	113793	240402	521047
Menor Contig	300	300	300	300	302
Genes	340918	441436	391485	281589	384286
rRNA	326	469	408	332	352
tRNA	3482	3855	3737	2331	3371
CDS	337110	437112	387340	278926	380563
com COG	228263 (66.96%)	291662 (66.07%)	253249 (64.69%)	178278 (63.31%)	228210 (59.39%)
com PFAM	220143 (64.57%)	281425 (63.75%)	242793 (62.02%)	169998 (60.37%)	216849 (56.43%)
com KO	84888 (24.90%)	108220 (24.52%)	94437 (24.12%)	67925 (24.12%)	81339 (21.17%)

 Tabela 3. Características gerais das montagens.

Sequências pareadas (paired-end) indicadas por PE. Sequências únicas (single-end) indicadas por SE.

As distribuições dos domínios foram similares entre as análises do melhor *hit* do BLAST e a identificação dos genes de rRNA 16S, mostrando a predominância do domínio Bacteria e baixa atribuição do domínio Archaea (Figura 4A e Figura 4B).





Dentro do domínio Bacteria, os filos Proteobacteria e Actinobacteria contribuíram com mais de 50% da atribuição nas amostras P1-2013, P2-2013, P3-2013 em ambas as abordagens e na amostra P5-2013, apenas pela abordagem do melhor *hit* do BLAST (Figura 5A e Figura 5B).



Figura 5. Abundância relativa dos filos com atribuição de genes superior ou igual a 1%. (A) Atribuição realizada pelo método do melhor *hit* do BLAST do IMG. (B) Atribuição do rDNA 16S realizada através da ferramenta RDP *Classifier*. A relação completa dos filos representados como "Outros" está no Anexo C.

Proteobacteria e Actinobacteria já foram encontrados em abundância em outras coletas de solos da mina do Sossego, em drenagem ácida de minérios sulfetados, mina de carvão e outros ambientes de mina (BRANTNER; SENKO, 2014; EDWARDS *et al.*, 2006; HALTER *et al.*, 2011; MÉNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2014; REIS *et al.*, 2013; RODRIGUES; TORRES; OTTOBONI, 2014).

Diferentes atribuições para o filo Cyanobacteria são vistas entre as duas abordagens, com maiores atribuições na Figura 5A. O filo Cyanobacteria aparece em baixa abundância (0,02% a 3%) em outros estudos (HALTER *et al.*, 2011; MÉNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2014; REIS *et al.*, 2013; RODRIGUES; TORRES; OTTOBONI, 2014), de modo que a identificação dos genes de rRNA 16S é a mais provável de corresponder com a abundância desse filo no ambiente de mina de cobre, apesar dos casos particulares das amostras P2-2013 e P4-2013, onde foram encontradas atribuições de 8,9% e 12,4% (Figura 5A e Figura 5B), respectivamente.

Considerando as diferentes plataformas de sequenciamento, formas de identificação dos genes de rRNA 16S e anos de coleta, quando são comparadas as anotações taxonômicas obtidas para P4-2013 e P5-2013 com o estudo de pirosequenciamento de 16S rDNA de amostras de solos da mesma drenagem neutra da mina do Sossego coletadas em 2012 (PEREIRA; VICENTINI; OTTOBONI, 2014), ficam ressaltadas as maiores semelhanças das atribuições para os filos Gemmatimonadetes, Acidobacteria e Chlorofexi com a abordagem do rDNA 16S (Figura 5B). No estudo anterior, os autores apresentaram abundâncias médias de aproximadamente 14%, e 9% para os filos Gemmatimonadetes e Chlorofexi, respectivamente, enquanto a abordagem de identificação de rDNA 16S revelou atribuições médias de P4-2013 e P5-2013 de 10,48% e 6,67% para os respectivos filos. Já a abordagem do melhor *hit* do BLAST apresentou valores menores, com médias de 1,89% para Gemmatimonadetes e 3,41%

para Chlorofexi. A maior diferença entre o estudo anterior e as atribuições obtidas, independentemente da abordagem para anotação taxonômica, está na abundância do filo Deinococcus-Thermus, o qual os autores encontraram dominância em todas as amostras de drenagem neutra.

A identificação de genes de rRNA 16S nos metagenomas reflete melhor a mina do Sossego para alguns filos, todavia essa abordagem parece subestimar a abundância de Bacteroidetes, possivelmente por não ser um sequenciamento específico para genes de rRNA 16S, quando comparada ao método do melhor *hit* do BLAST, o qual apresentou valores mais semelhantes, média de 5,52% para P4-2013 e 6,72% para P5-2013, sendo coerente com a atribuição média de 6% de (PEREIRA; VICENTINI; OTTOBONI, 2014). Todavia, cada uma das abordagens é dependente de banco de dados e obtêm a taxonomia por maneiras distintas, de modo que ambas são informativas e complementam o estudo das comunidades microbianas.

Como a abordagem de identificação de genes de rRNA 16S representa os microorganismos mais abundantes e que certamente estão presentes na mina do Sossego, ela foi escolhida para analisar a taxonomia da microbiota em nível de gênero (Figura 6). Essa informação possibilita um panorama da comunidade microbiana existente nos solos provenientes da pilha de minério de cobre e contaminados com drenagem neutra de mina e pode auxiliar na compreensão da ecologia microbiana do local.



Figura 6. Abundância relativa dos gêneros com atribuição de genes superior ou igual a 5% pelo método da identificação do rDNA 16S realizado através do RDP *Classifier*. A relação completa dos gêneros representados como "Outros" está no Anexo D.

Dos gêneros que puderam ser classificados, *Solirubrobacter* (filo Actinobacteria) foi o mais abundante no metagenoma P1-2013, com 11,65% de sequências atribuídas. Representantes desse gênero já foram isolados de solos de plantações como as espécies *S. soli* e *S. pauli*, que são produtoras de pigmentos, crescem em pH básico, não reduzem nitrato, oxidam amônia e estão filogeneticamente próximas do gênero *Rubrobacter* (KIM *et al.*, 2007; SINGLETON *et al.*, 2003). No restante dos metagenomas, a maior parte das sequências foi atribuída ao gênero *Gemmatimonas* (filo Gemmatimonadetes), com 13,23%, 17,48%, 24,27% e 7,9% para os metagenoms P2-2013, P3-2013, P4-2013 e P5-2013, respectivamente. O único representante cultivável de *Gemmatimonas* é a bactéria *G. aurantiaca* T-27 isolada do lodo ativado formado em biorretatores de tratamento de efluente, a qual cresce em valores de pH na faixa de 6,5 a 9,5, é produtora de carotenóides e acumuladora de polifosfato (TAKAICHI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2003). Recentemente, ZENG *et al.* (2015) encontraram um provável novo integrante, a bactéria *G. phototrophica* isolada de um lago no deserto de Gobi classificada como fotoheterotrófica devido a presença de clorofila bacteriana, o que sugere uma nova habilidade para esse gênero. Outro gênero que também possui representantes com a mesma habilidade, é o *Porphyrobacter* (HANADA *et al.*, 1997; RAINEY *et al.*, 2003), que teve a maior abundância (8,75%) no metagenoma P1-2013.

As maiores abundâncias de *Rubrobacter* ocorreram nos metagenomas P2-2013 (5,29%), P3-2013 (5,82%) e P5-2013 (5,28%), sendo que os micro-organismos desse gênero crescem em pH variando de 6 a 11 e possui espécies como a *R. taiwanensis* que toleram radiação gama ou representantes que degradam xilano como é o caso da *R. xylanophilus* (CARRETO *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 2004). A presença de *Conexibacter* está relacionada às amostras serem solo, já que micro-organismos desse gênero participam do ciclo do nitrogênio e do carbono em solos (MONCIARDINI *et al.*, 2003; PUKALL *et al.*, 2010; SEKI *et al.*, 2012), porém ainda há pouca informação, assim como ocorre com os gêneros *Gaiella, Iamia e Ohtaekwangia*.

Alguns gêneros foram associados exclusivamente a certas amostras como *Nocardioides* do filo Actinobacteria para os metagenomas de solos da pilha de minério de cobre com abundâncias de 5,83%, 3,97% e 1,46%, em P1-2013, P2-2013 e P3-2013, respectivamente. Interessantemente, o gênero *Nocardioides* pode estar diretamente relacionado ao ambiente de mina. Micro-organismos desse gênero são capazes de fazer a biodeterioração de rochas graníticas, as quais são compostas por sílica, óxidos de alumínio, potássio, sódio e cálcio, e ferro, para obtenção de nutrientes através da secreção de ácidos orgânicos (ABDULLA, 2009). Vale ressaltar que rochas graníticas podem possuir depósitos de minérios de cobre e chumbo (AZER, 2006). Além disso,

representantes de *Nocardioides* degradam compostos aromáticos como o dibenzofurano e produzem enzimas de interesse industrial como monooxigenases de alcenos (HAMAMURA; YEAGER; ARP, 2001; KUBOTA *et al.*, 2005).

Por outro lado, o gênero *Nitrospira* do filo Nitrospirae está apenas associado aos metagenomas de solos contaminados com drenagem neutra com abundâncias de 3,03% em P4-2013 e 5,28% em P5-2013, sendo que seus representantes são reconhecidos por participarem ativamente na oxidação de nitrito para nitrato e por estarem presente em diferentes ambientes como solos, água do mar e inclusive, em sedimentos contendo metais tóxicos de uma mina de ouro e prata (BARTOSCH *et al.*, 2002; KWON *et al.*, 2015; LÜCKER *et al.*, 2013; PESTER *et al.*, 2014).

A classificação de cianobactérias do RDP segue o manual de Bergey de bacteriologia sistemática e, portanto, não classifica cianobactérias além do nível taxonômico de família, distribuindo-as apenas em 13 diferentes famílias/gêneros (GpI-GpXIII) (BOLHUIS; STAL, 2011; CASTENHOLZ, 2001). Sequências atribuídas aos grupos de cianobactérias GpI e GpIV foram mais abundantes em P2-2013 e P4-2013, assim como ocorreu no nível de filo (Figura 5). Somente sequências do metagenoma P2-2013 foram atribuídas ao grupo GpI, com abundância de 6,19%, enquanto o grupo Gp IV teve abundâncias de 5,29%, 2,91% e 9,10% em P2-2013, P3-2013 e P4-2013, respectivamente. De acordo com BOLHUIS; STAL (2011), os grupos GpI e GpIV são dominantes em ambientes onde há exposição intermitente de água como ocorre no ambiente da mina do Sossego, onde a drenagem se forma conforme ocorrem as chuvas.

Os gêneros *Thiobacillus* e *Acidiferrobacter* são encontrados em solos e em diferentes ambientes relacionados a mineração como rejeitos de mina e concentrados de cobre em biorreatores (CHEN *et al.*, 2013; FALTEISEK; ČEPIČKA, 2012; HE *et al.*, 2007; MENDEZ; NEILSON; MAIER, 2008). Para ambos os gêneros, a maior abundância

de sequências associadas são do metagenoma P1-2013, com 5,83% para Thiobacillus e 6,98% para Acidiferrobacter. Um exemplo de representante de Thiobacillus é a bactéria T. denitrificans, a qual é capaz de oxidar diferentes fontes inorgânicas de enxofre como tiossulfato e tetrationato (KELLY; WOOD, 2000b). CHEN et al. (2013) estudaram através da metagenômica uma mina de chumbo e zinco, rica em enxofre, em relação ao processo de formação de drenagem ácida. Os autores revelaram que micro-organismos do gênero Thiobacillus estão preferencialmente presentes nas amostras com valores de pH variando de 6.5 a 7.5 e que eles possuem papel fundamental na oxidação do enxofre, início da formação da drenagem e consequente acidificação do meio. A presença de compostos que podem ser oxidados para obtenção de energia e nutrientes e principalmente o pH alcalino dos solos (Tabela 2) aparentam ser fatores favoráveis ao crescimento da maior parte dos gêneros revelados pela identificação do gene de rDNA 16S (Figura 6). Por outro lado, bactérias do gênero Acidiferrobacter são mencionadas como ativas apenas em ambientes de pH ácido. O único representante cultivável desse gênero, a bactéria A. thiooxydans, foi isolado de rejeitos de mina de carvão, é tolerante a metais como cobre e níquel e possui crescimento ótimo em pH próximo de 2 (HALLBERG; HEDRICH; JOHNSON, 2011; HARRISON JR, 1982). Primeiramente, A. thiooxydans foi descrita como dependente da oxidação de ferro para seu crescimento, porém HALLBERG; HEDRICH; JOHNSON (2011) comprovaram que essa bactéria consegue utilizar compostos de enxofre (ex: minério pirita) como doadores de elétron em ambientes com elevada pressão osmótica (2-5 bar), e não apenas o ferro como anteriormente sugerido, o que poderia contribuir para a presença desse gênero no ambiente alcalino, rico em enxofre e sais dos solos de P1-2013 e P2-2013 (Tabela 2). Somado a isso, não há outros representantes deste gênero para aumentar o conhecimento

de suas características fisiológicas e a abordagem utilizada nesse estudo funciona como um retrato do ambiente, não permitindo a inferir se esta comunidade está ativa.

4.3. Composição Funcional dos Metagenomas

A análise de componente principal da abundância das categorias do COG mostrou similaridade entre as amostras da pilha de cobre (P1-2013, P2-2013 e P3-2013), mas não para as amostras de drenagem neutra de mina (P4-2013 e P5-2013) (Figura 7).



Figura 7. Ordenação das cinco amostras da mina do Sossego pela análise de componentes principais (PCA) utilizando as categorias COG dos metagenomas de solo de pilha de minério de cobre (PC) e de drenagem neutra de mina (DN).

Possivelmente, a distância entre as amostras P4-2013 e P5-2013 contribuiu para essa diferença, já que a drenagem percorre um canal natural e irregular formado no solo de aproximadamente 1 Km, o que pode modificar as características da drenagem durante seu percurso. A PERMANOVA não foi significativa para comparações entre amostras de solos de pilha de cobre e contaminados com drenagem de mina para nenhum nível do COG, assim como para as anotações do PFAM e KO. O COG é uma estrutura com três níveis hierárquicos para atribuir funções aos genes encontrados nos metagenomas. Por exemplo, a categoria J agrupa todos genes e funções relacionados a tradução; descendo um nível dentro dessa categoria, encontramos funções como proteína ribossomal L21E e fator de elongação da tradução beta EF-1; dentro de cada função, estão os COGs que são identificados por números como COG2092 e COG2126. Os COGs são o último nível de classificação e estão associados diretamente com os genes dos metagenomas. A anotação COG possui 25 categorias gerais relacionados a diferentes processos (Tabela 4).

Categoria do COG	do COG Processo			
Ζ	Citoesqueleto			
Y	Estrutura nuclear			
W	Estrutura extracelullar			
V	Mecanismos de defesa			
U	Tráfego intracelular e secreção			
Т	Transdução de sinal			
S	Função desconhecida			
R	Função geral apenas predita			
Q	Estrutura secundária			
Р	Transporte e metabolismo de íons inorgânicos			
0	Modificação pós-traducional, conformação protéica e			
0	chaperonas			
Ν	Motilidade celular			
Μ	Biogenese de parede celular, membrana e envelope			
L	Replicação e reparo			
Κ	Transcrição			
J	Tradução			
Ι	Metabolismo de Lipídeos			
Н	Metabolismo de Coenzimas			
G	Metabolismo e transporte de carboidratos			
F	Metabolismo e transporte de nucleotídeos			
E	Metabolismo e transporte de aminoácidos			
D	Controle do ciclo celular e mitose			
С	Produção de energia e conversão			
В	Estrutura de cromatina e dinâmica			
А	Processamento e modificação de RNA			

Tabela 4. Discriminação das categorias do COG

Fonte: *Phylogenetic classification of proteins encoded in complete genomes* - www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/

Em todos metagenomas, as três categorias mais abundantes do COG foram metabolismo e transporte de aminoácidos (E), transdução de sinal (T) e produção e conversão de energia (C), com exceção das categorias predição geral de função (R) e função desconhecida (S). Poucos genes foram atribuídos ao processamento e modificação do RNA (A), dinâmica e estrutura da cromatina (B), estruturas extracelulares (W), estrutura nuclear (Y) e citoesqueleto (Z), corroborando a anotação taxonômica, onde foi verificado dominância de procariotos tanto nas pilhas de minério de cobre quanto na drenagem neutra de mina (Figura 4). Das comparações pareadas possíveis, a categoria I (metabolismo e transporte de lipídeos) foi mais abundante (p < 0,01) em todos os metagenomas de pilha de cobre em relação aos de drenagem neutra (Figura 8), enquanto para os metagenomas de drenagem neutra, nenhuma categoria teve maior abundância em relação aos de pilha.



Figura 8. Abundância relativa das sequências dos 5 metagenomas da mina do Sossego em relação às 25 categorias do COG.

As funções mais abundantes da categoria I para os metagenomas P1-2013, P2-2013 e P3-2013 em relação a P4-2013 e P5-2013 (p < 0,01) correspondem a Acil-CoA Desidrogenase, Enoil-CoA Hidratase/Carnitina Racemase e Tioesterase Acil-CoA, as quais apresentaram maior abundância do gene tesB (COG1946) e os genes caiA (COG1960) e caiD (COG1024) do operon cai. O gene tesB foi primeiramente descrito em Escherichia coli codificando uma tioesterase tipo II capaz de hidrolisar ésteres de cadeias médias e longas (6 a 18 carbonos) e é estudado para produção biotecnológica de biopolímeros e alcenos de cadeia curta (CHOI; LEE, 2013; CHUNG et al., 2013; SPENCER; GREENSPAN; CRONAN, 1978; WANG et al., 2013a). O operon caiTABCDE está envolvido no metabolismo de carnitina como fonte de carbono e nitrogênio, sendo foco de pesquisas de engenharia metabólica para produção de Lcarnitina como suplemento alimentar para humanos (ARENSE et al., 2013; EICHLER et al., 1994). Em E. coli e alguns micro-organismos de solo como Brevibacterium linens e Bacillus subtilis, a carnitina também possui papel na osmorregulação, atuando como um soluto compatível em ambientes com maior concentração de sais (JEBBAR et al., 1998; KAPPES; BREMER, 1998) como o encontrado na amostra P1-2013, que apresentou a maior média de potássio (3744,67 mg/Kg) (Tabela 2). A abundância de funções do metabolismo de lipídeo nas amostras da pilha de minério de cobre pode ser justificada pela menor variedade de fontes de nutrientes disponível nos locais de coleta de P1-2013, P2-2013 e P3-2013 (Figura 2) quando comparadas aos locais de P4-2013 e P5-2013 (Figura 3).

A distribuição das funções do COG foi significativamente diferente (PERMANOVA) quando comparados os 5 metagenomas da mina do Sossego com 31 metagenomas disponíveis publicamente no IMG. Esses metagenomas foram feitos a partir de drenagem ácida de mina (AMD), águas subterrâneas e águas subterrâneas contaminadas com urânio (GWS e UWW, respectivamente), efluentes (WW), água do mar (SS), pastagem (GL), solos da floresta amazônica (AFS), solos de turfeira (PS), compostagem de zoológico (ZC) e biorreatores degradadores de benzeno (BB). O escalonamento multidimensional não-métrico (Figura 9) mostrou coerência na discriminação dos metagenomas.



Figura 9. Escalonamento multidimensional não-métrico dos 5 metagenomas da mina do Sossego (em vermelho) e dos 31 metagenomas disponíveis publicamente no IMG (em azul). O valor de Stress para essa análise foi de 0,1237.

