

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA FUNCIONAL DE
COMUNIDADES MICROBIANAS PRESENTES NA ÁGUA DE
UMA CAVA E LAGOA DE REJEITOS DE UMA REGIÃO
MINERADORA DESATIVADA**

Milena Tavares Lima Constancio

Tecnóloga em Biocombustíveis

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA FUNCIONAL DE
COMUNIDADES MICROBIANAS PRESENTES NA ÁGUA DE
UMA CAVA E LAGOA DE REJEITOS DE UMA REGIÃO
MINERADORA DESATIVADA**

Milena Tavares Lima Constancio

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

2018

C757d Constancio, Milena Tavares Lima
Diversidade e estrutura funcional de comunidades microbianas presentes na água de uma cava e lagoa de rejeitos de uma região mineradora desativada / Milena Tavares Lima. -- Jaboticabal, 2018
iv, 99 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Banca examinadora: Rodrigo Matheus Pereira, Maria Benincasa Vidotti, Danillo Oliveira de Alvarenga, Everlon Cid Rigobelo

Bibliografia

1. Biolog Ecoplate. 2. Mineração de ferro. 3. Metagenômica de água. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 579.68

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DIVERSIDADE E ESTRUTURA FUNCIONAL DE COMUNIDADES MICROBIANAS PRESENTES NA ÁGUA DE UMA CAVA E LAGOA DE REJEITOS DE UMA REGIÃO MINERADORA DESATIVADA

AUTORA: MILENA TAVARES LIMA CONSTANCIO

ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

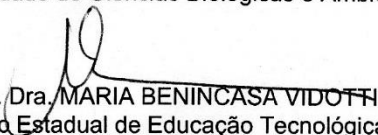
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



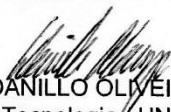
Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. RODRIGO MATHEUS PEREIRA
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais / UFGD / Dourados/MS



Profa. Dra. MARIA BENINCASA VIDOTTI
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP



Pós-doutorando DANILLO OLIVEIRA DE ALVARENGA
Departamento de Tecnologia / UNESP / FCAV - Jaboticabal



Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELO
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 29 de janeiro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Milena Tavares Lima Constancio - Nascida em 19 de abril de 1990, em Taquaritinga, São Paulo, Brasil. Ingressou no curso de Tecnologia em Biocombustíveis na Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal – FATEC em fevereiro de 2009. No mesmo ano, iniciou estágio no Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e de Plantas (Departamento de Tecnologia) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP onde realizou seu trabalho de conclusão de curso e foi bolsista de Iniciação Científica (FAPESP). Em fevereiro de 2012 recebeu o título de Tecnóloga em biocombustíveis. Ingressou em março do mesmo ano no curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP, onde defendeu sua dissertação de mestrado em fevereiro de 2014. Em março de 2014 iniciou o curso de doutorado em Microbiologia Agropecuária, na mesma instituição, no Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e de Plantas (Departamento de Tecnologia). Em 29 de janeiro de 2018 defendeu sua tese de doutorado em Microbiologia Agropecuária.

“N3o temas, crê somente”. (Marcos 5:36)

AGRADECIMENTOS

A Deus que iluminou o meu caminho, me dando sabedoria e força nesta caminhada.

Às minhas professoras e orientadoras: Profa. Dra. Eliana G. de Macedo Lemos e Profa. Dra. Lúcia M. Carareto Alves eu deixo meu imenso agradecimento pela orientação repleta de sabedoria, paciência, dedicação e profissionalismo, ambas foram essenciais à minha formação como profissional e, além disso, minha evolução como pessoa.

À minha família e amigos pois acreditaram em mim desde o primeiro instante, sempre me incentivaram perante os desafios a fazer mais e melhor.

Ao meu esposo Rafael que esteve comigo ao longo de todo este percurso, pela ajuda, compreensão, encorajamento e amor incondicional.

A todos amigos e funcionários do Departamento de Tecnologia e do Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas pela ajuda, amizade e companheirismo.