A maior parte dos metagenomas de água subterrânea (GW), assim como os de solos da floresta amazônica (AFS), água do mar (SS), compostagem de zoológico (ZC), drenagem ácida de mina (AMD) e pastagem (GL) foram posicionados em grupos, indicando similaridade entre suas funções do COG. Os metagenomas da mina do Sossego apresentaram similaridade funcional com os metagenomas de solos de turfeira PS-1 e PS-2 de comunidades de micro-organismos redutores de sulfato e também com um dos metagenomas de águas subterrâneas contaminadas com urânio (UWW-1), o qual é derivado de ambiente contaminado com metais pesados, ácido nítrico e solventes orgânicos (HEMME *et al.*, 2010). Já os metagenomas AMD que também são de ambientes de mina, não foram similares aos metagenomas da mina do Sossego, indicando que o ambiente de mina desse trabalho e o ambiente de drenagem ácida de mina possuem funções gênicas distintas.

As funções do COG significativamente abundantes (p < 0,01) na mina do Sossego estão representadas na Figura 10.



Figura 10. Distribuição das funções do COG que possuem diferença significativa nas abundâncias entre os 5 metagenomas da mina do Sossego (em azul) e os 31 metagenomas disponíveis do IMG (em amarelo).

As três funções mais abundantes foram a proteína predita de ligação ao soluto (*Predicted solute binding protein*), serina proteases semelhantes à subtilisinas (*Subtilisin*-

like serine proteases) e a 3-oxoacil-(ACP) redutase, relacionada à biossíntese de ácidos graxos, com diferenças nas proporções em relação aos 31 metagenomas de aproximadamente 11, 7 e 8 vezes, respectivamente. Como exemplo, as subtilisinas são enzimas bacterianas secretadas extracelularmente que agem degradando proteínas para aquisição de nutrientes. Essas enzimas possuem valor industrial como aditivo de detergentes, e têm maior atividade e estabilidade em ambientes alcalinos, assim como os pH de todas as amostras de solo da mina do Sossego (Tabela 2) (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; SIEZEN; LEUNISSEN, 1997)

Embora mecanismos de resistência ao cobre sejam comuns em micro-organismos, uma proteína não caracterizada de resistência ao cobre foi abundante em comparação com os outros metagenomas, mostrando que o maior nível de cobre dos solos da mina do Sossego leva os micro-organismos a terem maior quantidade de genes relacionados a esse metal (Tabela 2).

A superfamília AP (*alkaline phosphatase*) está associada com fosfatases alcalinas que estão presentes em micro-organismos e atuam hidrolisando proteínas, nucleotídeos, alcalóides e ésteres, para liberação e assimilação de fosfato inorgânico (P_i) (NALINI *et al.*, 2014, 2015; VEEN, 1997). Essas enzimas possuem maior eficiência em ambientes alcalinos, de maneira que a abundância da função proteína não caracterizada da superfamília AP (*Uncharacterized proteins of the AP superfamily*) possa ter relação com o pH medido nas amostras, já que em pH alcalino o fosfato disponível no ambiente tornase menos solúvel (NAUTIYAL *et al.*, 2000; VEEN, 1997). De qualquer modo, os micro-organismos continuam a necessitar de fósforo para ser utilizado nos seus respectivos metabolismos, tendo que obtê-lo de substâncias que possuem fósforo, o que justificaria a maior abundância dessa função (VEEN, 1997).

A abundância das funções relacionadas ao regulador da morfogênese celular e sinalização de óxido nítrico (NO) (*Regulator of cell morphogenesis and NO signaling*) e transporte do sistema ABC envolvido na maturação da enzima multicobre (*ABC-type transport system involved in multi-copper maturation*) indicam que existem mecanismos para reconhecer o estresse nitrossativo e a capacidade de reduzir óxido nitroso nesses metagenomas. Ambas as funções estão presente em micro-organismos de solo e podem estar envolvidas no processo de desnitrificação, onde a função de regulador da morfogênese celular e sinalização de NO seria um mecanismo para detectar o tóxico NO, o qual será reduzido por redutases de óxido nítrico (exemplo: COG3256, presente nos cinco metagenomas) para N₂O, e a função de transporte do sistema ABC envolvido na maturação da enzima multicobre está relacionada à transformação de N₂O para N₂ (JONES *et al.*, 2008).

A distribuição dos genes do COG nos metagenomas da mina do Sossego foi significativamente diferente dos outros metagenomas (PERMANOVA), sendo que de um total de 41 genes, 40 tiveram maior abundância nos metagenomas P1-2013, P2-2013, P3-2013, P4-2013 e P5-2013 (Figura 11). O gene mais abundante nos 31 metagenomas expressa as chaperonas GroEL da família *Heat-shock protein* (HSP) 60 (COG0459), as quais são essenciais para o crescimento bacteriano em diferentes temperaturas e estão envolvidas na degradação de proteínas regulatórias (FAYET; ZIEGELHOFFER; GEORGOPOULOS, 1989; ZAHRL *et al.*, 2007).



Figura 11. Distribuição dos COGs com diferença significativa nas abundâncias entre os 5 metagenomas da mina do Sossego (em azul) e os 31 metagenomas disponíveis do IMG (em amarelo).

O gene mais abundante nos metagenomas da mina do Sossego foi o da proteína de membrana (*Predicted membrane protein*) (COG5373) com diferença na proporção em relação aos outros metagenomas de aproximadamente 18 vezes. Grande parte dos genes abundantes possui função desconhecida (*Function unknown*) como os do COG2120 associados a homólogos do gene *lmbE*. Recentemente, esse gene foi descrito como codificando proteínas para os estágios finais da produção do antibiótico lincomicina A (MELANÇON III, 2015). Também foram abundantes genes com função geral apenas predita (*General function prediction only*) como os do COG1524 e COG4633,

relacionados à superfamília AP de fosfatases alcalinas e à plastocianinas, respectivamente. Essas últimas são proteínas carreadoras de elétrons da fotossíntese de cianobactérias e estão em maior proporção devido à abundância desse filo nos metagenomas da mina do Sossego (Figura 5).

Os genes aprE (COG1404), nosY (COG1777), hipB (COG1396), pcoB (COG3667) e sufl (COG2132) também foram abundantes. O gene nosY codifica uma proteína envolvida na montagem da redutase de óxido nitroso, enquanto aprE codifica uma serina protease alcalina (subtilisina) secretada no ambiente para degradar outras proteínas e é geralmente encontrado em B. subtilis (HAN et al., 2013; SIEZEN; LEUNISSEN, 1997). Pseudomonas e Escherichia, integrantes do filo Proteobacteria, também possuem a mesma subtilisina e são as prováveis origens taxonômica de aprE, já que foi pequena a abundância do filo Firmicutes (Figura 5), o qual B. subtilis pertence (DUONG et al., 1994; HONISCH; ZUMFT, 2003). A abundância dos genes hipB, pcoB e sufI dá indícios de que os micro-organismos estão adaptados ao ambiente de mina. O primeiro codifica HipB, uma antitoxina que forma dímeros com a toxina HipA, reprimindo o operon hipBA e impedindo a formação de células persistentes, as quais são mais resistentes à antibióticos e metais (HARRISON et al., 2005; HARRISON; TURNER; CERI, 2005; JAYARAMAN, 2008; SCHUMACHER et al., 2009). O segundo codifica uma provável proteína de membrana do operon pcoABCD, responsável pela bomba de efluxo de excesso de cobre do citoplasma (BEHLAU et al., 2011; MELLANO; COOKSEY, 1988). O terceiro produz a proteína SufI envolvida na estabilidade da divisão celular de E. coli em diversos tipos de estresse como o estresse osmótico (REDDY, 2007; SAMALURU; SAISREE; REDDY, 2007). PEREIRA; VICENTINI; OTTOBONI (2014) relataram que os micro-organismos dos solos contaminados com drenagem neutra da mina do Sossego são resistentes ao estresse ambiental. De fato, sabe-se que o contato

constante com metais pesados seleciona micro-organismos resistentes (KUNITO *et al.*, 1997a, 1997b, 1999; PEREIRA; VICENTINI; OTTOBONI, 2014), de modo que a abundância de um gene que reprime o fenômeno da persistência junto da abundância de genes para tolerância ao cobre (*pcoB*) e estabilização da divisão celular em ambientes de estresse (*sufT*) indicam que a microbiota já está adaptada ao ambiente da mina do Sossego.

Alguns genes presentes nos metagenomas podem ser de interesse para algumas áreas de estudo como os de resistência a antibióticos encontrados naturalmente no ambiente para área clínica, os de resistência a metais e do metabolismo de enxofre, no caso dos metais sulfetados da mina do Sossego, para a indústria de mineração e os genes e micro-organismos relacionados à degradação de substâncias nocivas em processos de biorremediação. Dessa forma, uma busca pelos genes associados a esses três campos foi realizada para melhor compreensão do potencial funcional desses cinco metagenomas.

4.3.1. Metagenômica para Resistência a Antibióticos

A resistência a antibióticos não está restrita a bactérias patogênicas. É encontrada também em micro-organismos produtores de antibióticos e patógenos oportunistas presentes em diferentes ambientes (BENVENISTE; DAVIES, 1973; WRIGHT, 2010). Alguns dos micro-organismos envolvidos nessa resistência são capazes de degradar e modificar os antibióticos, utilizando-os como fonte de carbono, o que é de interesse biotecnológico pela possibilidade de se sintetizar novos compostos. Além disso, existe uma importância clínica e ambiental, já que genes de resistência a antibióticos podem ser transferidos para bactérias patogênicas e podem indicar contaminação por fontes antropogênicas (DANTAS *et al.*, 2008; WRIGHT, 2010). O banco de dados ARDB possui 23137 sequências de 380 ARGs (Genes de Resistência a Antibióticos) codificando resistência a 249 antibióticos. A anotação dos cinco metagenomas no banco de dados ARDB atribuiu função a aproximadamente 0,3 a 0, 5% dos genes em relação ao total de

CDS das amostras, o que corresponde a um total de 163 ARGs diferentes que estão associados à resistência a 17 tipos de antibióticos (Figura 12).



Figura 12. Abundância relativa dos genes atribuídos a diferentes classes de antibióticos do banco de dados ARDB para resistência a antibióticos. Cada valor corresponde a atribuição em todos os 5 metagenomas da mina do Sossego.

NESME *et al.* (2014) analisaram 71 metagenomas ambientais para verificar a existência de genes de resistência a antibióticos. Os autores destacam que os tipos de resistência comumente encontradas nesses ambientes foram da multidrogas como bacitracina, vancomicina, tetraciclina, penicilina e betalactama, o que também ocorre nos metagenomas estudados. A diversidade de classes de antibióticos encontrados nos metagenomas P1-2013, P2-2013, P3-2013, P4-2013 e P5-2013 foi inferior às encontradas

em águas de descarte (de 42 a 54 classes) e muito inferior às quantidades encontradas em intestinos de humanos (149 classes) (HU *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013b), o que era esperado, já que os solos amostrados da mina do Sossego não possui relato de contato com antibióticos para algum fim como é o caso de ambientes contaminados pelo descarte de áreas agrícolas (WRIGHT, 2010). Dessa maneira, os genes encontrados estão presentes possivelmente por causas naturais, sendo que as abundâncias de genes estão similares as verificadas por NESME *et al.* (2014) em solos de floresta e campos.

4.3.2. Metagenômica para Indústria de Mineração

Micro-organismos naturais de ambientes de mina já foram isolados e mostraram resistência ou tolerância a cobre, níquel, zinco e chumbo. A resistência a metais é uma característica desejada em micro-organismos envolvidos em processos de biolixiviação e pode auxiliar na biorremediação de solos contaminados com drenagem de mina, já que também é necessária (BANERJEE, 2004; NAVARRO; VON BERNATH; JEREZ, 2013; XIE *et al.*, 2010). A anotação utilizando 444 proteínas experimentalmente relacionados à resistência e tolerância a metais do banco de dados BacMet (Figura 13) revelou aproximadamente 0,5% do total de proteínas relacionadas a resistência a algum metal.



Figura 13. Abundância relativa das sequências das proteínas dos 5 metagenomas da mina do Sossego anotadas no banco de dados Bacmet para proteínas relacionadas à resistência a metais. A categoria Multimetal refere-se a proteínas que estão associadas à resistência ou tolerância a mais de um metal.

A abudância de proteínas de resistência a metais corrobora a abundância da proteína não caracterizada de resistência ao cobre na metagenômica comparativa (Figura 10) e do gene *pcoB* (COG3667) (Figura 11). Apesar do pH alcalino, os metais precipitados podem variar sua solubilidade e afetar a comunidade microbiana da mina do Sossego (BALISTRIERI; MURRAY; PAUL, 1994; RAMÍREZ-PÉREZ *et al.*, 2013), o que reforça a associação entre a comunidade microbiana e os níveis de cobre encontrados por PEREIRA; VICENTINI; OTTOBONI (2014). A categoria de resistência a mais de um metal foi a mais abundante e mostra que os micro-organismos possuem mecanismos

comuns para lidar com diferentes metais como genes codificadores de sistema de efluxo de cátions que conferem resistência ao cobre, prata e níquel.

A oxidação de metais sulfetados é útil em sistemas controlados de biolixiviação de modo que o metabolismo de enxofre possui relevância nesses processos. Os microorganismos envolvidos na biolixiviação obtém energia principalmente da oxidação de tiossulfato, tetrationato e enxofre elementar formando sulfato, e/ou da oxidação de ferro (LEVICÁN *et al.*, 2008). Por outro lado, a redução de sulfato por bactérias redutoras de enxofre tem importância na precipitação de metais e na descontaminação de áreas impactadas pela drenagem ácida de mina (BAI *et al.*, 2013; LUPTAKOVA; KUSNIEROVA, 2005).

A reconstrução da rota metabólica do metabolismo do enxofre dos metagenomas P1-2013, P2-2013, P3-2013, P4-2013 e P5-2013 revelou os genes *cysND* (K00955, K00956, K00957), *cysH* (K00390), *cysJI* (K00381) e *sir* (K00392), presentes nas vias da redução assimilatória do sulfato (Figura 14A) e relacionados a redução de sulfato para sulfeto em condições anaeróbicas, sendo que o metagenoma P5-2013 apresentou um gene adicional nessa via que codifica uma sulfato adeniltransferase (K13811).



Figura 14. (**A**) Via da redução assimilatória do sulfato. (**B**) Via de redução e oxidação dissimilatória do sulfato.

Também foram observados os genes *sat* (K00958), *aprAB* (K00394 e K00395) e *dsrAB* (K11180 e K11181), formando a rota metabólica completa de redução e oxidação dissimilatória do sulfato. Esta via pode agir tanto de maneira oxidativa quanto redutiva, e está envolvida na transformação de sulfato para sulfeto e vice-versa (Figura 14B). Os genes *doxD* (K16937), *sseA* (K01011) e *dsrA* (K11180) também estão presentes nos metagenomas, o que sugere a habilidade de oxidar tiosulfato, tritionato e sulfito, respectivamente. O gene *ffcB* (K17229) codificador de uma desidrogenase que oxida enxofre elementar para sulfeto, estava presente nos metagenomas de P1-2013, P2-2013 e P3-2013, indicando a possibilidade de oxidar enxofre elementar para solfatoria do sulfato. Genes envolvidos no sistema SOX para oxidação de tiossulfato não foram observados na anotação KO, todavia foram encontrados em todos metagenomas os genes representados pelo COG0737 (*soxB*), COG2041 (*soxC*), e COG3474 (*soxD*) na anotação COG e PF08770 (*soxZ*), PF13501 (*soxY*), PF06525 (*soxE*) na anotação PFAM, indicando a existência desse sistema nos metagenomas.

No que tange a oxidação de ferro, o *operon ru*s que codifica a rusticianina, uma proteína intrinsicamente envolvida na oxidação de ferro, não foi encontrado em qualquer anotação. Em ambientes ácidos, a rusticianina é estável e o ferro está disponível na forma de íon ferroso (Fe^{2+}). Todavia, em ambientes como os das amostras onde o pH é alcalino, o ferro é geralmente encontrado oxidado devido a uma oxidação química espontânea, de maneira que não está disponível para os micro-organismos oxidantes de ferro (JOHNSON; KANAO; HEDRICH, 2012; KANBI *et al.*, 2002), sendo que a presença do operon *rus* não era esperada.

4.3.3. Potencial para Degradação de Compostos Aromáticos

A utilização de dois bancos de dados de degradação de compostos aromáticos para anotar proteínas nos metagenomas das amostras P1-2013, P2-2013, P3-2013, P4-2013 e P5-2013 resultou em porcentagens de anotações variando de 0,02 a 0,05% em relação ao total de proteínas das amostras (Figura 15). Ambos os bancos possuem sequências curadas para proteínas de rieske e extradiol, que são oxigenases e dioxigenases chaves na degradação de compostos aromáticos (CHAKRABORTY *et al.*, 2014; DUARTE *et al.*, 2014).



Figura 15. Abundância relativa das sequências de proteínas dos 5 metagenomas da mina do Sossego anotadas nos bancos de dados Aromadeg e Rhobase para proteínas relacionadas à degradação de compostos aromáticos.

O metagenoma de P5-2013 foi o que mais apresentou genes para degradação de ácido protocatecuico, ftalato, gentisato e salicilato, com atribuições de aproximadamente 13%, 16%, 11% e 7,5%, respectivamente. Esses genes foram descritos como envolvidos na degradação de carbazol e compostos bicíclicos e policíclicos (IWABUCHI; HARAYAMA, 1998; LAURIE; LLOYD-JONES, 1999; SATO *et al.*, 1997). O fenol e

os compostos BTEX são moléculas aromáticas encontradas em águas e solos, podendo estar presentes naturalmente no ambiente ou serem produzidas através de atividades humanas refinamento petróleo (KRASTANOV; ALEXIEVA; como 0 do YEMENDZHIEV, 2013; SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995). Muitos estudos de solos levaram à descoberta de diferentes moléculas como dioxigenases, endoxilenases e outros biocatalisadores, porém o solo continua a ser um reservatório de recursos genéticos (ALVAREZ et al., 2013; CHEMERYS et al., 2014; MOCALI; BENEDETTI, 2010; VOGET et al., 2003). Somado a isto, sabe-se que micro-organismos do solo têm a capacidade de catabolizar compostos aromáticos e que essa habilidade possui importância em processos industriais e na descontaminação de ambientes (KRASTANOV; ALEXIEVA; YEMENDZHIEV, 2013; SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995). Apesar do pouco número de proteínas anotadas, variando de 66 a 227 (Figura 15), todas as amostras apresentaram maiores atribuições a proteínas associadas principalmente ao catabolismo de clorobenzeno, etilbenzeno, isopropilbenzeno e benzoato, o que sugere que os micro-organismos presentes na Mina do Sossego também podem atuar na biodegradação de outras substâncias com anéis benzênicos como o fenol, tolueno e xileno. Outro fator a se considerar, é que a identidade média das proteínas de todos os metagenomas foi de aproximadamente 56,1%, sugerindo que novas isoformas estão presentes nesses metagenomas e ressaltando a necessidade de se investigar a origem taxonômica dessas proteínas (Figura 16).



Figura 16. Abundância relativa dos filos e gêneros baseada nas proteínas anotadas nos bancos de dados Aromadeg e Rhobase para degradação de compostos aromáticos. (A) Filos com atribuição de genes superior ou igual a 1%. "Outros" corresponde ao filo Thermobaculum. (B) Gêneros com atribuição de proteínas superior ou igual a 5%. A relação completa dos gêneros representados como "Outros" está no Anexo E.

Micro-organismos isolados não degradam uma mistura de compostos em áreas contaminadas, enquanto que consórcios são comumente empregados para biodegradação de fenol e BTEX (DHANYA VIJAYAN et al., 2014; LITTLEJOHNS; DAUGULIS, 2008; NAGARAJAN; LOH, 2014). Os filos mais abundantes, Proteobacteria e Actinobacteria, já foram associados diversas vezes à degradação de compostos aromáticos (ABED; AL-KINDI; AL-KHARUSI, 2014; CERNIGLIA, 1992; ISAAC et al., 2015; NÍ CHADHAIN et al., 2006; SOLYANIKOVA et al., 2015; VIÑAS et al., 2005; WEIDOW et al., 2014). Recentemente, ISAAC et al. (2015) criaram um consórcio com Pseudomonas (Proteobacteria) isoladas de sedimentos marinhos contaminados com óleo (ISAAC et al., 2013), e Rhodococcus e Gordonia (Actinobacteria) de solos contaminados da Patagônia, Argentina. Essa mistura de micro-organismos removeu, em sistema aquoso, 100% de naftaleno e fenantreno, e 13% a 42% de pireno, e segundo os autores, agiram de maneira sinérgica. Esses resultados demonstram como esses dois filos possuem capacidade de degradar compostos nocivos, sendo que sequências relacionadas ao gênero Rhodococcus tiveram, nos metagenomas de P1-2013 e P2-2013, atribuições de 5% e 4%, respectivamente.

Em relação aos outros gêneros do filo Actinobacteria presentes nos metagenomas da Mina do Sossego, as maiores atribuições foram de sequências associadas à *Nocardioides*, com 11,25% na amostra P1-2013 e 9% em P2-2013 e *Mycobacterium*, com 10%, 9% e 8,6% em P1-2013, P2-2013 e P5-2013, respectivamente. MARCOS; LOZADA; DIONISI (2009) analisaram dioxigenases de compostos aromáticos de bactérias Gram-positivas em amostras de solos contaminados com petróleo e identificaram 14 grupos distintos pertencentes a gêneros como *Rhodococcus*, *Nocardioides*, *Mycobacterium*, entre outros. Os autores ainda ressaltam que as sequências não possuem alta identidade, o que pode indicar que esses micro-organismos produzem

enzimas diferentes das que estão em banco de dados. Para o metagenomas P3-2013, a maior porcentagem de atribuição das sequências foi relacionada ao gênero *Frankia* com 5,8% e para P4-2013, o gênero *Pseudonocardia* com 4,35%. Os gêneros *Frankia* e *Pseudonocardia* possuem representantes capazes de degradar compostos como naftaleno, cloroeteno e quinolina (BAKER *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2004; LIN; TANG; LIN, 2011).

Para o filo Proteobacteria, as maiores atribuições foram dos gêneros *Tistrella* com 10% e 4,65% em P1-2013 e P3-2013, respectivamente, *Novosphingobium, Polaromonas* e *Cycloclasticus*, todos com 5% em P2-2013, *Burkholderia* e *Sphingomonas*, ambos com 6,5% em P4-2013 e *Methylibium* e *Chromohalobacter*, com 8,57% e 7,14%, respectivamente em P5-2013. Um exemplo do potencial de biorremediação de alguns desses gêneros é mostrado por ZHAO *et al.* (2008), que isolaram *Sphingomonas* sp. ZP1 e *Tistrella* sp. ZP5 de solos contaminados pelo descarte de uma refinaria na China. Os autores relataram que a primeira espécie foi capaz de degradar naftaleno, fenantreno e tolueno e a segunda, aumentou a velocidade de degradação de naftaleno da *Sphingomonas* sp. ZP1. Outro exemplo de potencial para utilização na biorremediação e biotecnologia, são as bactérias *Methylibium petroleiphilum* PM1, que cresce na presença de tolueno, benzeno, fenol, entre outras substâncias (NAKATSU *et al.*, 2006) e *Chromohalobacter* sp. HS-2, que cresce em benzoato e 4-hidroxibenzoato (KIM *et al.*, 2008).

Dos demais filos, vale ressaltar a presença de sequências associadas ao gênero *Meiothermus* (10,87%) do filo Deinococcus-Thermus em P4-2013 e *Singulisphaera* (7,15%) do filo Planctomycetes em P5-2013, porém ambos os gêneros são pouco citados como degradadores de compostos aromáticos e a presença de sequências relacionadas a eles pode indicar um novo potencial desses micro-organismos. Para se ter um panorama de como os genes relacionados ao catabolismo de anéis benzênicos estão correlacionados,

foi realizado a reconstrução de vias metabólicas de degradação de compostos BTEX e fenol.

A reconstrução da rota metabólica de degradação de benzoato de todos os metagenomas revelou a via completa de transformação de catecol para piruvato que será utilizado na glicólise (Figura 17A). Também, os metagenomas de P2-2013 e P5-2013 possuem genes para transformar catecol em succinil-CoA, o qual participará da via do ácido cítrico, todavia faltam os genes *pcaF* (K07823) nos metagenomas de P1-2013 e P4-2013, e *catC* (K03464) em P3-2013 e P4-2013 (Figura 17B).



Figura 17. Catabolismo do catecol para os 5 metagenomas da mina do Sossego. (**A**) Formação de piruvato para Glicólise. (**B**) Formação de succinil-CoA para via do ácido cítrico.

Algumas especificidades funcionais foram observadas no metagenoma P1-2013 que apresentou genes codificando uma enzima fenol hidrolase (K16242) envolvida no catabolismo de fenol e benzeno, e o gene *benD-xylL* (K05783) relacionado a produção de catecol a partir de benzoato (Figura 18). Os metagenomas P2-2013 e P3-2013 apresentaram genes responsáveis pelo catabolismo de benzeno e fenol para produção de catecol.



Figura 18. Catabolismo do benzoato, benzeno e fenol para os 5 metagenomas da mina do Sossego.

O fenol é um dos poluentes mais comuns no ambiente (KRASTANOV; ALEXIEVA; YEMENDZHIEV, 2013; SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995), de modo que a presença da rota metabólica completa para degradação de fenol para moléculas mais simples nos metagenomas de P1-2013 e P2-2013 se torna recurso genético para novos estudos. Esta rota metabólica tem maior importância ao considerar que o primeiro intermediário na degradação do fenol é o catecol, um composto aromático utilizado em diferentes indústrias para produção de sabores, agroquímicos e remédios. A produção de catecol é realizada através de químicos e reações poluidoras, porém existem estudos que utilizam micro-organismos para o catabolismo de benzoato e fenol em catecol (CAFARO *et al.*, 2005; DRATHS; FROST, 1995; MA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2001).

Em relação à reconstrução da rota metabólica de degradação de tolueno, o metagenoma de P2-2013 possui uma rota completa para formar benzoato a partir de tolueno, que envolve inicialmente uma tolueno monooxigenase e ums xileno monooxigenase (K15765 e K15757, respectivamente) (Figura 19B).



Figura 19. Metabolismo de degradação de tolueno para os 5 metagenomas da mina do Sossego. (**A**) Catabolismo de tolueno para produção de 3-Metilcatecol. (**B**) Catabolismo de tolueno para produção de benazoato.

O 3-metilcatecol (3MC) é um substituto do catecol na produção de fármacos e sabores. Sua síntese química é complexa, apresenta diversas reações e baixo rendimento, de modo que sua produção é feita através da biotecnologia, empregando tolueno como substrato e bactérias imobilizadas como biocatalizadores. Atualmente, há pesquisas para produção biotecnológica de 3MC com a utilização de bactérias modificadas do gênero *Pseudomonas* (FAIZAL *et al.*, 2007; HELD *et al.*, 1999; HÜSKEN *et al.*, 2002; KONGPOL *et al.*, 2014; SHIRAI, 1986; WERY; MENDES DA SILVA; DE BONT, 2000). Os metagenomas de P1-2013 e P2-2013 mostraram a mesma fenol hidrolase (K16242) mencionada no catabolismo de fenol (Figura 18), transformando tolueno em 3MC através da via do orto-cresol (Figura 19A), a qual já foi utilizada com uma 2,3-dihidroxi-bifenil 1,2-dioxigenase de *E. coli* recombinantes para produção de 3MC (SHI *et al.*, 2013).

Poucos genes foram observados na rota metabólica reconstruída de degradação de etilbenzeno (Figura 20). Somente os metagenomas da pilha de cobre apresentaram *etbA* (K14748 e K14749), *etbC* (K14751) e *etbD* (K18092), genes relacionados a conversão de etilbenzeno em propanoato que são expressos na presença de compostos como bifenil



e benzoato (GONÇALVES et al., 2006; PATRAUCHAN et al., 2008)

Figura 20. Catabolismo do etilbenzeno para os 5 metagenomas da mina do Sossego.

Na reconstrução da rota metabólica de degradação de xileno, o metagenoma de P2-2013 foi o único que apresentou os genes para a transformação inicial de p-, o- e mxileno e p-cimeno em seus respectivos álcoois. Uma via completa de catabolismo de 4metilcatecol, produto da degradação de tolueno, em propanoil-CoA foi observado em todos os metagenomas, exceto o metagenoma P5-2013 que não possui os genes *bphH* (K18364), *bphI* (K18365) e *bphJ* (K18366) (Figura 21A). Os metagenomas P3-2013 e P4-2013 possuem todos os genes para o catabolismo de 3-metilcatecol, produzido pela via do orto-cresol de degradação de tolueno (Figura 21B), em acetil-CoA.



Figura 21. Rota parcial do metabolismo da degradação de xileno dos 5 metagenomas da mina do Sossego, onde a transformação de xileno para 4-metilcatecol e 3-meticatecol está simplificado por única etapa. (A) Catabolismo do 4-metilcatecol. (B) Catabolismo do 3-metilcatecol.

O conhecimento sobre os recursos genéticos presente na mina do Sossego pode auxiliar na construção de bactérias modificadas e bioprospecção de novas enzimas, as quais poderão ser utilizadas na produção de compostos de interesse industrial como o catecol e 3MC. A gama de genes relacionados à degradação de compostos aromáticos encontrada nos metagenomas possui importância para futuros isolamentos de microorganismos e especialmente, na preparação de consórcios microbianos, já que fornece uma direção do que se pode buscar nesse ambiente, permitindo o preparo de meios específicos para degradação de compostos aromáticos.

4.4. Recuperação de Genomas

Com o advento sequenciamento automático e a expansão da quantidade de dados gerados nos sequenciadores, alguns estudos conseguiram reconstruir genomas a partir de sequências metagenômicas em diferentes ambientes como drenagem ácida de mina (DICK *et al.*, 2009; TYSON *et al.*, 2004), permafrost (MACKELPRANG *et al.*, 2011) e lodo ativado (ALBERTSEN *et al.*, 2013), todavia essa é primeira vez que se recupera genomas de metagenomas de solos contaminados com drenagem neutra de mina e solos de pilha de minério de cobre.

Todas as amostras geraram bins com variada abundância e taxa de integridade, porém apenas o metagenoma da amostra P4-2013 gerou 2 bins (002 e 003) prováveis de serem genomas. Através do BLASTP com o MEGAN (CAMACHO et al., 2009; HUSON et al., 2007), as bins foram anotadas nos gêneros Geitlerinema e Meiothermus, pertencentes aos filos Cyanobacteria e Deinococcus-Thermus, respectivamente. A bin 002 foi composta por 83 contigs, que totalizaram 4,68 Mpb, N50 de 95253 pb, maior tamanho de *contig* de 240402 pb e tamanho médio de *contig* de 56451 pb, enquanto a bin 003 apresentou 118 contigs em um total de 3,48 Mpb, N50 de 47647 pb, maior tamanho de *contig* de 169522 pb e tamanho médio de *contig* de 29495 pb. A análise da integridade e contaminação das bins utilizando 104 marcadores bacterianos revelou 99,6% e 98,28% de integridade para a bin 002 e 003, respectivamente. Nenhuma contaminação pôde ser detectada. As reads da amostra P4-2013 foram alinhadas as duas bins selecionadas para recuperação de 475095 reads paired-end e 72124 single-end referentes à bin 002 e, 354420 e 43572 referentes a bin 003. Subsequentemente, as reads foram utilizadas individualmente nas montagens dos genomas com diferentes k-mers, gerando os genomas Geitlerinema CCNMD22 e Meiothermus CCNMD23. As métricas dos genomas recémmontados, além da porcentagem de integridade e contaminação foram utilizadas para
avaliação das montagens (Tabela 5). A porcentagem de integridade e contaminação não foi modificada pelas montagens, porém parâmetros como número de *contigs*, N50 e tamanho do maior *contig* melhoraram em relação às *bins*, de maneira que as duas montagens foram escolhidas como a versão final dos genomas recuperados e puderam ser utilizadas para construção da árvore filogenética e anotação funcional.

	Geitlerinema CCNMD22	Meiothermus CCNMD23
Tamanho (Mpb)	4,67	3,46
Número de contigs (pb)	77	96
%GC	58,64	57,29
Tamanho do maior contig (pb)	284686	169478
Tamanho do menor contig (pb)	1076	1102
Tamanho médio dos contigs (pb)	60744	36068
N50 (pb)	130444	60530
Integridade	99,66 %	98,28 %
Contaminação	0 %	0 %

Tabela 5. Métricas das montagens, integridade e contaminação dos genomas.

A análise filogenética utilizando 29 proteínas concatenadas de 80 espécies mais os 2 genomas recuperados através da máxima verossimilhança (*maximum likelihood*) corroborou a taxonomia atribuída inicialmente pelo MEGAN (Figura 22). Quatro grupos distintos e coerentes foram formados, sendo eles correspondentes ao filo Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Deinococcus-Thermus. O genoma *Geitlerinema* CCNMD22 encontra-se no mesmo ramo do genoma completo *Geitlerinema* sp. PCC 7407 e dentro do grupo de genomas de cianobactérias, assim como o genoma *Meiothermus* CCNMD23 está mais próximo de *Meiothermus ruber* DSM 1279, no mesmo ramo de *Meiothermus silvanus* DSM 9946 e dentro do grupo de genomas de Deinococcus-Thermus.



Figura 22. Árvore filogenética feita pelo método da Máxima Verossimilhança e 1000 replicações. Genomas recuperados estão em negrito. Cores representam os filos Cyanobacteria (azul), Firmicutes (amarelo), Proteobacteria (verde) e Deinococcus-Thermus (vermelho).

O filo Cyanobacteria é composto por bactérias fotossintéticas, formadoras de biofilme e fixadoras de nitrogênio atmosférico que estão presentes em uma variedade de ambientes como solos, rochas, minérios, rios, mares, porém, não toleram pH ácido (AMAROUCHE-YALA et al., 2014; GORBUSHINA; BROUGHTON, 2009; WIERZCHOS; ASCASO; MCKAY, 2006). Essas bactérias possuem importância no processo de deterioração de construções e intemperismo de pedras e rochas, já que secretam ácidos orgânicos que irão acelerar a decomposição e a liberação de nutrientes da superfície a qual estão fixadas (CRISPIM; GAYLARDE, 2004; GORBUSHINA; BROUGHTON, 2009; SIEBERT et al., 1996). As cianobactérias também possuem relevância na área de saúde pública devido a produção de cianotoxinas que podem contaminar águas de reservatórios e causar danos hepatotóxicos, neurotóxicos e/ou dermatotóxicos a humanos e animais (DOGO et al., 2011). Espécies do gênero Geitlerinema como G. amphibium, G. splendidum, G. carotinosum, G. acutissimum, entre outras já foram encontradas em diferentes ambientes como lagoas hipersalinas, fontes termais, solos e águas contendo H2S (AMAROUCHE-YALA et al., 2014, 2014; ANAGNOSTIDIS, 1989; MARGHERI et al., 2003; SOROKOVIKOVA et al., 2013), porém até o momento apenas o genoma completo da bactéria Geitlerinema sp. PCC 7407 (sinônimo Geitlerinema sp. ATCC 29126) isolada por RIPPKA et al. (1979) e sequenciado por SHIH et al. (2013) está disponível no NCBI (BioProject PRJNA183007, IMG Project ID: Gp0005969).

O filo Deinococcus-Thermus é reconhecido como o mais extremófilo dos filos bacterianos, sendo composto por bactérias termófilas e hipertermófilas (ordem Thermales) ou que apresentam resistência à ionização, radiação ultravioleta ou dessecação (ordem Deinococcales), podendo habitar solos de fontes termais, solos utilizados no crescimento de cogumelos ostra, água industrial, sítios radioativos, rios contaminados por uma mina de arsênio e drenagem ácida de mina (ASKER et al., 2011; HALTER et al., 2011; KÄMPFER et al., 2008; KUANG et al., 2013; ROSENBERG, 2014; THEODORAKOPOULOS et al., 2013; VAJNA et al., 2012; YU et al., 2013). Devido à capacidade desses micro-organismos sobreviverem em condições adversas, essas bactérias e suas proteínas apresentam interesse biotecnológico com potenciais aplicações no campo da biologia molecular com a produção de enzimas termoestáveis; na área da biorremediação em biorreatores de tratamento de esgoto; na produção de carotenoides que podem ser utilizados tanto para aumentar a resistência de bactérias modificadas e plantas de interesse econômico quanto na saúde humana como antioxidantes naturais (KIM et al.. 2014; ROSENBERG, 2014: THEODORAKOPOULOS et al., 2013; TIAN; HUA, 2010). Espécies como M. ruber, M. silvanus, M. cerbereus, M. rufus e M. timidus e outras, que já foram isolados de solos e de fontes termais (CHEN et al., 2002b; CHUNG et al., 1997; PIRES et al., 2005; YU et al., 2014), e também são estudadas para aplicações biotecnológicas, principalmente M. ruber, que foi avaliada em relação à produção de butanol através de enzimas chaves como crotonases e tiolases, e em relação à degradação de penas de aves (REIBE; GARBE; BRÜCK, 2014, 2015; YAMAOKA et al., 2014). Recentemente, PEREIRA; VICENTINI; OTTOBONI, (2014) estudando solos da mesma drenagem neutra desse estudo, correlacionaram o gênero Meiothermus com concentrações de cobre, o que agora pode auxiliar na busca de genes de resistência e tolerância a metais pesados no genoma Meiothermus CCNMD23. Até o momento estão disponíveis no NCBI os genomas completos das espécies M. ruber DSM 1279 (sequenciado por TINDALL et al. (2010) -BioProject PRJNA46661, IMG Project ID: Gp0001170) e M. silvanus DSM 9946 (sequenciado por SIKORSKI et al. em 2010 - BioProject PRJNA49485, IMG Project ID:

Comparações pareadas dos dois genomas recuperados e os genomas completos de *M. ruber* DSM 1279, *M. silvanus* DSM 9946 e *Geitlerinema* sp. PCC 7407 foram realizadas utilizando a frequência de tetranucleotídeos e ANI (Tabela 6) (Figura 23).

 Tabela 6. Comparação pareada dos 5 genomas pela frequência de tetranucleotídeos e

 ANI.

	Frequência de tetranucleotídeos				
	Meiothermus CCNMD23	M. silvanus DSM9946	<i>M. ruber</i> DSM1279	<i>Geitlerinema</i> sp. PCC7407	Geitlerinema CCNMDD22
Meiothermus CCNMD23		0,8661	0,8349	0,3866	0,3906
<i>M. silvanus</i> DSM9946	0,8661		0,8998	0,4284	0,4288
M. ruber DSM1279 Geitlerinema	0,8349	0,8998		0,3757	0,3774
sp. PCC7407	0,3866	0,4284	0,3757		0,9997
Geitlerinema CCNMD22	0,3906	0,4288	0,3774	0,9997	
	ANI (%)				
Meiothermus CCNMD23		82,38	82,53	ND	ND
<i>M. silvanus</i> DSM 9946	82,37		84,43	ND	ND
M. ruber DSM 1279 Geitlerinema	82,5	84,42		ND	ND
sp. PCC7407	ND	ND	ND		98,27
<i>Geitlerinema</i> CCNMD22	ND	ND	ND	98,33	

Valores não definidos estão indicados por ND. Valores da análise da frequência de tetranucleotídeos estão expressos pelo coeficiente de correlação. Valores da análise de identidade média de nucleotídeo estão expressos em porcentagem de alinhamento.



Figura 23. Representação gráfica dos valores obtidos na análise de ANI (A) e na frequência de tetranucleotídeos (B).