À FAPESP (através do processo nº 2010/51316-0 e nº 2014/07592-3), à CAPES e ao Programa de Microbiologia Agropecuária pelo suporte oferecido para o desenvolvimento do trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	1
1. Introdução	1
2. Objetivos	2
3. Revisão de Literatura	2
3.1 Sabará e o quadrilátero ferrífero	2
3.2 Indústria extrativista e minério de ferro	4
3.3 Importância dos micro-organismos na água	6
3.4 Biolog Ecoplate	7
3.5 Metagenômica.....	9
3.5.1 Targeted sequencing – 16S rRNA	9
3.5.2 Shotgun	10
4. Referências.....	12
CAPÍTULO 2 – Diversidade taxonômica e funcional de bactérias em águas residuais de mineração.....	18
1. Introdução	19
2. Material e Métodos.....	20
2.1 Coleta das amostras	21
2.2 Análise da concentração de metais na água	22
2.3 Isolamento de bactérias	22
2.4 Identificação das bactérias isoladas por sequenciamento do gene de 16S rRNA	23
2.5 Avaliação da produção de enzimas pelos isolados bacterianos	23
2.6 Avaliação da diversidade metabólica da população microbiana das amostras de água	24
2.7 Extração e quantificação do DNA metagenômico	25
2.8 Amplificação da região V4-V5 do gene de 16S rRNA	26
2.9 Sequenciamento da região V4-V5 do gene de 16S rRNA	26
2.10 Análises bioinformáticas	27
2.11 Predição metabólica funcional	28

3. Resultados	29
3.1 Avaliação da água quanto a concentração de metais e pH	29
3.2 Produção de enzimas e identificação parcial das bactérias isoladas	30
3.3 Capacidade funcional da população microbiana através da avaliação do metabolismo de carbono	31
3.4 Diversidade da comunidade bacteriana presente nas amostras da Cava e Lagoa avaliadas pelo sequenciamento do 16S rRna na plataforma Ion PGM™ ...	34
3.5 Predição do potencial metabólico funcional	40
4. Discussão	43
5. Conclusão	55
6. Referências	56
CAPÍTULO 3 - Diversidade e estrutura funcional de comunidades microbianas presentes na água de uma cava de mineração.....	71
1. Introdução	72
2. Material e Métodos.....	74
2.1 Áreas de estudo e coleta de amostras.....	74
2.2 Análise da concentração de metais na água	75
2.3 Extração do DNA metagenômico.....	76
2.4 Preparação da biblioteca de DNA para sequenciamento.....	76
2.5 Processamento das sequências, montagem e anotação gênica	77
3. Resultados	77
3.1 Avaliação da água quanto a concentração de metais e pH	77
3.2 Sequenciamento do DNA metagenômico	78
3.3 Diversidade taxonômica	78
3.4 Diversidade funcional	80
3.5 Resistência a metais	82
3.6 Metabolismo do nitrogênio	84
4. Discussão	86
5. Conclusão	92
6. Referências	93

DIVERSIDADE E ESTRUTURA FUNCIONAL DE COMUNIDADES MICROBIANAS PRESENTES NA ÁGUA DE UMA CAVA E LAGOA DE REJEITOS DE UMA REGIÃO MINERADORA DESATIVADA

RESUMO - O interesse no estudo de comunidades microbianas de ambientes pouco avaliados, impactados e/ou extremos tem aumentado significativamente. Dentre os ambientes estudados, encontram-se as águas residuais de áreas de mineração. Com o grande número de cavas e lagoas de rejeitos gerados através da atividade mineradora e o pouco estudo deste tema no Brasil, foi desenvolvido este trabalho, onde avaliamos a taxonomia e capacidade funcional da comunidade microbiana. As amostras de água foram coletadas de uma cava de mineração e uma lagoa de rejeitos de uma região anteriormente utilizada para extração de minério de ferro no Centro de Biodiversidade (CeBio) da empresa VALE/SA, em Sabará/MG. Análises do perfil de atividade metabólica indicaram um excelente desempenho quanto à degradação de diferentes compostos. Além disso, o isolamento com métodos tradicionais de cultivo mostrou que algumas bactérias apresentam capacidade em produzir diferentes enzimas de interesse biotecnológico. O DNA foi extraído e sequenciado através de técnicas metagenômicas, o sequenciamento do gene de 16S rRNA foi realizado na plataforma Ion PGM™. Esta análise, além de revelar a taxonomia da comunidade presente na água da cava e lagoa, identificou o perfil funcional indicando enriquecimento de subsistemas importantes para ambas as amostras. Adicionalmente para a água da cava de mineração, foi realizado o sequenciamento do DNA total na plataforma Ion Proton™, que através de análises com o banco de dados SEED revelou genes associados à manutenção celular e ao ciclo do nitrogênio, sugerindo que a comunidade microbiana está bem adaptada ao processo de recuperação da área. Além disso, as ORfs preditas do metagenoma foram utilizadas para uma análise no banco de dados BacMet, que revelou uma abundância de genes relacionados a resistência a metais. Assim, nossos dados expandem os conhecimentos sobre a estrutura e capacidade funcional das comunidades microbianas de ambientes aquáticos impactados, fornecendo uma melhor compreensão do papel dos micro-organismos em processos de remediação natural.