A frequência de tetranucleotídeos dos genomas funciona como uma assinatura de cada micro-organismo, de maneira que bactérias relacionadas filogeneticamente possuem frequências similares (DICK *et al.*, 2009; PRIDE *et al.*, 2003). A ANI é um método de hibridização DNA-DNA *in silico* que funciona de modo similar a frequência de tetranucleotídeos, onde valores iguais ou superiores a 95-96% normalmente indicam micro-organismos da mesma espécie (GORIS *et al.*, 2007; KONSTANTINIDIS;

TIEDJE, 2005; RICHTER; ROSSELLÓ-MÓRA, 2009), de modo que ambas as análises possuem forte correlação, ou seja, quando o valor é alto em uma análise, espera-se que também seja na outra (RICHTER; ROSSELLÓ-MÓRA, 2009). As análises indicam que Geitlerinema CCNMD22 e Geitlerinema sp. PCC 7407 são bactérias da mesma espécie, já que tanto para a frequência de tetranucleotídeos quanto para a ANI os valores são elevados. Somado a isso, o genoma recuperado apresenta tamanho de genoma e conteúdo GC (Tabela 5) próximos da linhagem PCC 7407, que possui genoma de 4.68 Mbp e 58,50% de conteúdo GC. Já a comparação de Geitlerinema CCNMD22 com Meiothermus CCNMD23, M. ruber DSM 1279 e M. silvanus DSM 9946 confirma que esses genomas não possuem relação e são de grupos taxonômicos distintos, pois apresentaram baixa correlação da frequência de tetranucleotídeos e valores não definidos de ANI, o que está de acordo com a árvore filogenética construída com as 29 proteínas marcadores bacterianos (Figura 22). As espécies M. ruber DSM 1279 e M. silvanus DSM 9946 apresentaram valores na faixa de 0,8-0,9 e 80-85% para a análise de frequência de tetranucleotídeos e ANI, respectivamente, o que mostra que os genomas possuem relação, mas não são da mesma espécie. Em relação ao genoma Meiothermus CCNMD23, ele não é de nenhuma das espécies de Meiothermus utilizadas nas análises, podendo ser de uma nova espécie, já que apresentou valores próximos dos obtidos nas comparações de M. ruber DSM 1279 e M. silvanus DSM 9946. Todavia, devido ao método de recuperação utilizado, o mais provável é que Meiothermus CCNMD23 contenha sequências de diferentes espécies de Meiothermus, sendo, portanto, um representante deste gênero.

4.4.1. Geitlerinema CCNMD22

A anotação funcional dos genomas *Geitlerinema* CCNMD22 revelou 3897 genes (Tabela 7). Mais de 75% deles com função definidas nos dois genomas, sendo que a maior parte teve anotação em PFAM e COG.

	Geitlerinema CCNMD22
Genes	3897
RNA genes	51
tRNA genes	40
rRNA genes	0
CDS	3846
Com função definida	2942
com COG	2270
com KO	1620
com Pfam	3073
com TIGRfam	1131

Tabela 7. Anotação funcional pelo servidor IMG do genoma Geitlerinema CCNMD22.

O mapeamento da sintenia dos genomas de CCNMD22 e PCC 7407 mostrou alta conservação na sequência de nucleotídeos (Figura 24), o que permitiu a ordenação dos *contigs* de CCNMD22 baseada no genoma completo de PCC7407 (Figura 25).



Figura 24. Sintenia entre *Geitlerinema* CCNMD22 e *Geitlerinema* PCC 7407. Pontos azuis correspondem regiões encontradas no sentido senso da sequência de nucleotídeos e vermelhos no sentido antisenso.



Figura 25. Ordenação dos *contigs* de *Geitlerinema* CCNMD22 baseada no genoma completo de *Geitlerinema* PCC 7407. As linhas ligam um *contig* a sua posição correspondente no genoma de *Geitlerinema* PCC 7407. A seta em azul indica o começo do genoma de *Geitlerinema* PCC 7407 e a vermelha, o fim (sentido horário).

Quando se compara a similaridade das sequências presentes em *Geitlerinema* CCNMD22 e em *Geitlerinema* PCC 7407 através do algorítimo do BLAST, a semelhança entre os dois genomas ficam novamente evidenciadas, mostrando também que existem poucas regiões que não foram montadas no genoma recuperado de *Geitlerinema* CCNMD22 (Figura 26).



Figura 26. Comparação entre a similaridade das sequências entre *Geitlerinema* CCNMD22 (círculo preto e contínuo do centro) e *Geitlerinema* PCC 7407 (círculo vermelho externo). Regiões com alta identidade são representadas como vermelho contínuo no círculo externo. O tracejado circular após o círculo central mostra o conteúdo GC da região.

A busca por homólogos foi realizada com os genomas CCNMD22, PCC 7407 e o genoma não completo *Geitlerinema* PCC 7105 (IMG *Project ID*: Gp0005072). O conjunto representado pela intersecção dos algoritmos COG e OMCL apresentou 1906 homólogos, o que corresponde a aproximadamente 49% do total de genes em *Geitlerinema* CCNMD22. Eles estão relacionados a diferentes metabolismos como de açúcares e nitrogênio, replicação de DNA, transcrição e síntese de proteínas, fotossistema

I e II, alguns transportadores do sistema ABC, resistência a arsênio e telúrio, além de várias proteínas hipotéticas ou não caracterizadas.

Um total de 309 genes foram encontrados somente no genoma de Geitlerinema CCNMD22 codificando diferentes enzimas como a metaloprotease da família M23 que lisa a parede celular de outras bactérias e são ativas em pH neutro (RAO et al., 1998; RAWLINGS; BARRETT; BATEMAN, 2012) e diversos genes para transposases, majoritariamente do tipo inserção de sequência (IS) e família IS200/IS605. O ambiente da mina do Sosssego possui alto teor de cobre (Tabela 2), o que pode justificar a presença, somente em Geitlerinema CCNMD22, de genes codificando ATPases transportadoras de cobre tipo P (copper-(or silver)-translocating P-type ATPase), proteínas de efluxo de cobre e que também estão envolvidas na resistência à prata em Sulfolobus solfataricus e E. coli (PAL et al., 2014; VÖLLMECKE et al., 2012), copZ, chaperona que auxilia na indução de resistência ao cobre (HARRISON et al., 2000), merR, reguladores que respondem a presença de metais pesados e íons metálicos (geralmente ao mercúrio) e estão presentes em diversas bactérias como Acidithiobacillus ferrooxidans, Deinococcus radioduran e Desulfitobacterium hafniense (BROWN et al., 2003). Além disso, elementos de inserção conferem plasticidade ao genoma, podendo regular a expressão de genes e auxiliar na expansão e eliminação de regiões do genoma (SIGUIER; GOURBEYRE; CHANDLER, 2014).

Em relação ao metabolismo de nitrogênio, o genoma *Geitlerinema* CCNMD22 aparenta ter a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico devido à presença do gene *nifU* do *operon nif* (2609074267) e de nitrogenases dependente de molibdênio (2609075097 e 2609076302) (HERRERO; MURO-PASTOR; FLORES, 2001; SEEFELDT; HOFFMAN; DEAN, 2009). Genes das subunidades *ureA* (2609076384), *ureB* (2609076385) e *ureC* (2609076386) de uma urease, de glutamina sintetase III (2609077847) e glutamato sintase (2609077696), os genes das redutases de nitrito *nirA* (2609075785) e nitrato *narB* (2609075792), e de uma cianase *cynS* (2609077048) estão presentes no genoma, o que sugere que essas bactérias assimilam nitrogênio de compostos como a uréia, amônia, nitrito, nitrato e cianeto (BIRD; WYMAN, 2003; HERRERO; MURO-PASTOR; FLORES, 2001; MURO-PASTOR; REYES; FLORENCIO, 2005). O genoma também possui genes característicos do filo Cyanobacteria para estocagem de nitrogênio em biopolímeros denominados cianoficinas através da cianoficinase (*cyanophycinase*) (2609075893) e de sua utilização pelas cianoficina sintetase (*cyanophycin synthetase*) (2609075892) (PICOSSI *et al.*, 2004).

O banco de dados CAZy foi utilizado para buscar enzimas associadas à degradação de carboidratos e revelou 71 genes com consistência adequada em relação ao domínio e tamanho do gene (Anexo F). Foram anotados 7 genes para o módulo CBM50 (2609076321, 2609077290, 2609077289, 2609077152, 2609075047, 2609076208 e 2609074563), codificando enzimas que se ligam a peptidoglicanos (BUIST *et al.*, 2008) e genes de hidrolases de glicosídeos relacionadas à degradação de peptidoglicanos como os das família GH23 (2609076419 e 2609075736), GH73 (2609076419 e 2609074935), GH102 (2609076299) e GH104 (2609077287, 2609075713 e 2609076758), sendo a última família presente em prófagos integrados no cromossomo bacteriano. Todos esses genes sugerem que *Geitlerinema* CCNMD22 utiliza carboidratos de origem bacteriana como fonte de nutrientes, todavia também foram encontrados genes das famílias GH57 (2609076952 e 2609076399), GH13 (2609076230 e 2609075734), GH31 (2609076157), GH116 (2609077755) e GH37 (2609076228) para hidrolisar outras fontes de di e polissacarídeos. Além disso, *Geitlerinema* CCNMD22 apresenta genes dos fotossistemas 1 e 2, e pigmentos como aloficocianina e ficocianina, o que sugere que possivelmente ela

consiga metabolizar tanto CO₂ quanto outras fontes carbono, assim como ocorre em outras cianobactérias (YOU; HE; TANG, 2015).

Oxigenases são enzimas que catalisam a oxidação de compostos orgânicos e possuem interesse biotecnológico para as indústrias (PROCÓPIO et al., 2012). Geitlerinema CCNMD22 apresentou 16 genes de dioxigenases codificando proteínas com o domínio LigB como a protocatecuato-4,5-dioxigenase (2609076610), enzima responsável por oxidar o composto aromático ácido 3,4-di-hidroxibenzóico (protocatecuico) (SUGIMOTO et al., 1999) e 3 genes de monooxigenases, das quais duas (2609074427 e 2609076330) estão relacionadas à produção de antibióticos. Genes para produção de metabólitos secundários foram buscados pelo antiSmash que apresentou 6 genes, incluindo dois para sideróforo sintetases envolvidas na produção de sideróforos (2609076180 e 2609076176), um para licopeno ciclase (2609075385) e outro para fitoeno sintase (2609074263), ambos relacionados a produção de tetraterpenóides como os carotenoides, e um para 3-oxoacil-ACP sintase (2609074225), proteína associada ao metabolismo de ácidos graxos e formação de policetídeos (YU et al., 2012). Dos mecanismos de defesa, Geitlerinema CCNMD22 apresentou genes codificando bombas de efluxo para resistência a múltiplas drogas, permeases e ATPases do sistema de transporte ABC de múltiplas drogas, além de genes de resistência a antibióticos como beta-lactâmicos (2609076321 e 2609077494). Todavia, nenhum gene para cianotixinas já descritas foi encontrado. Geitlerinema CCNMD22 aparenta ter a capacidade de produzir matriz extracelular de polissacarídeos (EPS) e foram encontrados genes com a mesma organização presente em Geitlerinema sp. PCC 7407 (Figura 27).



Figura 27. Organização estrutural de 8 genes relacionados à EPS (2609075619 a 2609075626) representados dentro do retângulo em negrito. Ordem dos genes: Glicosiltransferases família 2 (*rfbN*), Glicosiltransferases, UDP-glucose-4-epimerase (*galE*), dTPD-4-dehydrorhamnose-3,5-epimerase (*rfbC*), dehydrorhamnose reductase (*rfbD*), glucose-1-phosphate thymidylylransferase (*rfbA*), GT2 e GT.

Geitlerinema CCNMD22 possui 8 genes codificando glicosiltransferases e proteínas do *operon rfb*, relacionados com a EPS, além dos genes codificando wzA (2609076755), uma proteína de membrana que serve de canal para polissacarídeos (PEREIRA *et al.*, 2009; REEVES *et al.*, 1996). Há também o gene codificando WspA (*water stress protein*) (2609077467), proteína que está presente no EPS e é associada à tolerância a dissecação na cianobactéria terrestre *Nostoc commune* (MORSY *et al.*, 2008; WRIGHT *et al.*, 2005). O EPS pode funcionar como barreira a metais pesados em cianobactérias, inclusive as espécies de *Geitlerinema* (BURGOS *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2009, 2011). Bactérias do gênero *Geitlerinema* crescem habitualmente em ambientes alcalinos (ANAGNOSTIDIS, 1989), de maneira que se acredita que a presença de *Geitlerinema* CCNMD22 na amostra P4-2013 é devido a abundância de sequências dessa espécie no metagenoma, o pH favorável, a capacidade de obter nutrientes de diversas fontes, tolerar a intermitência de água e a presença de metais.

4.4.2. Meiothermus CCNMD23

A anotação funcional de *Meiothermus* revelou 3458 genes (Tabela 8), sendo que mais de 75% deles tiveram função definidas, e a maior parte foi anotada em PFAM e COG.

	Meiothermus CCNMD23
Genes	3458
RNA genes	57
tRNA genes	47
rRNA genes	7
CDS	3401
Com função definida	2687
com COG	2253
com KO	1694
com Pfam	2732
com TIGRfam	923

Tabela 8. Anotação funcional pelo servidor IMG do genoma Meiothermus CCNMD23.

Quando comparado CCNMD23 com *M. ruber* DSM 1279 (Figura 28A) e *M. silvanus* DSM 9946 (Figura 28B), observou-se que existe certa conservação na sequência de nucleotídeos, o que sugere que o genoma recuperado possui sequências originadas de mais de uma espécie de *Meiothermus*.



Figura 28. Mapa da sintenia entre genomas de *Meiothermus* CCNMD23 e *M. ruber* DSM 1279 (**A**) e *M. silvanus* DSM 9946 (**B**). Pontos azuis correspondem regiões encontradas no sentido senso da sequência de nucleotídeos e vermelhos no sentido antisenso.

A presença de sequências de diferentes origens é ressaltada ao se comparar *M*. *ruber* DSM 1279 e *M. silvanus* DSM 9946, onde pouca conservação nas sequências de nucleotídeos foi obtida (Figura 29).



Figura 29. Mapa da sintenia entre genomas de *M. ruber* DSM 1279 e *M. silvanus* DSM 9946. Pontos azuis correspondem regiões encontradas no sentido senso da sequência de nucleotídeos e vermelhos no sentido antisenso.

Para se compreender se há similaridade entre os contigs de CCNMD23 e as sequências dos genomas completos de *Meiothermus*, foi realizada novamente a análise de similaridade pelo BLAST (Figura 30). Diferentemente do que ocorre entre os genomas

de *Geitlerinema*, a *Meiothermus* CCNMD23 não possui muitas regiões com alta similaridade com *M. ruber* DSM 1279 e *M. silvanus* DSM 9946.



Figura 30. Comparação entre a similaridade das sequências entre *Meiothermus* CCNMD23 (círculo preto e contínuo do centro), *M. ruber* DSM 1279 (de dentro para fora, primeiro círculo vermelho) e *M. silvanus* DSM 9946 (de dentro para fora, primeiro círculo vermelho). Regiões com alta identidade são representadas com cores sólidas (vermelha ou laranja). O tracejado circular após o círculo central mostra o conteúdo GC de cada região.

As bactérias do gênero *Meiothermus* representadas por *Meiothermus* CCNMD23 possuem o *operon narGHIJ* (2609078933 a 2609078936) responsável pela redução de nitrato em nitrito para obtenção de energia. A demanda de nitrato deste *operon* é suprida

provavelmente pelos transportadores do tipo ABC de nitrato codificadas pelas duas cópias do gene *narK* (2609078936 e 2609078938) localizadas justapostas ao *operon narGHIJ* e além disso, o genoma apresenta uma cópia do gene *mobA* (2609078303), essencial para a correta atividade da nitrato redutase (MORENO-VIVIÁN *et al.*, 1999; PALMER *et al.*, 1996; PROCÓPIO *et al.*, 2012). Essa mesma organização é encontrada nas bactérias *M. timidus*, *M. silvanus* e *M. chliarophilus* (Figura 31).



Figura 30. Organização estrutural do *operon narGHIJ* (2609078933 a 2609078936) e as duas cópias de *narK* (2609078936 e 2609078938) representados dentro do retângulo em negrito. Ordem dos genes: redutase de nitrato subunidade alfa (*narG*), redutase de nitrato subunidade beta (*narH*), redutase de nitrato subunidade delta (*narJ*), redutase de nitrato subunidade gama (*NarI*), transportador de nitrato e nitrito (*narK*), transportador de nitrato e nitrito (*narK*).

A presença de genes codificando glutamina sintetase III (2609078719) e a subunidade menor da glutamato sintase (2609078955) indicam que esses microorganismos conseguem assimilar nitrogênio a partir da amônia (HERRERO; MURO-PASTOR; FLORES, 2001; MURO-PASTOR; REYES; FLORENCIO, 2005).

Meiothermus CCNMD23 possui 4 genes de monooxigenases e 15 de dioxigenases codificando proteínas como as subunidades alfa (pcaG) e beta (pcaH) de uma protocatecuato-3,4-dioxigenase (2609079966 e 2609079967), considerada a enzima chave na rota metabólica do β -cetoadipato (β -*ketoadipate*), a qual está presente em bactérias de solo e possui interesse biotecnológico devido a sua relação com o catabolismo de diversos compostos aromáticos tóxicos (BUCHAN *et al.*, 2000; WELLS JR; RAGAUSKAS, 2012). A anotação pelo antiSmash revelou 2 genes para produção de carotenóides (licopeno ciclase - e fitoeno sintase) e 1 relacionado a formação de policetídeos. Assim como na *Geitlerinema* CCNMD22, *Meiothermus* CCNMD23 possui genes para resistência a antibióticos como a vancomicina (2609079681) e os beta-lactâmicos (2609077922), e diversos genes codificando bombas de efluxo para resistência a múltiplas drogas, permeases e ATPases do sistema de transporte ABC de múltiplas drogas também foram encontrados.

Como esperado, genes relacionados à fotossíntese não foram encontrados. A anotação no banco de dados do CAZyme revelou 61 genes com consistência adequada em relação ao domínio e tamanho do gene (Anexo G). O genoma apresentou genes de hidrólise de glicosídeo codificando β -glucosidase (2609080808, 2609080809, 2609079058 e 2609079875), α -glucoside (2609080993, 2609078301, 2609078437, 2609080421 e 2609081123), α -galactosidase (2609081328), α -mannosidase (2609080823 e 2609080306) e α -amylase (2609080153), o que demonstra a gama de diferentes polissacarídeos que essas bactérias conseguem hidrolisar. Além disso, a

hidrólise de peptidoglicanas também pode ser feita devido à presença de genes da família GH23 (2609079642 e 2609079022) e do módulo CBM50 (2609079345, 2609079516, 2609078549 e 2609079047).

A busca por homólogos foi realizada utilizando os mesmos algoritmos já mencionados e os genomas de CCNMD23, M. ruber DSM 1279, M. silvanus DSM 9946, e os genomas não completos de *M. rufus* DSM 22234 (IMG Project ID: Gp0013033), *M.* cerbereus DSM 11376 (IMG Project ID: Gp0013032), M. taiwanensis DSM 14542 (IMG Project ID: Gp0013034), M. chliarophilus ALT-8 DSM 9957 (IMG Project ID: Gp0006316), revelando 1192 homólogos, o que corresponde a aproximadamente 35,5% do total de genes em Meiothermus CCNMD23. Assim como nos genomas da Geitlerinema, os homólogos de Meiothermus pertencem a funções relacionadas ao metabolismo central, replicação e transcrição de DNA, tradução e síntese de proteínas, transportadores do tipo ABC associados ao transporte de carboidratos, aminoácidos, Fe³⁺ e outras moléculas. Dentre os genes presentes somente em Meiothermus CCNMD23 estão codificando proteínas hipotéticas e não caracterizadas, componentes genes periplasmáticos e permeases do sistema ABC para transporte de glicerol-3-fosfato, o qual é uma fonte de carbono e fosfato que possui participação na glicólise e biossíntese de fosfolipídeos (LEMIEUX; HUANG; WANG, 2004), permeases do sistema ABC de dipeptídeo, oligopeptídeo e níquel, além de hidrolases, transferases e transportadores de carboidratos. A diversidade de transportadores do sistema ABC pode indicar que o ambiente oferece diferentes fontes de nutrientes para essas bactérias, que por sua vez precisam de mecanismos para captá-los. Mais uma vez a presença de metais na mina do Sossego (Tabela 2) pode ter contribuído para que *Meiothermus* de solos contaminados com drenagem neutra da base da pilha de minério de cobre (amostra P4-2013) possuíssem mais cópias de genes de resistência a metais em relação às outras espécies comparadas.

Foram encontrados genes relacionados à homeostase de cobre como ATPases transportadoras de cobre tipo P (*copper-(or silver)-translocating* P-*type* ATPase) e *copZ*, e uma redutase de mercúrio. Assim como no genoma de Geitlerinema CCNMD22, diversos genes codificando transposases estavam presentes em *Meiothermus* CCNMD23, majoritariamente da classe IS e de famílias como IS200/IS605. Em bactérias, elementos transponíveis ou elementos móveis são trechos de sequência (transposons) que saltam de um determinado local do DNA do micro-organismo para outro local ou para outro genoma através da ação de transposases (POLARD; CHANDLER, 1995). Como já mencionado, esse mecanismo gera plasticidade no genoma e mudanças na expressão gênica (SIGUIER; GOURBEYRE; CHANDLER, 2014).

Dessa forma, a presença de diversas transposases nos dois genomas recuperados pode indicar um dos mecanismos desses micro-organismos se adaptarem ao ambiente. As bactérias representadas pelo genoma *Meiothermus* CCNMD23 aparentam ter diversidade de enzimas para hidrolisar e buscar diferentes fontes de nutrientes, tolerar os metais presentes na base da pilha da mina do Sossego, sendo que esse gênero é encontrado em pH alcalino como o da mina (CHEN *et al.*, 2002a; CHUNG *et al.*, 1997; NOBRE; TRÜPER; COSTA, 1996). Somado a isso, a quantidade de proteínas hipotéticas e com função desconhecida podem ter participação no processo de adaptação desses micro-organismos ao ambiente de mina, além de ser uma fonte a ser explorada em relação a potenciais biotecnológicos.

5. CONCLUSÕES

Os métodos de identificação do rDNA 16S pelo RDP *Classifier* e o do melhor hit do
 BLAST pelo IMG são complementares para atribuição da taxonomia.

- Os metagenomas P1-2013, P2-2013 e P3-2013 são enriquecidos com genes do metabolismo de lipídeo para obtenção de carbono e nitrogênio, o que pode ter relação com a menor abundância de nutrientes nas pilhas de minério de cobre.

 A metagenômica comparativa apresenta abundância de genes associados à resistência ao cobre e proteínas ativas em pH alcalino, sugerindo a adaptação da microbiota ao ambiente de mina.

- A análise de genes relacionados à resistência a antibióticos indica que os microorganismos da mina do Sossego possuem resistência natural a poucos antibióticos.

- A análise de genes associados a tolerância e resistência a metais mostra maior abundância de genes na categoria multimetal, demonstrando que os micro-organismos possuem mecanismos comuns para lidar com diferentes metais.

- A reconstrução da rota metabólica do metabolismo do enxofre mostra a capacidade dos micro-organismos oxidarem e reduzirem compostos de enxofre, o que é uma característica de interesse para indústria de mineração e ambiental para biorremediação de áreas impactadas pela drenagem de mina.

- A análise de genes relacionados à degradação de compostos aromáticos revela que a microbiota presente principalmente nos metagenomas P1-2013 e P2-2013 possui oxigenases para a produção de catecol e 3-metilcatecol, e também para biorremediação de áreas impactadas por benzeno e fenol.

- Dois genomas foram recuperados do metagenoma P4-2013, sendo pertencentes ao gênero *Geitlerinema* e *Meiothermus*, sendo que ambos possuem genes para tolerância a metais e transposases, o que pode indicar mecanismos de adaptação ao meio ambiente da mina de Sossego.

- O crescimento descrito como favorecido em pH alcalino para os gêneros *Geitlerinema*e *Meiothermus*, os genes encontrados na *Geitlerinema* CCNMD22 e *Meiothermus*CCNMD23 para tolerância a metais e a abundância de *reads* de ambos os gêneros no
metagenoma P4-2013 foram fatores que possibilitaram a recuperação desses dois
genomas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLA, H. Bioweathering and Biotransformation of Granitic Rock Minerals by Actinomycetes. **Microbial Ecology**, v. 58, n. 4, p. 753–761, 10 jul. 2009.

ABED, R. M. M.; AL-KINDI, S.; AL-KHARUSI, S. Diversity of Bacterial Communities Along a Petroleum Contamination Gradient in Desert Soils. **Microbial Ecology**, v. 69, n. 1, p. 95–105, 8 ago. 2014.

AHMADI, A. Influence of Ferric and Ferrous Iron on Chemical and Bacterial Leaching of Copper Flotation Concentrates. **International Journal of Nonferrous Metallurgy**, v. 01, n. 03, p. 42–48, 2012.

AKCIL, A.; KOLDAS, S. Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. **Journal of Cleaner Production**, Improving Environmental, Economic and Ethical Performance in the Mining Industry. Part 2. Life cycle and process analysis and technical issues Improving Environmental, Economic and Ethical Performance in the Mining Industry. Part 2. Life cycle and process analysis and technical issues. v. 14, n. 12–13, p. 1139–1145, 2006.

ALBERTSEN, M. *et al.* Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 533–538, jun. 2013.

ALIKHAN, N.-F. *et al.* BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 402, 8 ago. 2011.

ALTIMIRA, F. *et al.* Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 193, 5 set. 2012.

ALVAREZ, T. M. *et al.* Development and Biotechnological Application of a Novel Endoxylanase Family GH10 Identified from Sugarcane Soil Metagenome. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70014, 29 jul. 2013.

AMAROUCHE-YALA, S. *et al.* Morphological and phylogenetic diversity of thermophilic cyanobacteria in Algerian hot springs. **Extremophiles**, v. 18, n. 6, p. 1035–1047, 31 jul. 2014.

ANAGNOSTIDIS, K. Geitlerinema, a new genus of oscillatorialean cyanophytes. **Plant Systematics and Evolution**, v. 164, n. 1-4, p. 33–46, 1 mar. 1989.

ANDRADE, J. C. DE; ABREU, M. F. DE. Análise química de resíduos sólidos para monitoramento e estudos agroambientais. Campinas: Instituto Agronômico, 2006.

ANDRADE, M. L. A. DE; CUNHA, L. M. DA S.; GANDRA, G. T. O Cobre Brasileiro em Ascensão no Cenário Mundial. **BNDES Setorial**, n. 13, p. 65–94, abr. 2001.

ANJUM, F.; SHAHID, M.; AKCIL, A. Biohydrometallurgy techniques of low grade ores: A review on black shale. **Hydrometallurgy**, v. 117–118, p. 1–12, abr. 2012.

ARENSE, P. *et al.* Metabolic engineering for high yielding L(-)-carnitine production in Escherichia coli. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 56, 29 maio 2013.

ARNDT, D. *et al.* METAGENassist: a comprehensive web server for comparative metagenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. Web Server issue, p. W88–95, jul. 2012.

ASKER, D. *et al.* Deinococcus depolymerans sp. nov., a gamma- and UV-radiationresistant bacterium, isolated from a naturally radioactive site. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. Pt 6, p. 1448–1453, jun. 2011.

AZER, M. K. The petrogenesis of late Precambrian felsic alkaline magmatism in south Sinai, Egypt. Acta Geologica Polonica, v. 56, n. 4, p. 463–484, 10 dez. 2006.

BAI, H. *et al.* Treatment of acid mine drainage by sulfate reducing bacteria with iron in bench scale runs. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 818–822, jan. 2013.

BAKER, B. J.; BANFIELD, J. F. Microbial communities in acid mine drainage. **FEMS** microbiology ecology, v. 44, n. 2, p. 139–152, 1 maio 2003.

BAKER, E. *et al.* Molecular responses of Frankia sp. strain QA3 to naphthalene. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 281–292, 19 jan. 2015.

BALISTRIERI, L. S.; MURRAY, J. W.; PAUL, B. The geochemical cycling of trace elements in a biogenic meromictic lake. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 58, n. 19, p. 3993–4008, out. 1994.

BANERJEE, P. C. Genetics of metal resistance in acidophilic prokaryotes of acidic mine environments. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, n. 1, p. 9–25, jan. 2004.

BANKEVICH, A. *et al.* SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, maio 2012.

BANKS, D. *et al.* Mine-water chemistry: the good, the bad and the ugly. **Environmental Geology**, v. 32, n. 3, p. 157–174, 1 out. 1997.

BARTOSCH, S. *et al.* Immunological Detection of Nitrospira-like Bacteria in Various Soils. **Microbial Ecology**, v. 43, n. 1, p. 26–33, fev. 2002.

BEHLAU, F. *et al.* Molecular Characterization of Copper Resistance Genes from Xanthomonas citri subsp. citri and Xanthomonas alfalfae subsp. citrumelonis v. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4089–4096, jun. 2011.

BENVENISTE, R.; DAVIES, J. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 8, p. 2276–2280, ago. 1973.

BENVENUTI, M. *et al.* Mine waste dumps and heavy metal pollution in abandoned mining district of Boccheggiano (Southern Tuscany, Italy). **Environmental Geology**, v. 30, n. 3-4, p. 238–243, 1 abr. 1997.

BESAURY, L. *et al.* Abundance and diversity of copper resistance genes cusA and copA in microbial communities in relation to the impact of copper on Chilean marine sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 67, n. 1-2, p. 16–25, 15 fev. 2013.

BEVILAQUA, D. *et al.* Oxidation of chalcopyrite by Acidithiobacillus ferrooxidans and Acidithiobacillus thiooxidans in shake flasks. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 587–592, 2 dez. 2002.

BIRD, C.; WYMAN, M. Nitrate/Nitrite Assimilation System of the Marine Picoplanktonic Cyanobacterium Synechococcus sp. Strain WH 8103: Effect of Nitrogen Source and Availability on Gene Expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7009–7018, 1 dez. 2003.

BLIN, K. *et al.* antiSMASH 2.0--a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Web Server issue, p. W204–212, jul. 2013.

BOLHUIS, H.; STAL, L. J. Analysis of bacterial and archaeal diversity in coastal microbial mats using massive parallel 16S rRNA gene tag sequencing. **The ISME Journal**, v. 5, n. 11, p. 1701–1712, nov. 2011.

BORMA, L. S.; SOARES, P. S. M. Drenagem ácida e gestão de resíduos sólidos de mineração. In: TRINDADE, R. DE B. E.; BARBOSA FILHO, O. (Eds.). . Extração de ouro: princípios, tecnologia e meio ambiente. Rio de Janeiro: CETEM, 2002.

BRANTNER, J. S.; SENKO, J. M. Response of Soil-Associated Microbial Communities to Intrusion of Coal Mine-Derived Acid Mine Drainage. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 15, p. 8556–8563, 5 ago. 2014.

BROWN, C. T. *et al.* A reference-free algorithm for computational normalization of shotgun sequencing data. **arXiv preprint arXiv:1203.4802**, 2012.

BROWN, N. L. *et al.* The MerR family of transcriptional regulators. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 2-3, p. 145–163, jun. 2003.

BUCHAN, A. *et al.* Key Aromatic-Ring-Cleaving Enzyme, Protocatechuate 3,4-Dioxygenase, in the Ecologically Important Marine Roseobacter Lineage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4662–4672, nov. 2000.

BUIST, G. *et al.* LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 838–847, maio 2008.

BURGOS, A. *et al.* Effect of copper and lead on two consortia of phototrophic microorganisms and their capacity to sequester metals. **Aquatic Toxicology**, v. 140–141, p. 324–336, 15 set. 2013.

CAFARO, V. *et al.* Regiospecificity of two multicomponent monooxygenases from Pseudomonas stutzeri OX1: molecular basis for catabolic adaptation of this

microorganism to methylated aromatic compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4736–4743, ago. 2005.

CAMACHO, C. *et al.* BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 421, 15 dez. 2009.

CAMARGO, O. A. DE *et al.* **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agronômico de Campinas**: Boletim técnico 106. Campinas: Instituto Agronômico, 2009.

CAMPOS, M. L. *et al.* Baseline Concentration of Heavy Metals in Brazilian Latosols. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 34, n. 3-4, p. 547–557, 1 mar. 2003.

CARRETO, L. *et al.* Rubrobacter xylanophilus sp. nov., a New Thermophilic Species Isolated from a Thermally Polluted Effluent. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 2, p. 460–465, 1 abr. 1996.

CASTENHOLZ, R. W. Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Eds.). New York: Springer Science Business Media, 2001.

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 4, p. 540–552, abr. 2000.

CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, v. 3, n. 2-3, p. 351–368, 1 jun. 1992.

CETESB. **Decisão de Diretoria Nº 045/2014/E/C/I, de 20 de fevereiro de 2014**, 2014. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/institucional/do/2014/DD-045-2014-P53.pdf>. Acesso em: 12 maio. 2014

CHAKRABORTY, J. *et al.* Ring-Hydroxylating Oxygenase database: a database of bacterial aromatic ring-hydroxylating oxygenases in the management of bioremediation and biocatalysis of aromatic compounds. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 5, p. 519–523, 1 out. 2014.

CHEMERYS, A. *et al.* Characterization of Novel Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Dioxygenases from the Bacterial Metagenomic DNA of a Contaminated Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 21, p. 6591–6600, 1 nov. 2014.

CHEN, C. *et al.* Meiothermus rosaceus sp. nov. isolated from Tengchong hot spring in Yunnan, China. **FEMS Microbiology Letters**, v. 216, n. 2, p. 263–268, 1 nov. 2002a.

CHEN, L. *et al.* Shifts in microbial community composition and function in the acidification of a lead/zinc mine tailings. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 2431–2444, 1 set. 2013.

CHEN, M.-Y. *et al.* Meiothermus taiwanensis sp. nov., a novel filamentous, thermophilic species isolated in Taiwan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1647–1654, 1 set. 2002b.

CHEN, M.-Y. *et al.* Rubrobacter taiwanensis sp. nov., a novel thermophilic, radiationresistant species isolated from hot springs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. Pt 5, p. 1849–1855, set. 2004.

CHEN, Y. *et al.* Revealing the uncultivated majority: combining DNA stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomic analyses of uncultivated Methylocystis in acidic peatlands. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2609–2622, out. 2008.

CHIVIAN, D. *et al.* MetaMicrobesOnline: phylogenomic analysis of microbial communities. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Database issue, p. D648–654, jan. 2013.

CHOI, Y. J.; LEE, S. Y. Microbial production of short-chain alkanes. **Nature**, v. 502, n. 7472, p. 571–574, 24 out. 2013.

CHUNG, A.-L. *et al.* Production of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by β -oxidation and phaC operon deleted Pseudomonas entomophila harboring thioesterase gene. **Metabolic Engineering**, v. 17, p. 23–29, maio 2013.

CHUNG, A. P. *et al.* Meiothermus cerbereus sp. nov., a New Slightly Thermophilic Species with High Levels of 3-Hydroxy Fatty Acids. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1225–1230, 1 out. 1997.

CLARK, S. C. *et al.* ALE: a generic assembly likelihood evaluation framework for assessing the accuracy of genome and metagenome assemblies. **Bioinformatics** (**Oxford, England**), v. 29, n. 4, p. 435–443, 15 fev. 2013.

COLE, J. R. *et al.* Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D633–D642, 1 jan. 2014.

COMUNIDADES EUROPÉIAS. **Salinização e sodificação**: Ficha Informativa nº4. Sevilha: Comissão Européia, 2009.

CONTRERAS-MOREIRA, B.; VINUESA, P. GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 24, p. 7696–7701, dez. 2013.

CRISPIM, C. A.; GAYLARDE, C. C. Cyanobacteria and Biodeterioration of Cultural Heritage: A Review. **Microbial Ecology**, v. 49, n. 1, p. 1–9, 23 set. 2004.

CUSHING, O. *et al.* Brazil - An Overview. **Engineering and Mining Journal**, v. 213, n. 8, p. 74, 2012.

D'AGOSTINO, L. F. **Praias de barragens de rejeitos de mineração: características e análise da sedimentação**. Tese de Doutorado—São Paulo: Universidade de São Paulo, USP, 2008.

DANTAS, G. *et al.* Bacteria subsisting on antibiotics. Science (New York, N.Y.), v. 320, n. 5872, p. 100–103, 4 abr. 2008.

DHANYA VIJAYAN *et al.* Microbial consortia formulation for the effective biodegradation of benzene, toluene, xylene and phenol. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, v. 3, n. 6, p. 457–462, 2014.

DICK, G. J. *et al.* Community-wide analysis of microbial genome sequence signatures. **Genome Biology**, v. 10, n. 8, p. R85, 21 ago. 2009.

DIMITRIJEVIĆ, M. *et al.* Influence of pyrometallurgical copper production on the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2-3, p. 892–899, 30 maio 2009.

DIXON, P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. **Journal of Vegetation Science**, v. 14, n. 6, p. 927–930, 1 dez. 2003.

DNPM. **Anuário Mineral Brasileiro**. Brasília: Departamento Nacional de Produção Mineral, 2010. v. 35

DOGO, C. R. *et al.* Inflammatory effects of the toxic cyanobacterium Geitlerinema amphibium. **Toxicon**, v. 58, n. 6–7, p. 464–470, nov. 2011.

DONATI, E. *et al.* Bioleaching of covellite using pure and mixed cultures of Thiobacillus ferrooxidans and Thiobacillus thiooxidans. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 129–134, 1996.

DOPSON, M.; JOHNSON, D. B. Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 2620–2631, out. 2012.

DRATHS, K. M.; FROST, J. W. Environmentally compatible synthesis of catechol from D-glucose. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 9, p. 2395–2400, 1 mar. 1995.

DUARTE, M. *et al.* AromaDeg, a novel database for phylogenomics of aerobic bacterial degradation of aromatics. **Database: The Journal of Biological Databases and Curation**, v. 2014, p. bau118, 2014.

DUONG, F. *et al.* The Pseudomonas fluorescens lipase has a C-terminal secretion signal and is secreted by a three-component bacterial ABC-exporter system. **Molecular Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 1117–1126, 1 mar. 1994.

EDWARDS, R. A. *et al.* Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. **BMC Genomics**, v. 7, n. 1, p. 57, 20 mar. 2006.

EHRLICH, H. L. Microorganisms in acid drainage from a copper mine. Journal of Bacteriology, v. 86, n. 2, p. 350–352, ago. 1963.

EICHLER, K. *et al.* Molecular characterization of the cai operon necessary for carnitine metabolism in Escherichia coii. **Molecular Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 775–786, 1 set. 1994.

FADIGAS, F. DE S. *et al.* Natural contents of heavy metals in some brazilian soil classes. **Bragantia**, v. 61, n. 2, p. 151–159, ago. 2002.

FAIZAL, I. *et al.* Bioproduction of 3-Methylcatechol from Toluene in a Two-Phase (Organic-Aqueous) System by a Genetically Modifi ed Solvent-Tolerant Pseudomonas putida Strain T-57. **Journal of Environmeental Biotechnology**, v. 7, n. 1, 2007.

FALCO, L. *et al.* A comparison of bioleaching of covellite using pure cultures of Acidithiobacillus ferrooxidans and Acidithiobacillus thiooxidans or a mixed culture of Leptospirillum ferrooxidans and Acidithiobacillus thiooxidans. **Hydrometallurgy**, Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development. v. 71, n. 1–2, p. 31–36, out. 2003.