Palavras - chave: biologia ecoplata, metagenômica de água, mineração de ferro

DIVERSITY AND FUNCTIONAL STRUCTURE OF MICROBIAL COMMUNITIES IN WATER FROM A MINING PIT AND LAGOON OF REJECTS OF A DISABLED MINING REGION

ABSTRACT - The interest in the study of microbial communities of low evaluated, impacted or extreme environments has increased significantly. Among the studied environments, there is the wastewater from mining areas. Due to the large number of reject pits and lagoons generated by the mining activity and the lack of study of this theme in Brazil, this study was developed to evaluate the taxonomy and functional capacity of the microbial community. The water samples were collected from a mining pit and a reject lagoon from a region formerly used for iron extraction at the Biodiversity Center (CeBio) from VALE/SA, in Sabará/MG. Analyzes of the metabolic activity profile indicated an excellent performance regarding the degradation of different compounds. Moreover, the isolation with traditional methods of culture showed that some bacteria have the capacity to produce different enzymes of biotechnological interest. The DNA was extracted and sequenced using metagenomic techniques, the 16S rRNA gene sequencing was performed on the Ion PGM™ platform. This analysis, in addition to revealing the taxonomy of the community present in the water of the pit and the lagoon, identified the functional profile indicating enrichment of important subsystems for the studied samples. In addition to the water from the mining pit, the total DNA sequencing was carried out on the ION Proton™ platform, which, through analysis with the SEED database, revealed genes associated with cell maintenance and the nitrogen cycle, suggesting that the microbial community is well adapted to the recovery process of the area. Also, the predicted ORfs from metagenomic were used for an analysis in the BacMet database that revealed an abundance of genes related to resistance to metals. Thus, our data expand the knowledge about the structure and functional capacity of microbial communities in impacted aquatic environments, providing a better understanding of the role of microorganisms in natural remediation processes.

Key-words: biologic ecoplate, metagenomics water, iron mining

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. Introdução

O minério de ferro é um elemento essencial na indústria extrativista, tanto em relação ao volume da produção quanto nos investimentos financeiros e a extração do mineral é uma das principais atividades econômicas tanto no Brasil como em todo o mundo. Apesar da sua importância no mercado mundial as atividades de mineração afetam negativamente a qualidade dos solos e aquíferos que cercam o local de extração, ameaçando a saúde humana e os ecossistemas (ANJOS; MAGALHÃES; ABREU, 2012; RODRÍGUEZ et al., 2009).

O impacto que a atividade mineradora causa tem sido alvo de pesquisas nos últimos anos, principalmente em estudos relacionados ao impacto causado nas comunidades microbianas em solos e em sedimentos (HONG et al., 2015; COSTA et al., 2015). Porém, poucos estudos têm se centrado sobre o potencial ecológico da microbiota aquática na mineração de ferro apesar de seu impacto ambiental específico.

A dificuldade de isolamento de micro-organismos que se desenvolvem em ambientes extremos e peculiares é universalmente reconhecida (KEMP; ALLER, 2004). Desta forma, uma estratégia poderosa para avaliar a diversidade microbiana funcional e taxonômica é a abordagem metagenômica. Nos últimos 20 anos, as novas tecnologias de sequenciamento, juntamente com ferramentas metagenômicas computacionais, transformaram a pesquisa de ecologia microbiana.

A metagenômica fornece informações sobre as interações das comunidades microbianas com o meio ambiente e oferece uma oportunidade extraordinária para examinar de forma abrangente a resposta do ecossistema às mudanças ambientais (GILBERT; DUPONT, 2011). No entanto, ainda faltam pesquisas metagenômicas que avalie completamente a diversidade microbiana em águas residuais em áreas de mineração.

Neste estudo aplicamos a abordagem metagenômica juntamente com outras técnicas, como o isolamento de bactérias e a análise da diversidade metabólica, para avaliar a composição taxonômica e funcional das comunidades microbianas da água de uma cava de mineração e de uma lagoa de rejeitos desativadas. A cava e a lagoa analisadas neste estudo pertencem à Vale do Rio Doce S/A e foram exploradas durante 30 anos. Esse local está desativado há 20 anos e atualmente abriga o Centro de Pesquisas e Conservação da Biodiversidade do Quadrilátero Ferrífero (CeBio).

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi entender a estrutura taxonômica e funcional dos micro-organismos presentes em amostras de água de uma lagoa de rejeitos e cava de mineração de ferro desativadas.

3. Revisão de Literatura

3.1 Sabará e o quadrilátero ferrífero

Sabará é um município do estado de Minas Gerais, localizado na região metropolitana de Belo Horizonte, Brasil. É caracterizada por apresentar montanhas rochosas e solos com características calcárias que possui grande concentração de ferro. A economia da cidade baseia-se na indústria siderúrgica e no extrativismo mineral (VARAJAO, 1991). Sabará é encontrada dentro do Complexo do Quadrilátero Ferrífero que engloba riquezas como o minério de ferro, manganês e ouro, tornando-a umas das principais regiões metalogenéticas do mundo.

O quadrilátero ferrífero é explorado desde o final do século XVII, com a exploração do ouro. No século XIX, estas explorações intensificaram-se com a extração do ferro e manganês, e resultaram em processos de degradação ambiental

de longa data (RUCHKYS; MACHADO, 2013). O Quadrilátero Ferrífero (QF), uma estrutura geológica cuja forma se assemelha a um quadrado, está localizado na porção centro-sul do Estado de Minas Gerais (Figura 1). Abrange uma área de cerca de 7.000 km² e compreende cinco grandes conjuntos de unidades rochosas: Complexos metamórficos, Super grupo Rio das Velhas, Super grupo Minas, Grupo Sabará e Grupo Itacolomi (RAMOS, 2016). Em razão da grande diversidade geológica e topográfica o QF é considerado de “importância biológica extrema” para a conservação da biodiversidade no estado (COSTA, 1998).