FALTEISEK, L.; ČEPIČKA, I. Microbiology of diverse acidic and non-acidic microhabitats within a sulfidic ore mine. **Extremophiles**, v. 16, n. 6, p. 911–922, 12 out. 2012.

FARFAN, Z. J. R. J.; BARBOSA FILHO, O.; SOUZA, V. P. DE. Avaliação do potencial de drenagem ácida de rejeitos da indústria mineral. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2004.

FAYET, O.; ZIEGELHOFFER, T.; GEORGOPOULOS, C. The groES and groEL heat shock gene products of Escherichia coli are essential for bacterial growth at all temperatures. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 3, p. 1379–1385, mar. 1989.

FERNANDEZ, O. J. C. *et al.* Química mineral e relações texturais entre as fases sulfetadas do minério de cobre de Salobo, Carajás (PA): implicações no beneficiamento. **Geochimica Brasiliensis**, v. 19, n. 2, 2 fev. 2012.

FERRAN, A. P. N. DE. A Pré-História da Mineração no Brasil. In: A Mineração e a Flotação no Brasil - Uma Perspectiva Histórica. Brasília: DNPM, 2007. p. 13.

FIGUEIREDO, B. R. Processos supergênicos. In: Minérios e ambiente. Campinas: UNICAMP, 2000a. p. 297–305.

FIGUEIREDO, B. R. Os sulfetos de cobre. In: **Minérios e ambiente**. Campinas: UNICAMP, 2000b. p. 73–85.

FINN, R. D. *et al.* The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. suppl 1, p. D211–D222, 1 jan. 2010.

GONÇALVES, E. R. *et al.* Transcriptomic Assessment of Isozymes in the Biphenyl Pathway of Rhodococcus sp. Strain RHA1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 6183–6193, set. 2006.

GONZÁLEZ-PASTOR, J. E.; MIRETE, S. Novel metal resistance genes from microorganisms: a functional metagenomic approach. **Methods in Molecular Biology** (**Clifton, N.J.**), v. 668, p. 273–285, 2010.

GORBUSHINA, A. A.; BROUGHTON, W. J. Microbiology of the Atmosphere-Rock Interface: How Biological Interactions and Physical Stresses Modulate a Sophisticated Microbial Ecosystem. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 431–450, 2009. GORIS, J. *et al.* DNA-DNA hybridization values and their relationship to wholegenome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. Pt 1, p. 81–91, jan. 2007.

GRAY, N. F. Environmental impact and remediation of acid mine drainage: a management problem. **Environmental Geology**, v. 30, n. 1-2, p. 62–71, 1 mar. 1997.

GULLI, A. S. M. *et al.* Mineral Negócios - Guia do Investidor no Brasil. Brasília: [s.n.].

GUO, X. *et al.* RubisCO gene clusters found in a metagenome microarray from acid mine drainage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 2019–2026, mar. 2013.

GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15–32, 1 jun. 2002.

GURMENDI, A. C. The Mineral Industry of Brazil. In: **Minerals Yearbook**. Reston: U.S. Geological Survey, 2012.

HALLBERG, K. B.; HEDRICH, S.; JOHNSON, D. B. Acidiferrobacter thiooxydans, gen. nov. sp. nov.; an acidophilic, thermo-tolerant, facultatively anaerobic iron- and sulfur-oxidizer of the family Ectothiorhodospiraceae. **Extremophiles**, v. 15, n. 2, p. 271–279, 11 fev. 2011.

HALLBERG, K. B.; LINDSTRÖM, E. B. Characterization of Thiobacillus caldus sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. **Microbiology (Reading, England)**, v. 140 (Pt 12), p. 3451–3456, dez. 1994.

HALTER, D. *et al.* Taxonomic and functional prokaryote diversity in mildly arseniccontaminated sediments. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 9, p. 877–887, nov. 2011.

HAMAMURA, N.; YEAGER, C. M.; ARP, D. J. Two distinct monooxygenases for alkane oxidation in Nocardioides sp. strain CF8. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 4992–4998, nov. 2001.

HANADA, S. *et al.* Porphyrobacter tepidarius sp. nov., a moderately thermophilic aerobic photosynthetic bacterium isolated from a hot spring. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 408–413, abr. 1997.

HANDELSMAN, J. *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. R245–249, out. 1998.

HAN, X. *et al.* Molecular Cloning and Sequence Analysis of an Extracellular Protease from Four Bacillus subtilis Strains. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 4, p. 870–873, 23 abr. 2013.

HARRISON, J. J. *et al.* Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in Escherichia coli. **Microbiology**, v. 151, n. 10, p. 3181–3195, 1 out. 2005.

HARRISON, J. J.; TURNER, R. J.; CERI, H. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic Pseudomonas aeruginosa. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 981–994, jul. 2005.

HARRISON JR, A. P. H. Genomic and physiological diversity amongst strains of Thiobacillus ferrooxidans, and genomic comparison with Thiobacillus thiooxidans. **Archives of Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 68–76, fev. 1982.

HARRISON, M. D. *et al.* Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 29–32, jan. 2000.

HELD, M. *et al.* An integrated process for the production of toxic catechols from toxic phenols based on a designer biocatalyst. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n. 6, p. 641–648, 20 mar. 1999.

HEMME, C. L. *et al.* Metagenomic insights into evolution of a heavy metalcontaminated groundwater microbial community. **The ISME Journal**, v. 4, n. 5, p. 660–672, maio 2010.

HERRERO, A.; MURO-PASTOR, A. M.; FLORES, E. Nitrogen Control in Cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 2, p. 411–425, 15 jan. 2001.

HE, Z. *et al.* Microbial diversity of mine water at Zhong Tiaoshan copper mine, China. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 485–495, dez. 2007.

HONISCH, U.; ZUMFT, W. G. Operon Structure and Regulation of the nos Gene Region of Pseudomonas stutzeri, Encoding an ABC-Type ATPase for Maturation of Nitrous Oxide Reductase. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 6, p. 1895–1902, 15 mar. 2003.

HUBER, H.; STETTER, K. O. Thiobacillus cuprinus sp. nov., a Novel Facultatively Organotrophic Metal-Mobilizing Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 315–322, fev. 1990.

HÜSKEN, L. E. *et al.* Optimisation of Microbial 3-methylcatechol Production as Affected by Culture Conditions. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 20, n. 1, p. 57–61, 1 jan. 2002.

HUSON, D. H. *et al.* MEGAN analysis of metagenomic data. **Genome Research**, v. 17, n. 3, p. 377–386, mar. 2007.

HU, Y. *et al.* Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. **Nature Communications**, v. 4, 23 jul. 2013.

IBRAM. **Informações e Análises da Economia Mineral Brasileira**. 6. ed. Brasília: Instituto Brasileiro de Mineração, 2011.

IBRAM. **Relatório Anual IBRAM: Julho 2012 - Junho 2013**. Belo Horizonte: Instituto Brasileiro de Mineração, 2013.

ISAAC, P. *et al.* Indigenous PAH-degrading bacteria from oil-polluted sediments in Caleta Cordova, Patagonia Argentina. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 82, p. 207–214, ago. 2013.

ISAAC, P. *et al.* Improved PAHs removal performance by a defined bacterial consortium of indigenous Pseudomonas and actinobacteria from Patagonia, Argentina. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 101, p. 23–31, jul. 2015.

IWABUCHI, T.; HARAYAMA, S. Biochemical and molecular characterization of 1hydroxy-2-naphthoate dioxygenase from Nocardioides sp. KP7. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 14, p. 8332–8336, 3 abr. 1998.

JAYARAMAN, R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 5, p. 795–805, dez. 2008.

JEBBAR, M. *et al.* Carnitine acts as a compatible solute in Brevibacterium linens. **Research in Microbiology**, v. 149, n. 3, p. 211–219, mar. 1998.

JOHNSON, D. B. Reductive dissolution of minerals and selective recovery of metals using acidophilic iron- and sulfate-reducing acidophiles. **Hydrometallurgy**, v. 127–128, p. 172–177, out. 2012.

JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B. Acid mine drainage remediation options: a review. **The Science of the Total Environment**, v. 338, n. 1-2, p. 3–14, 1 fev. 2005.

JOHNSON, D. B.; KANAO, T.; HEDRICH, S. Redox Transformations of Iron at Extremely Low pH: Fundamental and Applied Aspects. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 16 mar. 2012.

JONES, C. M. *et al.* Phylogenetic Analysis of Nitrite, Nitric Oxide, and Nitrous Oxide Respiratory Enzymes Reveal a Complex Evolutionary History for Denitrification. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 9, p. 1955–1966, 1 set. 2008.

JURJOVEC, J.; PTACEK, C. J.; BLOWES, D. W. Acid neutralization mechanisms and metal release in mine tailings: a laboratory column experiment. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 66, n. 9, p. 1511–1523, 1 maio 2002.

KÄMPFER, P. *et al.* Deinococcus aquatilis sp. nov., isolated from water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. Pt 12, p. 2803–2806, dez. 2008.

KANBI, L. D. *et al.* Crystal Structures of the Met148Leu and Ser86Asp Mutants of Rusticyanin from Thiobacillus ferrooxidans: Insights into the Structural Relationship with the Cupredoxins and the Multi Copper Proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 320, n. 2, p. 263–275, 5 jul. 2002.

KANEHISA, M. *et al.* KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. Database issue, p. D109–D114, jan. 2012.

KAPPES, R. M.; BREMER, E. Response of Bacillus subtilis to high osmolarity: uptake of carnitine, crotonobetaine and γ -butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. **Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 83–90, 1 jan. 1998.

KELLY, D. P.; WOOD, A. P. Reclassification of some species of Thiobacillus to the newly designated genera Acidithiobacillus gen. nov., Halothiobacillus gen. nov. and Thermithiobacillus gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50 Pt 2, p. 511–516, mar. 2000a.

KELLY, D. P.; WOOD, A. P. Confirmation of Thiobacillus denitrificans as a species of the genus Thiobacillus, in the beta-subclass of the Proteobacteria, with strain NCIMB 9548 as the type strain. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 50, n. 2, p. 547–550, 1 mar. 2000b.

KIM, D. *et al.* Molecular cloning and functional characterization of the genes encoding benzoate and p-hydroxybenzoate degradation by the halophilic Chromohalobacter sp. strain HS-2. **FEMS microbiology letters**, v. 280, n. 2, p. 235–241, mar. 2008.

KIM, M. K. *et al.* Solirubrobacter soli sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 57, n. 7, p. 1453–1455, 1 jul. 2007.

KIM, Y. M. *et al.* Identification of the bacterial community of a pilot-scale thermophilic aerobic bioreactor treating sewage sludge. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 92, p. 66–70, ago. 2014.

KONDRAT'EVA, T. F. *et al.* Diversity of the communities of acidophilic chemolithotrophic microorganisms in natural and technogenic ecosystems. **Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 1–24, 15 fev. 2012.

KONGPOL, A. *et al.* Enhanced 3-methylcatechol production by *Pseudomonas putida* TODE1 in a two-phase biotransformation system. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 183–190, 2014.

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 7, p. 2567–2572, 15 fev. 2005.

KRASTANOV, A.; ALEXIEVA, Z.; YEMENDZHIEV, H. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. **Engineering in Life Sciences**, v. 13, n. 1, p. 76–87, 1 jan. 2013.

KRISTENSEN, D. M. *et al.* A low-polynomial algorithm for assembling clusters of orthologous groups from intergenomic symmetric best matches. **Bioinformatics**, v. 26, n. 12, p. 1481–1487, 15 jun. 2010.

KUANG, J.-L. *et al.* Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage. **The ISME journal**, v. 7, n. 5, p. 1038–1050, maio 2013.

KUBOTA, M. *et al.* Nocardioides aromaticivorans sp. nov., a dibenzofuran-degrading bacterium isolated from dioxin-polluted environments. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 165–174, 16 mar. 2005.

KUNITO, T. *et al.* Distribution of Cu-resistant and Non-resistant Bacteria in Several Cu-contaminated Soils in Japan: Usefulness of the Tolerance Level as an Index of Cu

Contamination in Soil. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 7, p. 1190–1193, 1 jan. 1997a.

KUNITO, T. *et al.* Characterization of Cu-resistant bacterial communities in Cucontaminated soils. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 43, n. 3, p. 709–717, 1 set. 1997b.

KUNITO, T. *et al.* Influences of copper forms on the toxicity to microorganisms in soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, n. 2, p. 174–181, out. 1999.

KURTZ, S. *et al.* Versatile and open software for comparing large genomes. **Genome Biology**, v. 5, n. 2, p. R12, 2004.

KWON, M. J. *et al.* Geochemical characteristics and microbial community composition in toxic metal-rich sediments contaminated with Au–Ag mine tailings. **Journal of Hazardous Materials**, v. 296, p. 147–157, 15 out. 2015.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, abr. 2012.

LAURIE, A. D.; LLOYD-JONES, G. Conserved and hybrid meta-cleavage operons from PAH-degrading Burkholderia RP007. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 262, n. 1, p. 308–314, 19 ago. 1999.

LAWRENCE, R. W.; SCHESKE, M. A method to calculate the neutralization potential of mining wastes. **Environmental Geology**, v. 32, n. 2, p. 100–106, 1 set. 1997.

LEE, S.-B. *et al.* Pseudonocardia chloroethenivorans sp. nov., a chloroethene-degrading actinomycete. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 131–139, 1 jan. 2004.

LEMIEUX, M. J.; HUANG, Y.; WANG, D.-N. Glycerol-3-phosphate transporter of Escherichia coli: Structure, function and regulation. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 8, p. 623–629, out. 2004.

LEVICÁN, G. *et al.* Comparative genomic analysis of carbon and nitrogen assimilation mechanisms in three indigenous bioleaching bacteria: predictions and validations. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 581, 3 dez. 2008.

LI, L.; STOECKERT, C. J.; ROOS, D. S. OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. **Genome Research**, v. 13, n. 9, p. 2178–2189, 1 set. 2003.

LIMA, T. M.; NEVES, C. A. R. (EDS.). **Sumário Mineral**. Brasília: Departamento Nacional de Produção Mineral, 2014.

LIN, C.-L.; TANG, Y.-L.; LIN, S.-M. Efficient bioconversion of compactin to pravastatin by the quinoline-degrading microorganism Pseudonocardia carboxydivorans isolated from petroleum-contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10187–10193, nov. 2011.
LINDSAY, M. B. J. *et al.* Mineralogical, geochemical, and microbial investigation of a sulfide-rich tailings deposit characterized by neutral drainage. **Applied Geochemistry**, Geochemistry and Mineralogy of Metalliferous Minewastes: An Issue in Honor of John Jambor. v. 24, n. 12, p. 2212–2221, dez. 2009.

LITTLEJOHNS, J. V.; DAUGULIS, A. J. Response of a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor to transient BTEX loadings. **Chemosphere**, v. 73, n. 9, p. 1453–1460, nov. 2008.

LIU, B.; POP, M. ARDB--Antibiotic Resistance Genes Database. Nucleic Acids Research, v. 37, n. Database issue, p. D443–447, jan. 2009.

LOGINOVA, L. G. *et al.* Thermus ruber sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, n. 4, p. 498–499, 1 out. 1984.

LOMBARD, V. *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. Database issue, p. D490–495, jan. 2014.

LONG, G.; PENG, Y.; BRADSHAW, D. A review of copper–arsenic mineral removal from copper concentrates. **Minerals Engineering**, SI:Froth Flotation. v. 36–38, p. 179–186, out. 2012.

LÜCKER, S. *et al.* The Genome of Nitrospina gracilis Illuminates the Metabolism and Evolution of the Major Marine Nitrite Oxidizer. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 21 fev. 2013.

LUPTAKOVA, A.; KUSNIEROVA, M. Bioremediation of acid mine drainage contaminated by SRB. **Hydrometallurgy**, Kammel's Quo Vadis Hydrometallurgy IV - International Conference May 25-28 2004, Herlany, Kosice - Slovakia. v. 77, n. 1–2, p. 97–102, abr. 2005.

MACKELPRANG, R. *et al.* Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw. **Nature**, v. 480, n. 7377, p. 368–371, 15 dez. 2011.

MA, F. *et al.* Biotransformation of benzene and toluene to catechols by phenol hydroxylase from Arthrobacter sp. W1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 11, p. 5097–5103, jun. 2013.

MAJZLAN, J. *et al.* A mineralogical, geochemical, and microbiogical assessment of the antimony- and arsenic-rich neutral mine drainage tailings near Pezinok, Slovakia. **American Mineralogist**, v. 96, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2011.

MARCOS, M. S.; LOZADA, M.; DIONISI, H. M. Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. Letters in Applied Microbiology, v. 49, n. 5, p. 602–608, 1 nov. 2009.

MARGHERI, M. C. *et al.* Genotypic Diversity of Oscillatoriacean Strains Belonging to the Genera Geitlerinema and Spirulina Determined by 16S rDNA Restriction Analysis. **Current Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 0359–0364, 1 maio 2003.

MARKOWITZ, V. M. *et al.* IMG/M: a data management and analysis system for metagenomes. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Database issue, p. D534–D538, jan. 2008.

MELANÇON III, C. E. Biochemistry: Elusive source of sulfur unravelled. **Nature**, v. 518, n. 7537, p. 45–46, 5 fev. 2015.

MELLANO, M. A.; COOKSEY, D. A. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from Pseudomonas syringae pv. tomato. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 6, p. 2879–2883, jun. 1988.

MÉNDEZ-GARCÍA, C. *et al.* Microbial stratification in low pH oxic and suboxic macroscopic growths along an acid mine drainage. **The ISME Journal**, v. 8, n. 6, p. 1259–1274, jun. 2014.

MENDEZ, M. O.; NEILSON, J. W.; MAIER, R. M. Characterization of a Bacterial Community in an Abandoned Semiarid Lead-Zinc Mine Tailing Site. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3899–3907, 15 jun. 2008.

MENDIBURU, F. DE. Agricolae: statistical procedures for agricultural research. Lima, Peru: Universidade Nacional de Engenharia, 2014.

MEYER, F. *et al.* The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 386, 19 set. 2008.

MOCALI, S.; BENEDETTI, A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 497–505, ago. 2010.

MONCIARDINI, P. *et al.* Conexibacter woesei gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class Actinobacteria. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 53, n. 2, p. 569–576, 1 mar. 2003.

MONTEIRO, L. V. S. *et al.* Spatial and temporal zoning of hydrothermal alteration and mineralization in the Sossego iron oxide–copper–gold deposit, Carajás Mineral Province, Brazil: paragenesis and stable isotope constraints. **Mineralium Deposita**, v. 43, n. 2, p. 129–159, fev. 2008a.

MONTEIRO, L. V. S. *et al.* Mineral chemistry of ore and hydrothermal alteration at the Sossego iron oxide–copper–gold deposit, Carajás Mineral Province, Brazil. **Ore Geology Reviews**, v. 34, n. 3, p. 317–336, nov. 2008b.

MOREIRA, D.; AMILS, R. Phylogeny of Thiobacillus cuprinus and other mixotrophic thiobacilli: proposal for Thiomonas gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 522–528, abr. 1997.

MORENO-VIVIÁN, C. *et al.* Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 21, p. 6573–6584, 1 nov. 1999.

MORSY, F. M. *et al.* Novel thermostable glycosidases in the extracellular matrix of the terrestrial cyanobacterium <I>Nostoc commune</I>. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 243–252, 2008.

MURO-PASTOR, M. I.; REYES, J. C.; FLORENCIO, F. J. Ammonium assimilation in cyanobacteria. **Photosynthesis Research**, v. 83, n. 2, p. 135–150, 2005.

NAGARAJAN, K.; LOH, K.-C. Formulation of microbial cocktails for BTEX biodegradation. **Biodegradation**, 21 out. 2014.

NAKATSU, C. H. *et al.* Methylibium petroleiphilum gen. nov., sp. nov., a novel methyl tert-butyl ether-degrading methylotroph of the Betaproteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 983–989, 1 maio 2006.