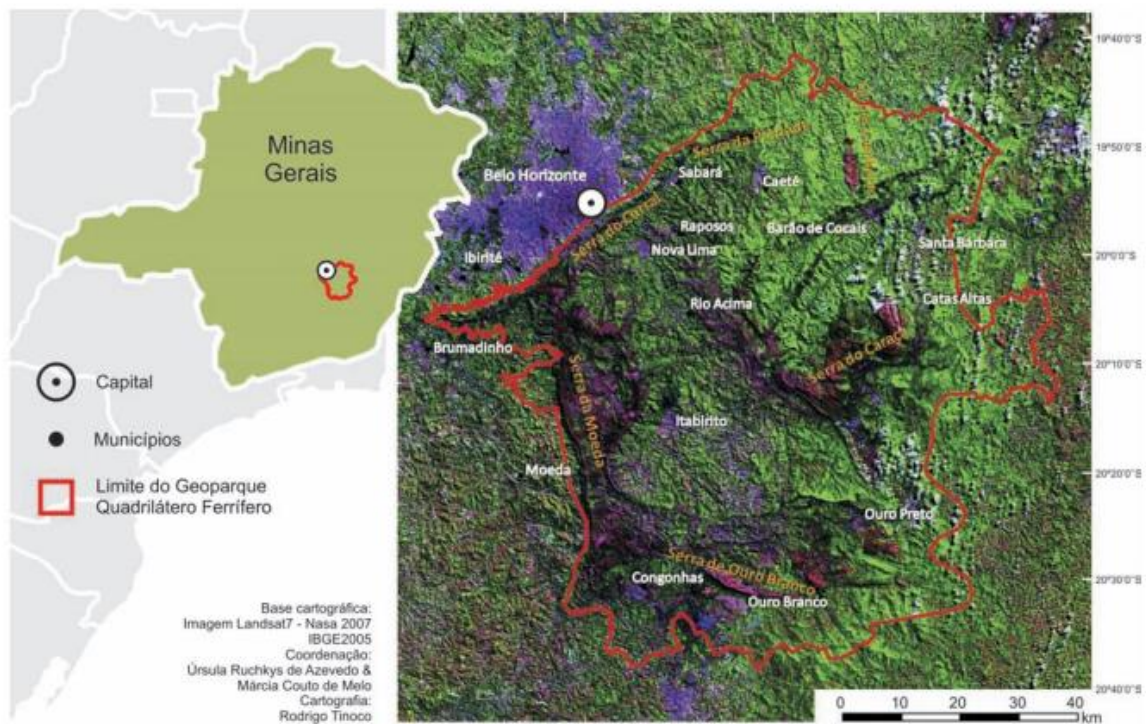


Figura 1. Localização geográfica do quadrilátero ferrífero (AZEVEDO et al., 2012).

3.2 Indústria extrativista e minério de ferro

A importância da indústria extrativista mineral é notável em todo o mundo e tem um impacto relevante na economia brasileira, que historicamente apresenta o seu desenvolvimento em íntima relação com o aproveitamento dos seus recursos naturais (D'AGOSTINO, 2008).

Segundo o anuário mineral brasileiro, em 2015, as substâncias da classe dos metálicos responderam por cerca de 76% do valor total da produção mineral comercializada (Figura 2). Dentre essas substâncias, o alumínio, cobre, estanho, ferro, manganês, nióbio, níquel e ouro corresponderam a 98,5% do valor da produção na classe dos metálicos. O valor da produção comercializada dessas oito substâncias totalizou 67,5 bilhões de reais, com destaque para a expressiva participação do ferro nesse montante.

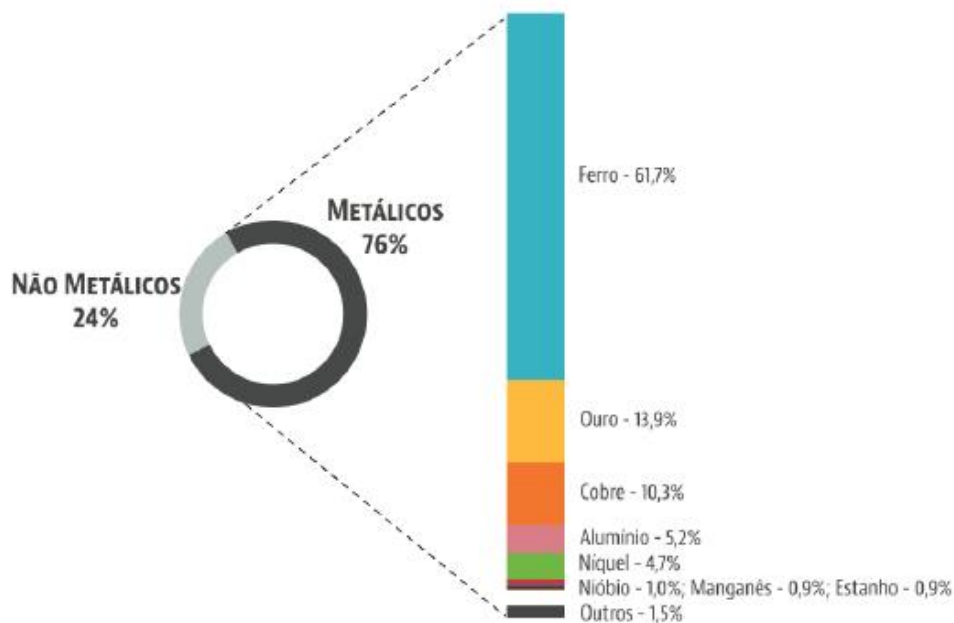


Figura 2. Participação das principais substâncias metálicas no valor da produção mineral comercializada segundo o anuário mineral brasileiro de 2015.

Industrialmente, a única forma pela qual se obtém o ferro (Fe) é a partir de substâncias minerais. O metal é o quarto elemento mais abundante da crosta terrestre, de cuja composição participa com 4,5% em massa, superado apenas pelo oxigênio, o silício e o alumínio (CARVALHO et al., 2014). O minério de ferro é principalmente utilizado na indústria siderúrgica, totalizando 99% do seu destino; o restante é utilizado como carga na indústria de ferro-liga, cimento e eventualmente na construção de estradas (QUARESMA, 2002).

Para a extração, tratamento e beneficiamento do minério de ferro, é necessário um complexo de atividades. O processo inicia-se na lavra, onde se reúnem as atividades para a extração do mineral. A lavra pode acontecer a céu aberto, subterrâneo e por dissolução, dependendo da disposição do minério. A lavra a céu aberto é comumente chamada de cava, e é utilizada quando os depósitos minerais são encontrados perto da superfície. Com a retirada do material de interesse, a profundidade da cava aumenta e a exploração por longos períodos gera uma grande depressão onde se acumulam milhões de litros de água, podendo chegar até ao subsolo.

Durante o decapeamento da mina, são obtidos os resíduos denominados estéreis e, na abertura da cava, é extraído o material de interesse, os quais, respectivamente, seguem para pilha de estéril e para tratamento/beneficiamento (GONÇALVES, 2013). Entre as atividades contidas na cadeia de produção do minério de ferro, dar a destinação adequada para os rejeitos gerados no processo de beneficiamento tem sido um dos maiores desafios. Em geral, os processos de beneficiamento do minério envolvem a adição de água; por este fato, comumente os rejeitos são dispostos na forma de polpas e, por isso, são estocados em barragens ou lagoas (BOCCAMINO, 2017).

As lagoas de rejeitos são estruturas que têm a finalidade de reter os resíduos sólidos e água dos processos de beneficiamento do minério. O rejeito é um material que não possui maior valor econômico, mas para salvaguardas ambientais deve ser devidamente armazenado.

A cava de mineração e a lagoa de rejeitos avaliadas neste estudo pertencem à Vale do Rio Doce S/A e foram exploradas durante 30 anos. Esse local está desativado há 20 anos e atualmente abriga o Centro de Pesquisas e Conservação da

Biodiversidade do Quadrilátero Ferrífero (CeBio) criado em 27 de junho de 2008 (AZEVEDO et al., 2012). O CeBio apresenta grande representatividade de Campos Rupestres (Vegetação de Canga) e está inserido entre dois importantes “hotspots” brasileiros: a Mata Atlântica e o Cerrado. Estes são considerados entre as regiões com maior biodiversidade do mundo, bem como áreas remanescentes do processo de mineração (Capim) e regiões reflorestadas com Eucalipto (RAMOS, 2016).

3.3 Importância dos micro-organismos na água

Os micro-organismos são considerados componentes-chave na estrutura e função dos ecossistemas aquáticos. Por exemplo, as bactérias podem representar até 90% dos micro-organismos presentes nestes ecossistemas, contribuindo com uma fração dominante da biomassa desses ecossistemas (ZEHR, 2010). Com a capacidade de responder de forma rápida as alterações ambientais, os micro-organismos são os responsáveis por processos biogeoquímicos, como a metabolização do carbono orgânico dissolvido, essencial para o funcionamento do ecossistema (HAHN, 2006).

No ambiente aquático, os micro-organismos também realizam interações com a fauna e a flora, possuindo importante interação na cadeia alimentar. Através de alterações bioquímicas, os micro-organismos reciclam elementos e nutrientes da água, desempenhando um papel importante na manutenção da vida aquática (CHAO, 2003).

Compreender a atividade da comunidade microbiana de águas de lagoas e cavas de mineração desativadas é essencial para entender os níveis de organização de todo o ecossistema aquático, já que a quantidade de informações sobre populações microbianas de águas residuais de mineração no Brasil é escassa devido a poucos estudos na área e também a dificuldade de se isolar esses micro-organismos.