NALINI, P. *et al.* Isolation of Alkaline Phosphatase Producing Bacteria Employing A Novel Screening Medium for Phosphatases. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 3237–3244, 2014.

NALINI, P. *et al.* Microbial alkaline phosphatases in bioprocessing. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 384–396, 2015.

NAUTIYAL, C. S. *et al.* Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **FEMS microbiology letters**, v. 182, n. 2, p. 291–296, 15 jan. 2000.

NAVARRO, C. A.; VON BERNATH, D.; JEREZ, C. A. Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: importance for biomining and bioremediation. **Biological Research**, v. 46, n. 4, p. 363–371, 2013.

NESME, J. *et al.* Large-Scale Metagenomic-Based Study of Antibiotic Resistance in the Environment. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. 1096–1100, 19 maio 2014.

NÍ CHADHAIN, S. M. *et al.* Microbial Dioxygenase Gene Population Shifts during Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4078–4087, jun. 2006.

NICOLLE, J. L. C. *et al.* Ferrous iron oxidation and rusticyanin in halotolerant, acidophilic "Thiobacillus prosperus". **Microbiology (Reading, England)**, v. 155, n. Pt 4, p. 1302–1309, abr. 2009.

NÓBREGA, F. A.; LIMA, H. M. DE; LEITE, A. DO L. Multiple account analysis in mine closure: a case study of the waste dump BF-4, Osamu Utsumi Mine, INB Caldas, Minas Gerais. **Rem: Revista Escola de Minas**, v. 61, n. 2, p. 197–202, jun. 2008.

NOBRE, M. F.; TRÜPER, H. G.; COSTA, M. S. D. Transfer of Thermus ruber (Loginova *et al.* 1984), Thermus silvanus (Tenreiro *et al.* 1995), and Thermus chliarophilus (Tenreiro *et al.* 1995) to Meiothermus gen. nov. as Meiothermus ruber comb. nov., Meiothermus silvanus comb. nov., and Meiothermus chliarophilus comb. nov., Respectively, and Emendation of the Genus Thermus. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 2, p. 604–606, 1 abr. 1996.

NORRIS, P. R. *et al.* Ore column leaching with thermophiles: I, copper sulfide ore. **Hydrometallurgy**, v. 127–128, p. 62–69, out. 2012.

PAL, C. *et al.* BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D737–D743, 1 jan. 2014.

PALMER, T. *et al.* Involvement of the narJ and mob gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in Escherichia coli. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 875–884, maio 1996.

PANDA, S. *et al.* Extraction of copper from bacterial leach liquor of a low grade chalcopyrite test heap using LIX 984N-C. **Hydrometallurgy**, v. 121–124, p. 116–119, jun. 2012.

PARK, B. H. *et al.* CAZymes Analysis Toolkit (CAT): web service for searching and analyzing carbohydrate-active enzymes in a newly sequenced organism using CAZy database. **Glycobiology**, v. 20, n. 12, p. 1574–1584, dez. 2010.

PARKS, D. H. *et al.* CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. 2014a.

PARKS, D. H. *et al.* STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123–3124, 1 nov. 2014b.

PATEL, R. K.; JAIN, M. NGS QC Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e30619, 1 fev. 2012.

PATRAUCHAN, M. A. *et al.* Roles of Ring-Hydroxylating Dioxygenases in Styrene and Benzene Catabolism in Rhodococcus jostii RHA1. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 1, p. 37–47, 1 jan. 2008.

PENG, Y. *et al.* IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. **Bioinformatics**, v. 28, n. 11, p. 1420–1428, 1 jun. 2012.

PEPPAS, A.; KOMNITSAS, K.; HALIKIA, I. Use of organic covers for acid mine drainage control. **Minerals Engineering**, v. 13, n. 5, p. 563–574, maio 2000.

PEREIRA, L. B.; VICENTINI, R.; OTTOBONI, L. M. M. Changes in the Bacterial Community of Soil from a Neutral Mine Drainage Channel. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96605, 5 maio 2014.

PEREIRA, S. *et al.* Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 5, p. 917–941, 1 set. 2009.

PEREIRA, S. *et al.* Using extracellular polymeric substances (EPS)-producing cyanobacteria for the bioremediation of heavy metals: do cations compete for the EPS functional groups and also accumulate inside the cell? **Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 451–458, 1 fev. 2011.

PESTER, M. *et al.* NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing Nitrospira. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 3055–3071, 1 out. 2014.

PICOSSI, S. *et al.* Nitrogen-regulated Genes for the Metabolism of Cyanophycin, a Bacterial Nitrogen Reserve Polymer EXPRESSION AND MUTATIONAL ANALYSIS OF TWO CYANOPHYCIN SYNTHETASE AND CYANOPHYCINASE GENE CLUSTERS IN THE HETEROCYST-FORMING CYANOBACTERIUM ANABAENA SP. PCC 7120. Journal of Biological Chemistry, v. 279, n. 12, p. 11582–11592, 19 mar. 2004.

PIRES, A. L. *et al.* Meiothermus timidus sp. nov., a new slightly thermophilic yellowpigmented species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, n. 1, p. 39–45, 1 abr. 2005.

POLARD, P.; CHANDLER, M. Bacterial transposases and retroviral integrases. **Molecular Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 13–23, 1 jan. 1995.

POPP, J. H. Geologia Geral. 5. ed. São Paulo: LTC, 2010.

PRIDE, D. T. *et al.* Evolutionary Implications of Microbial Genome Tetranucleotide Frequency Biases. **Genome Research**, v. 13, n. 2, p. 145–158, 1 fev. 2003.

PROCÓPIO, L. *et al.* Insight from the draft genome of Dietzia cinnamea P4 reveals mechanisms of survival in complex tropical soil habitats and biotechnology potential - Springer. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 2, p. 289–302, 2012.

PUKALL, R. *et al.* Complete genome sequence of Conexibacter woesei type strain (ID131577T). **Standards in Genomic Sciences**, v. 2, n. 2, p. 212–219, 30 mar. 2010.

RAINEY, F. A. *et al.* Porphyrobacter cryptus sp. nov., a novel slightly thermophilic, aerobic, bacteriochlorophyll a-containing species. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 53, n. 1, p. 35–41, 1 jan. 2003.

RAMÍREZ-PÉREZ, A. M. *et al.* Heavy metal retention in copper mine soil treated with mussel shells: Batch and column experiments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 248–249, p. 122–130, 15 mar. 2013.

RAO, M. B. *et al.* Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1 set. 1998.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. Database issue, p. D343–350, jan. 2012.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2014.

REDDY, M. Role of FtsEX in Cell Division of Escherichia coli: Viability of ftsEX Mutants Is Dependent on Functional SufI or High Osmotic Strength. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 1, p. 98–108, 1 jan. 2007.

REEVES, P. R. *et al.* Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 495–503, dez. 1996.

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

REIBE, S.; GARBE, D.; BRÜCK, T. Meiothermus ruber thiolase – A new process stable enzyme for improved butanol synthesis. **Biochimie**, v. 103, p. 16–22, ago. 2014.

REIßE, S.; GARBE, D.; BRÜCK, T. Identification and characterization of a highly thermostable crotonase from Meiothermus ruber. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 40–44, fev. 2015.

RIBEIRO, J. A. S. Cobre: Balanço Mineral Brasileiro. Brasília: DNPM, 2002.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 45, p. 19126–19131, 10 nov. 2009.

RIPPKA, R. *et al.* Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1 mar. 1979.

ROCIO, M. A. R. *et al.* Perspectivas atuais da indústria de cobre no Brasil. **BNDES** Setorial, n. 36, p. 397–428, 2012.

RODRIGUES, V. D.; TORRES, T. T.; OTTOBONI, L. M. M. Bacterial diversity assessment in soil of an active Brazilian copper mine using high-throughput sequencing of 16S rDNA amplicons. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 5, p. 879–890, 17 ago. 2014.

ROSENBERG, E. The Family Deinococcaceae. In: ROSENBERG, E. *et al.* (Eds.). . **The Prokaryotes**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 613–615.

SAMALURU, H.; SAISREE, L.; REDDY, M. Role of SufI (FtsP) in Cell Division of Escherichia coli: Evidence for Its Involvement in Stabilizing the Assembly of the Divisome. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 8044–8052, nov. 2007.

SASAKI, K.; TAKATSUGI, K.; TUOVINEN, O. H. Spectroscopic analysis of the bioleaching of chalcopyrite by Acidithiobacillus caldus. **Hydrometallurgy**, v. 127–128, p. 116–120, out. 2012.

SATO, S. I. *et al.* Cloning of genes involved in carbazole degradation of Pseudomonas sp. strain CA10: nucleotide sequences of genes and characterization of meta-cleavage enzymes and hydrolase. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 15, p. 4841–4849, ago. 1997.

SCHOLZ, M. B.; LO, C.-C.; CHAIN, P. S. Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, Analytical biotechnology. v. 23, n. 1, p. 9–15, fev. 2012.

SCHRENK, NULL *et al.* Distribution of thiobacillus ferrooxidans and leptospirillum ferrooxidans: implications for generation of acid mine drainage. Science (New York, N.Y.), v. 279, n. 5356, p. 1519–1522, 6 mar. 1998.

SCHUMACHER, M. A. *et al.* Molecular Mechanisms of HipA-Mediated Multidrug Tolerance and Its Neutralization by HipB. **Science**, v. 323, n. 5912, p. 396–401, 16 jan. 2009.

SEEFELDT, L. C.; HOFFMAN, B. M.; DEAN, D. R. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 701–722, 2009.

SEKI, T. *et al.* Conexibacter arvalis sp. nov., isolated from a cultivated field soil sample. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. Pt 10, p. 2400–2404, out. 2012.

SHIH, P. M. *et al.* Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 3, p. 1053–1058, 15 jan. 2013.

SHIRAI, K. Screening of Microorganisms for Catechol Production from Benzene. Agricultural and Biological Chemistry, v. 50, n. 11, p. 2875–2880, 1 nov. 1986.

SHI, S. *et al.* Multistep conversion of cresols by phenol hydroxylase and 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 8, n. 4, p. 539–546, 19 dez. 2013.

SIEBERT, J. *et al.* Cryptoendolithic microorganisms from Antarctic sandstone of Linnaeus Terrace (Asgard Range): diversity, properties and interactions. **Biodiversity & Conservation**, v. 5, n. 11, p. 1337–1363, 1 nov. 1996.

SIEVERS, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 1 jan. 2011.

SIEZEN, R. J.; LEUNISSEN, J. A. M. Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. **Protein Science**, v. 6, n. 3, p. 501–523, 1 mar. 1997.

SIGUIER, P.; GOURBEYRE, E.; CHANDLER, M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 5, p. 865–891, 1 set. 2014.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201–222, jun. 1995.

SIKORSKI, J. *et al.* Complete genome sequence of Meiothermus silvanus type strain (VI-R2). **Standards in Genomic Sciences**, v. 3, n. 1, p. 37–46, 2010.

SINGER, P. C.; STUMM, W. Acidic Mine Drainage: The Rate-Determining Step. Science, v. 167, n. 3921, p. 1121–1123, 20 fev. 1970.

SINGLETON, D. R. *et al.* Solirubrobacter pauli gen. nov., sp. nov., a mesophilic bacterium within the Rubrobacteridae related to common soil clones.

INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, v. 53, n. 2, p. 485–490, 1 mar. 2003.

SKLODOWSKA, A.; MATLAKOWSKA, R. Bioleaching of metals in neutral and slightly alkaline environment. In: DONATI, E. R.; SAND, W. (Eds.). . Microbial **Processing of Metal Sulfides**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 121–29.

SOLYANIKOVA, I. P. *et al.* Peculiarities of the degradation of benzoate and its chloroand hydroxy-substituted analogs by actinobacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 100, p. 155–164, maio 2015.

SOROKOVIKOVA, E. G. *et al.* Diversity of cyanobacterial species and phylotypes in biofilms from the littoral zone of Lake Baikal. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 757–765, 19 dez. 2013.

SPENCER, A. K.; GREENSPAN, A. D.; CRONAN, J. E. Thioesterases I and II of Escherichia coli. Hydrolysis of native acyl-acyl carrier protein thioesters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 17, p. 5922–5926, 10 set. 1978.

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 7, 5 jan. 2010.

SUGIMOTO, K. *et al.* Crystal structure of an aromatic ring opening dioxygenase LigAB, a protocatechuate 4,5-dioxygenase, under aerobic conditions. **Structure**, v. 7, n. 8, p. 953–965, 15 ago. 1999.

TAIOLI, F. *et al.* Recursos minerais. In: TEIXEIRA, W. *et al.* (Eds.). . **Decifrando a terra**. 2. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2009. p. 445–467.

TAKAICHI, S. *et al.* Carotenoids of Gemmatimonas aurantiaca (Gemmatimonadetes): identification of a novel carotenoid, deoxyoscillol 2-rhamnoside, and proposed biosynthetic pathway of oscillol 2,2'-dirhamnoside. **Microbiology (Reading, England)**, v. 156, n. Pt 3, p. 757–763, mar. 2010.

TAMURA, K. *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, dez. 2013.

TANG, S.; ANTONOV, I.; BORODOVSKY, M. MetaGeneTack: ab initio detection of frameshifts in metagenomic sequences. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 29, n. 1, p. 114–116, 1 jan. 2013.

TEELING, H. *et al.* Application of tetranucleotide frequencies for the assignment of genomic fragments. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 938–947, set. 2004.

TENREIRO, S.; NOBRE, M. F.; DA COSTA, M. S. Thermus silvanus sp. nov. and Thermus chliarophilus sp. nov., two new species related to thermus ruber but with lower growth temperatures. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 4, p. 633–639, out. 1995. THEODORAKOPOULOS, N. *et al.* Exploration of Deinococcus-Thermus molecular diversity by novel group-specific PCR primers. **MicrobiologyOpen**, v. 2, n. 5, p. 862–872, 1 out. 2013.

TIAN, B.; HUA, Y. Carotenoid biosynthesis in extremophilic Deinococcus–Thermus bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 512–520, nov. 2010.

TINDALL, B. J. *et al.* Complete genome sequence of Meiothermus ruber type strain (21). **Standards in Genomic Sciences**, v. 3, n. 1, p. 26–36, 2010.

TOUROVA, T. P. *et al.* 16S Ribosomal RNA (rDNA) Sequence Analysis and Phylogenetic Position of Sulfobacillus thermosulfidooxidans. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 509–512, fev. 1995.

TREANGEN, T. J. *et al.* Next Generation Sequence Assembly with AMOS. In: BAXEVANIS, A. D. *et al.* (Eds.). . **Current Protocols in Bioinformatics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011.

TYSON, G. W. *et al.* Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, v. 428, n. 6978, p. 37–43, 4 mar. 2004.

VAJNA, B. *et al.* Thermus composti sp. nov., isolated from oyster mushroom compost. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. Pt 7, p. 1486–1490, jul. 2012.

VALENZUELA, L. *et al.* Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 197–211, abr. 2006.

VALE S.A. **Projeto Ferro Carajás S11D**, 2013. Disponível em: <<u>http://www.vale.com/PT/initiatives/innovation/s11d/Documents/book-s11d-2013-pt.pdf</u>>. Acesso em: 13 maio. 2014

VEEN, H. W. VAN. Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 72, n. 4, p. 299–315, 1 nov. 1997.

VELOSO, T. C. *et al.* The effects of fluoride and aluminum ions on ferrous-iron oxidation and copper sulfide bioleaching with Sulfobacillus thermosulfidooxidans. **Biochemical Engineering Journal**, v. 62, p. 48–55, 15 mar. 2012.

VIEIRA, E. A. A (in) sustentabilidade da indústria da mineração no Brasil. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 1, n. 2, p. 1–15, 14 out. 2011.

VIÑAS, M. *et al.* Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7008–7018, 1 nov. 2005.

VOGET, S. *et al.* Prospecting for Novel Biocatalysts in a Soil Metagenome. Applied and Environmental Microbiology, v. 69, n. 10, p. 6235–6242, 1 out. 2003.

VÖLLMECKE, C. *et al.* The ATPases CopA and CopB both contribute to copper resistance of the thermoacidophilic archaeon Sulfolobus solfataricus. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 6, p. 1622–1633, 1 jun. 2012.

WANG, B. *et al.* Engineering cyanobacteria for photosynthetic production of 3-hydroxybutyrate directly from CO2. **Metabolic Engineering**, v. 16, p. 68–77, mar. 2013a.

WANG, C. L. U. *et al.* Isolation of a benzoate-utilizing Pseudomonas strain from soil and production of catechol from benzoate by transpositional mutants. **Microbiological Research**, v. 156, n. 2, p. 151–158, 2001.

WANG, Q. *et al.* Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 15 ago. 2007.

WANG, Y. *et al.* Bioleaching of chalcopyrite by defined mixed moderately thermophilic consortium including a marine acidophilic halotolerant bacterium. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 348–354, out. 2012.

WANG, Z. *et al.* Metagenomic Profiling of Antibiotic Resistance Genes and Mobile Genetic Elements in a Tannery Wastewater Treatment Plant. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e76079, 1 out. 2013b.

WEIDOW, C. A. *et al.* Diversity and Distribution of Actinobacterial Aromatic Ring Oxygenase Genes Across Contrasting Soil Properties. **Microbial Ecology**, v. 69, n. 3, p. 676–683, 24 out. 2014.

WELLS JR, T.; RAGAUSKAS, A. J. Biotechnological opportunities with the β -ketoadipate pathway. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 627–637, dez. 2012.

WERY, J.; MENDES DA SILVA, D. I.; DE BONT, J. A. A genetically modified solvent-tolerant bacterium for optimized production of a toxic fine chemical. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 180–185, ago. 2000.

WIERZCHOS, J.; ASCASO, C.; MCKAY, C. P. Endolithic cyanobacteria in halite rocks from the hyperarid core of the Atacama Desert. **Astrobiology**, v. 6, n. 3, p. 415–422, jun. 2006.

WRIGHT, D. J. *et al.* UV Irradiation and Desiccation Modulate the Three-dimensional Extracellular Matrix of Nostoc commune (Cyanobacteria). **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 48, p. 40271–40281, 2 dez. 2005.

WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? **Current Opinion in Microbiology**, Antimicrobials/Genomics. v. 13, n. 5, p. 589–594, out. 2010.

WU, M.; SCOTT, A. J. Phylogenomic analysis of bacterial and archaeal sequences with AMPHORA2. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 28, n. 7, p. 1033–1034, 1 abr. 2012.

WU, Y.-W. *et al.* MaxBin: an automated binning method to recover individual genomes from metagenomes using an expectation-maximization algorithm. **Microbiome**, v. 2, n. 1, p. 26, 1 ago. 2014.

XIE, X. *et al.* Heavy metal resistance by two bacteria strains isolated from a copper mine tailing in China. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 26, p. 4056–4066, 2010.

YAMAOKA, A. *et al.* Meiothermus ruber H328 enhances the production of membrane vesicles for feather degradation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 78, n. 9, p. 1623–1625, 2 set. 2014.

YOU, L.; HE, L.; TANG, Y. J. Photoheterotrophic Fluxome in Synechocystis sp. Strain PCC 6803 and Its Implications for Cyanobacterial Bioenergetics. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 5, p. 943–950, 1 mar. 2015.

YU, D. *et al.* Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis. **IUBMB life**, v. 64, n. 4, p. 285–295, abr. 2012.

YU, T.-T. *et al.* Thermus tengchongensis sp. nov., isolated from a geothermally heated soil sample in Tengchong, Yunnan, south-west China. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 3, p. 513–518, mar. 2013.

YU, T.-T. *et al.* Meiothermus terrae sp. nov., isolated from a geothermally heated soil sample. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt 3, p. 794–798, 1 mar. 2014.

ZAHRL, D. *et al.* GroEL Plays a Central Role in Stress-Induced Negative Regulation of Bacterial Conjugation by Promoting Proteolytic Degradation of the Activator Protein TraJ. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 16, p. 5885–5894, 15 ago. 2007.