3.4 Biolog Ecoplate

As Microplacas de Biolog foram desenvolvidas no final da década de 1980 para auxiliar na identificação de cepas bacterianas (GARLAND; MILLS, 1991). Mais tarde, os ecologistas microbianos usaram as placas Biolog para investigar padrões a nível comunitário. A partir daí, foi criada uma nova placa especificamente projetada para análises comunitárias e estudos ecológicos microbianos. Esta nova placa foi referida como EcoPlate (INSAM, 1997).

O sistema EcoPlate (Biolog, Inc., Hayward, CA, EUA), é um método que mede a intensidade de utilização de diferentes fontes de carbono pelos micro-organismos e produz um padrão metabólico característico daquela comunidade. Este método auxilia o entendimento da comunidade microbiana e sua diversidade funcional. Nos estudos ambientais, análises com o sistema EcoPlate podem ser realizadas a partir de culturas mistas ou isoladas de micro-organismos e de amostras ambientais de solo, água e resíduos (PIERCE; WARD; DOBBS, 2014).

As microplacas Biolog Ecoplate contêm 96 poços, divididos em três réplicas de 31 fontes de carbono e um controle negativo, e cada poço também contém meio de cultura mínimo e corante redox violeta tetrazólio (PIERCE; WARD; DOBBS, 2014). As 31 fontes de carbono podem ser divididas em seis categorias de nutrientes: ácidos carboxílicos, aminas, aminoácidos, carboidratos, compostos fenólicos e polímeros (Tabela 1) (LIMA; GARCIA, 2011). As amostras são inoculadas diretamente sobre as microplacas, incubadas em estufa, e a cada 24 horas realiza-se a leitura de absorvância, tornando-a assim uma ferramenta rápida e conveniente para comparar a diversidade das comunidades microbianas (GAVRILESCU, 2010).

A técnica do Biolog Ecoplate é muito utilizada e tem sido muito útil para refletir as mudanças de atividade metabólica e/ou potencial de versatilidade funcional de comunidades microbianas expostas a diversos estresses, inclusive pela concentração de metais pesados (PIERCE; WARD; DOBBS, 2014). Com base na utilização desta técnica, Janniche, Spliid e Albrechtsen (2012) e They et al. (2013) concluíram que o uso das placas Ecoplate é importante para estudar e comparar os perfis fisiológicos de comunidades microbianas em amostras de água, com ou sem poluição.

Tabela 1. Fontes de carbono presentes no Biolog Ecoplate

Substratos	Fontes de Carbono
Polímeros	Glicogenio
	α -ciclodextrina
	Tween 40
	Tween 80
Carboidratos	D-celobiose
	β -metil-D-glicosideo
	N-acetil-D-glicosamina
	i-Eritridol
	D-xilose
	Ácido-D-galacturônico
	D,L- α -glicerolfosfato
	Glicose-1-fosfato
	α -D-lactose
	D-manitol
	Ácidos Carboxílicos
Ácido D-glicosamínico	
Éster Metílico do ácido pirúvico	
Ácido Itacônico	
Ácido-D-galacturônico	
Ácido α -cetobutírico	
Ácido D-málico	
Aminoácidos	L-serina
	L-fenilalanina
	L-arginina
	L-treonina
	L-asparagina
Amina/Amida	Ácido glicil-L-glutâmico
	Feniletlanina
Fenólico	Putrescina
	Ácido-2-Hidroxibenzóico
	Ácido-4-Hidroxibenzóico

3.5 Metagenômica

Nos últimos anos a metagenômica revolucionou os estudos em microbiologia ambiental. Baseada em métodos independentes de cultivo, esta técnica permitiu o estabelecimento de uma nova abordagem no estudo de diversidade, genômica e função gênica em micro-organismos ditos “não cultiváveis”, visto as dificuldades em cultivar grande parte da microbiota presente na natureza. Estima-se que apenas 0,1 a 1,0% da microbiota presente nos ambientes são cultiváveis por meio de métodos padrões de cultivo (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; TORSVIK; ØVREÅS; THINGSTAD, 2002; STREIT; SCHMITZ, 2004)

Em síntese, o termo metagenômica se refere a uma abordagem independente de cultivo que é baseada na investigação das moléculas de DNA de uma mistura de populações microbianas, ou seja, é baseada na análise genômica de DNA microbiano extraído diretamente de amostras ambientais (HANDELSMAN et al., 1998). As informações obtidas a partir da análise de metagenomas podem ser utilizadas para determinar a diversidade de uma comunidade, a presença de micro-organismos específicos ou dominantes, rotas metabólicas ou a presença de genes biotecnologicamente importantes.