ZENG, Y. *et al.* Characterization of microaerophilic bacteriochlorophyll a - containing bacterium Gemmatimonas phototrophica sp. nov. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, 21 abr. 2015.

ZHANG, H. *et al.* Gemmatimonas aurantiaca gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. Pt 4, p. 1155–1163, jul. 2003.

ZHANG, Q. *et al.* These Are Not the K-mers You Are Looking For: Efficient Online K-mer Counting Using a Probabilistic Data Structure. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e101271, 25 jul. 2014.

ZHAO, H.-P. *et al.* Isolation and characterization of phenanthrene-degrading strains Sphingomonas sp. ZP1 and Tistrella sp. ZP5. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, n. 3, p. 1293–1300, 15 abr. 2008.

ANEXOS

Anexo A

Protocolo alternativo PowerMax para RNA e DNA de solos com pouca biomassa e baixa concentração de ácidos húmicos

1. Adicionar 5g (modificado para 10g) de solos nos tubos com as *beads*;

2. Adicionar 2,5 mL de Fenol ajustado (pH 7-8) e 2,5 mL de CIA (24:1);

3. Adicionar 10 mL da solução *Bead*, 1 mL da solução C1 (se seu solo estiver muito seco e absorvendo os líquidos, aumento o voluma da solução Bead para 1 mL);

4. Homogenizar no *vortex* com os adaptadores para tubos de 50 mL por 10 minutos;

Centrifugar a 4500g por 8 minutos (Caso não seja possível, centrifugue a 2500g por 15 minutos);

6. Remover o sobrenadante. Dependendo do solo, você pode ou não ter uma camada superior aquosa. Se tiver, remova apenas essa camada (aproximadamente 10 mL);

7. Adicione 1,5 mL da solução C2, feche e agite. Adicione 1,5 mL da solução C3, agite e incube por 5 minutos a 4°C e então, centrifugue por 5 minutos a 4500 g (Caso o lisado esteja muito claro depois da etapa 6, use 1 mL C2 e 1 mL de C3);

8. Transfira o sobrenadante (aproximadamente 13-14 mL) para um novo tubo;

9. Adicione volumes iguais (14 mL) da solução C4. Adicione 14 mL de etanol 100% e misture bem (por *vortex* ou inverter diversas vezes);

10. Coloque 21 mL do lisado na coluna de filtagem (metade do lisado);

11. Centrifugue por 3 minutos a 4500 g. Descarte o filtrado (líquido que passou pelo filtro);

12. Repita os passos 10 e 11 para filtrar o restante do lisado;

13. Para preparar o primeiro buffer de lavagem, adicione 9 mL da solução C4 e 11 mL de etanol 100% num tubo de 50 mL (por amostra). Adicione 20 mL na coluna e centrifugue a 4500 g por 3 minutos. Descarte o filtrado;

14. Lave com 20 mL da solução C5. Centrifugue por 3 minutos a 4500 g e descarte o filtrado;

15. Lave com 20 mL de etanol 100%. Centrifugue por 3 minutos a 4500 g e descarte o filtrado;

16. Centrifugue por 10 minutos a 4500 g para secar a coluna;

17. Pegue a coluna e coloque num novo tubo de 50 mL e mantenha a tampa aberta para secar por 10 minutos (algumas vezes o etanol permanece se não fazer essa etapa);

18. Elua o DNA/RNA em 6 mL da solução C6;

19. Centrifugue a 4500 g por 5 minutos (uma alíquota de 50 μL pode ser retirada para checar em *nanodrop* ou gel);

21. Para concentrar o DNA, adicione NaCl (0.2 M), ou seja, 240 μ L de 5M NaCl para aproximadamente 5,5 mL. Adicione 2,5 volumes de etanol 100% (14 mL). Inverta, agite ou coloque no *vortex* para misturar e então congele a -20°C por pelo menos uma hora ou overnight;

22. No próximo dia, centrifugue por 35 minutos a 4500 g para formar o pellet de DNA/RNA. Lave o pellet com etanol 70% (5 mL) e centrifugue de novo por 10 minutos a 4500 g para formar novamente o pellet. Descarte o etanol e inverta o tubo para retirar o máximo possível de etanol. Deite os tubos e deixe secar. Ressuspenda o pellet em volumes de 50 a 100 μ L (caso necessário, use 200 μ L).

Anexo B

Grupo	IMG/M	Local	Tipo	Plataforma*	#Reads	%GC	%COG	Referência
Drenagem			<u> </u>					Méndez-García
ácida de mina			Agua					et al., 2014
AMD-1	45585	Los Rueldos, Espanha		454Ti	16392	59.72	67.29	
AMD-3	45587	Los Rueldos, Espanha		454Ti	11600	62.25	65.79	
AMD-2	45586	Los Rueldos, Espanha		454Ti	13235	63.48	67.87	
Água de descarte de Urânio			Água					Hemme <i>et al.</i> , 2010
UW-1	37789	ORFRC, USA		P3730	134883	57.15	56.75	
UW-2	8145	ORFRC, USA		P3730	76154	62.62	61.96	
Água			Cala					Não encontro do
de descarte			5010					Nao encontrada
WW-1	13678	Alberta, Canada		454Ti + HS2	103565	41.96	51.06	
Peatland			Solo					
PS-2	14319	Weissenstadt, Alemanha		Ι	1370462	64.23	54.67	Não encontrada
PS-1	11330	Weissenstadt, Alemanha		Ι	994476	-	49.61	
Floresta			Solo					Não encontrada
Amazônica			3010					Nao encontrada
AF-4	9534	Fazenda Nova, Brasil		HS2000	120613	50.39	45.79	
AF-1	9190	Fazenda Nova, Brasil		HS2000	579122	56.09	46.05	
AF-5	9198	Fazenda Nova, Brasil		HS2000	434608	55.26	44.96	
AF-2	9192	Fazenda Nova, Brasil		HS2000	301463	53.35	45.71	
AF-3	9195	Fazenda Nova, Brasil		HS2000	516330	57.33	49.25	

(Continuação)

Gramado			Solo					Não encontrada
GL-2	35102	Hopland, USA		I + P	20902096	66.28	55.46	
GL-1	13580	Hopland, USA		I + P	592539	66.46	56.74	
Mar de			Ácus					Rusch et al.,
Sargaços			Agua					2007
SS-3	21778	Ilhas Bermudas		454GS + S	157458	35.53	61.12	
SS-1	21830	Ilhas Bermudas		454GS + S	542832	35.65	66.35	
SS-2	21777	Ilhas Bermudas		454GS + S	149595	35.24	62.31	
Biorreator			Amostra					Não encontrada
de Benzeno			sólida					Nao encontrada
BB-1	1537	Toronto, Canadá		454Ti	204885	50.91	53.26	
Compostagem			Descarte					Martins et al.,
de Zoológico			sólido					2013
ZC-2	5918	Sao Paulo Zoo, Brasil		454Ti	1373328	48.35	53.82	
ZC-1	5917	Sao Paulo Zoo, Brasil		454Ti	1720157	50.85	52.21	
Água subterrânea			Água					Não encontrada
GW-5	8328	Cavernas Frasassi, Itália		HS2000	770535	39.10	32.09	
GW-6	8327	Cavernas Frasassi, Itália		HS2000	502373	46.46	43.02	
GW-4	8332	Cavernas Frasassi, Itália		HS2000	532818	37.47	30.56	
GW-7	8329	Cavernas Frasassi, Itália		HS2000	1083098	60.67	46.25	
GW-3	8334	Cavernas Frasassi, Itália		HS2000	261777	44.50	46.05	
GW-2	8331	Cavernas Frasassi, Itália		HS2000	268733	44.34	50.07	
GW-8	8333	Cavernas Frasassi, Itália		HS2000	293864	37.98	40.68	
GW-9	8330	Cavernas Frasassi, Itália		HS2000	353471	43.57	46.72	

(Continuação)

GW-1	8325	Cavernas Frasassi, Itália	HS2000	293802	44.51	46.13
GW-10	8326	Cavernas Frasassi, Itália	HS2000	617664	42.72	44.19

*HS2 – HiSeq 2000, 454Ti - 454 GS FLX Ti, P3730 - PRISM3730 e quando não especificado o modelo, I – Illumina, P – Pacbio, S – Sanger

Anexo C

Abordagem	Filos
	Armatimonadetes, Firmicutes, Microgenomates, Parcubacteria, WPS-2,
RDP	Candidatus Saccharibacteria e Acidobacteria, Proteobacteria,
	Bacteroidetes e Chloroflexi não classificadas.
	Acetothermia, Aerophobetes, Aminicenantes, Aquificae,
	Armatimonadetes, Atribacteria, BRC1, Caldiserica, Caldithrixae,
	Calescamantes, Candidatus Saccharibacteria, Chlamydiae, Chlorobi,
	Chrysiogenetes, Cloacimonetes, Deferribacteres, Dictyoglomi, EM3,
DUD	Elusimicrobia, Fervidibacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria,
ЫПД	Gracilibacteria, Hydrogenedentes, Ignavibacteriae, Latescibacteria,
	Lentisphaerae, Marinimicrobia, Microgenomates, Nitrospinae,
	Nitrospirae, Omnitrophica, PER, Parcubacteria, Poribacteria,
	Spirochaetes, Synergistetes, Tenericutes, Thermodesulfobacteria,
	Thermotogae, WS1
	Thermotogae, WS1

RDP corresponde a anotação taxonômica realizada através da identificação do gene de rDNA 16S e BHB corresponde a anotação taxonômica realizada através do melhor *hit* do BLAST.

Anexo D

Lista de gêneros presentes na categoria Outros da Figura 6: Aciditerrimonas, Algoriphagus, Altererythrobacter, Anaerolinea, Arenimonas, Armatimonadetes, Bdellovibrio, Bellilinea, Belnapia, Blastococcus, Candidatus Koribacter, Craurococcus, Dokdonella, Dongia, Flavihumibacter, Flavisolibacter, Flavitalea, Fodinicola, Gemmata, Gp1, Gp10, Gp16, Gp3, Gp4, Gp7, GpXIII, Haliangium, Haliea, Hyphomonas, Ignavibacterium, Ilumatobacter, Kofleria, Legionella, Leifsonia, Litorilinea, Lysobacter, Marinoscillum, Marmoricola, Meiothermus, Methylogaea, Microcella, Microgenomates, Nannocystis, Nitrososphaera, Opitutus, Panacagrimonas, Peredibacter, Phenylobacterium, Parcubacteria, Pimelobacter, Planctomyces, Porticoccus, Pseudenhygromyxa, Rhodobacter, Saccharibacteria, Rhodocista, Sandaracinobacter, Singularimonas, Solimonas, Sphaerobacter, Sphingomonas, Subdivision3, Sphingosinicella, Sporichthya, Steroidobacter, Thermomonas, *Thermosporothrix, Thiobacter, Thiohalobacter, Thioprofundum, WPS-2 e Gp6.*

Anexo E

Lista de gêneros presentes na categoria Outros da Figura 16: Ilumatobacter, Amycolicicoccus, Geodermatophilus, Stackebrandtia, Intrasporangium, Clavibacter, Thermobispora, Thermomonospora, Salinispora, Microlunatus, Rubrobacter, Maribacter, Opitutus, Sphaerobacter, Gloeobacter, Nostoc, Dactylococcopsis, Chroococcidiopsis, Thermus, Terriglobus, Candidatus Solibacter, Candidatus Koribacter, Kyrpidia, Bacillus, Thermoanaerobacterium, Bradyrhizobium, Hyphomicrobium, Mesorhizobium, Rhizobium, Parvibaculum, Hirschia, Hyphomonas, Ruegeria, Sphingobium, Sphingopyxis, Achromobacter, Bordetella, Cupriavidus, Ralstonia, Delftia, Ramlibacter, Variovorax, Leptothrix, Thiobacillus, Methylotenera, Nitrosospira, Azoarcus, Geobacter, Myxococcus, Marinobacter, Allochromatium, Thiocystis, Legionella, Methylococcus, Gammaproteobacteria não classificadas, Rhodanobacter, Xanthomonas e Thermobaculum.

Anexo F

Geitlerinema CGene ID (Query)	Query-Length	Subject	Subject-Length	CAZy Families
2609077137	355	AFZ33492.1	375	AA1
2609077118	499	AFZ33447.1	520	AA1
2609077355	429	ACZ43019.1	441	AA3
2609074704	459	ACZ43019.1	441	AA3
2609076226	491	ABG95085.1	539	AA4
2609075724	183	BAM69349.1	207	AA6
2609075806	451	AGB32057.1	478	AA7
2609074333	521	NP_733639.1	646	CBM13
2609075980	648	CAJ63931.1	634	CBM13
2609076230	608	AFY64763.1	621	CBM48 GH13
2609075734	549	AFY65200.1	562	CBM48 GH13
2609076321	530	AFK86142.1	431	CBM50
2609077290	175	AGK98730.1	217	CBM50
2609077289	196	AEN88125.1	182	CBM50
2609077152	410	AFY74602.1	332	CBM50
2609075047	295	AGK05303.1	344	CBM50
2609076208	339	AFY89379.1	286	CBM50
2609074563	234	AFD26854.1	265	CBM50
2609075103	256	AFY68169.1	269	CE1
2609074915	307	AFY66891.1	320	CE11
2609074863	597	AFY65977.1	610	CE4
2609076464	240	AFY66164.1	253	CE4
2609075138	469	AFY68134.1	482	GH100
2609076299	384	AFY67504.1	397	GH102
2609077287	361	AFY57386.1	374	GH104

(Continuação)

2609075713	397	AFY57386.1	374	GH104
2609076758	252	AFY67622.1	265	GH104
2609076719	408	ACJ28445.1	468	GH109
2609077755	821	AFY64664.1	834	GH116
2609074803	430	ACB53271.1	418	GH19
2609076419	594	ACI16879.1	549	GH23
2609075736	734	AFY65202.1	747	GH23
2609077378	556	AFY65589.1	570	GH3
2609076157	777	AFY65063.1	790	GH31
2609076228	516	AFY64765.1	529	GH37
2609074508	1063	AFY67083.1	1076	GH38
2609076952	529	AFY65142.1	542	GH57
2609076399	882	AFY67185.1	895	GH57
2609076419	594	ABR36806.1	674	GH73
2609074935	474	AFY65825.1	487	GH73
2609077716	501	AFY67242.1	514	GH77
2609074964	433	AFY65797.1	446	GT1
2609074912	411	AFY66888.1	424	GT19
2609076307	319	BAI89556.1	329	GT2
2609076373	325	ABA21964.1	340	GT2
2609075619	321	ADU98432.1	338	GT2
2609077523	502	AFY66703.1	516	GT20
2609074672	253	AFY68321.1	266	GT26
2609075761	249	AFY65225.1	262	GT26
2609075211	258	AFY68062.1	271	GT26
2609077272	257	AFY65470.1	270	GT26

(Continuação)

2609074490	363	AFY67067.1	376	GT28
2609075549	869	AFY67475.1	882	GT35
2609075178	508	AFY68094.1	521	GT39
2609076539	402	ABW30040.1	416	GT4
2609074165	410	AFM21804.1	431	GT4
2609077649	384	ACK66782.1	399	GT4
2609077649	384	ACV02153.1	399	GT4
2609076956	392	ADN15667.1	407	GT4
2609074809	357	AFZ23845.1	374	GT4
2609075071	389	AFZ59227.1	404	GT4
2609074810	368	ABA24654.1	372	GT4
2609077479	373	AFZ00860.1	383	GT4
2609077479	373	AFZ13610.1	387	GT4
2609076218	399	AFY86205.1	413	GT4
2609076402	806	AFZ13791.1	819	GT4
2609075140	745	AFY68132.1	759	GT41
2609075057	645	AFY68186.1	658	GT51
2609075962	703	AFY64874.1	730	GT51
2609077039	402	ADB61817.1	397	GT61
2609075721	319	AFY67702.1	332	GT9

Anexo G

Meiothermus CCNMD23 Gene ID (Query)	Query-Length	Subject	Subject-Length	CAZy Families
2609080993	577	AGK04345.1	593	GH13
2609078301	633	AGK03540.1	649	GH13
2609078437	483	ADH63212.1	499	GH13
2609080421	542	ADH62690.1	545	GH13
2609081123	461	ADH65230.1	494	GH13
2609080430	498	ADV65920.1	532	GH51
2609081001	322	ABX03534.1	341	CE7
2609080629	949	BAM01953.1	951	GH78
2609079535	495	AGK03536.1	512	AA1
2609079115	257	CCH27967.1	310	CBM12
2609080431	638	AGB45342.1	679	GH127
2609079493	871	ABQ28336.1	867	GT35
2609081271	324	ABF44726.1	349	CE1
2609079727	282	AGK05095.1	298	CE1
2609080522	447	AFT66533.1	535	AA4
2609078762	761	AEN88646.1	814	GH31
2609079179	383	AFL77663.1	478	GH109
2609079877	364	CCK25528.1	438	GH109
2609080808	505	AGK03649.1	524	GH3
2609080809	503	ADH62224.1	524	GH3
2609079058	710	BAJ63898.1	725	GH3
2609079875	765	BAL98991.1	759	GH3
2609080823	1067	ADH64705.1	1075	GH38
2609080306	1077	ADH64705.1	1075	GH38
2609079769	449	ADH65003.1	462	GH4

(Continuação)

2609081329	648	ADH64250.1	658	GH42
2609080433	331	ACZ43101.1	356	GH43
2609080153	501	AGK04352.1	514	GH77
2609079104	237	ADH64010.1	259	GT26
2609080063	343	AGK05791.1	357	GT28
2609080179	444	AGK03576.1	460	GT5
2609078374	368	AEG15642.1	385	GT4
2609078006	210	ADL13107.1	222	GT2
2609078414	275	BAM00821.1	317	GT2
2609079609	275	AFY35024.1	332	GT2
2609078373	311	CAF23628.1	325	GT2
2609080659	258	ACS34650.1	317	GT2
2609081050	255	AGK05033.1	263	CE11
2609081328	486	AGK04988.1	497	GH36
2609079345	554	ACE92747.1	671	CBM50
2609079516	403	AGK04595.1	396	CBM50
2609080168	622	ACX42259.1	591	CBM12
2609078549	775	ACL69397.1	810	CBM50
2609079047	720	ACL69397.1	810	CBM50
2609080189	330	AGG07251.1	290	CE14
2609078510	326	AGG05850.1	290	CE14
2609081166	242	AGK03505.1	253	CE14
2609081325	272	AGK04984.1	284	CE14
2609078140	221	AGK06052.1	234	CE14
2609079955	225	ADW21479.1	240	CE14
2609079955	225	BAD71023.1	240	CE14

(Continuação)

2609080618	324	AFZ04081.1	278	CE4
2609078520	428	AGK04262.1	410	CE4
2609078641	240	ADH64975.1	258	CE4
2609080191	424	ADH64520.1	426	CE4
2609078150	387	AEV16208.1	405	CE4
2609079699	381	ACZ43019.1	441	AA3
2609079642	573	ADH62339.1	587	GH23
2609079022	148	ADH62445.1	167	GH23
2609078100	738	AGK06156.1	758	GT51
2609078825	423	ADH62585.1	436	GH63

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada Análise Metagenômica da Microbiota de Solos de Ambientes de Mina de Cobre:

(X) não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. _____, Instituição:

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. ______, Instituição:

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. ______, Instituição:

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Aluno: Daniel Bedo Assumpção Castro

Orientador: Laura Maria Mariscal Ottoboni

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: () Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: () Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Profa. Dra. Rachel Meneguello Presidente Comissão Central de Pós-Graduação Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado, intitulada Análise Metagenômica da Microbiota de Solos de Ambientes de Mina de Cobre, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 22/06 /2015

Autor

RG n.º 466302800

m. m. Ottoboni

Orientador RG n.º 68554965