A metagenômica representa um conjunto de técnicas que inclui muitas abordagens e métodos. Atualmente, são utilizadas duas abordagens principais de estudos metagenômicos, que são: através do sequenciamento do gene 16S rRNA ou do DNA total (Figura 3).

3.5.1 Targeted sequencing – 16S rRNA

“Targeted sequencing” é uma técnica de sequenciamento de genes alvos ou “amplicons”, como por exemplo o sequenciamento do gene de 16S rRNA que objetiva traçar o perfil taxonômico de uma comunidade microbiana, determinando quais organismos estão presentes na comunidade e qual a sua abundância. Para isso, a diversidade é inferida através da amplificação do gene de 16S rRNA pela técnica de

PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Os “amplicons” resultantes são submetidos ao sequenciamento e os resultados comparados com um banco de dados, possibilitando, assim, traçar um perfil taxonômico da comunidade microbiana, determinando quais micro-organismos estão presentes e qual sua abundância relativa (OULAS et al., 2015). Vale ressaltar que este tipo de sequenciamento engloba apenas bactérias e arqueias pois o RNA ribossomal 16S é um componente da pequena subunidade 30S dos ribossomos procarióticos.

Uma das características que tornam o 16S rRNA um bom marcador molecular é que além de estar presente em todos organismos celulares, sua estrutura e função são conservadas entre os diferentes táxons (OLSEN et al., 1986; WOESE, 1987).

O sequenciamento do gene de 16S revelou uma enorme diversidade microbiana na Terra (PACE, 1997; RAPPÉ; GIOVANNONI, 2003; LOZUPONE; KNIGHT, 2007) e tem sido utilizado para caracterizar a biodiversidade dos micróbios de uma grande variedade de ambientes, incluindo: intestino humano (MORGAN; HUTTENHOWER, 2012; YATSUNENKO et al., 2012), raízes de *Arabidopsis thaliana* (LUNDBERG et al., 2012), aberturas térmicas oceânicas (MCCLIMENT et al., 2006), fontes termais (BOWEN DE LEÓN et al., 2013), solos minerais, como por exemplo do vulcão antártico (SOO et al., 2009), entre outros.

3.5.2 Shotgun

O sequenciamento de DNA metagenômico total ou “shotgun” é uma abordagem de sequenciamento de DNA ambiental relativamente nova e poderosa que fornece informações sobre a biodiversidade e a função da comunidade (SHARPTON, 2014). Nesta técnica, o DNA total da comunidade microbiana é extraído e sequenciado, sem a necessidade de amplificação de genes. Após a extração, todo o DNA é fragmentado em pequenos fragmentos que são independentemente sequenciados. O resultado é analisado por abordagens de bioinformática onde é possível explorar simultaneamente dois aspectos da comunidade microbiana: quais micro-organismos estão lá (identificação taxonômica) e o que eles são capazes de fazer (análise funcional) (SHARPTON, 2014).

O primeiro trabalho utilizando esta abordagem foi publicado em 2004 e teve como local de estudo o mar de sargaço. Venter et al. (2004) foram os pioneiros a aplicar a tecnologia de pirosequenciamento diretamente em amostras ambientais. Desde então, o sequenciamento metagenômico tem sido utilizado para identificar novos vírus (YOZWIAK et al., 2012), caracterizar a diversidade genômica e a função de bactérias não cultivadas (WRIGHTON et al., 2012), revelar novas proteínas com funções ecológicas importantes (GODZIK, 2011), identificar táxons e caminhos metabólicos que diferenciam a microbiota intestinal associada a humanos saudáveis e doentes (MORGAN; HUTTENHOWER, 2012), entre outros. A análise dos metagenomas também tem sido usada para caracterizar a microbiota de plantas, especialmente aquelas associadas com raízes e folhas (BULGARELLI et al., 2013).

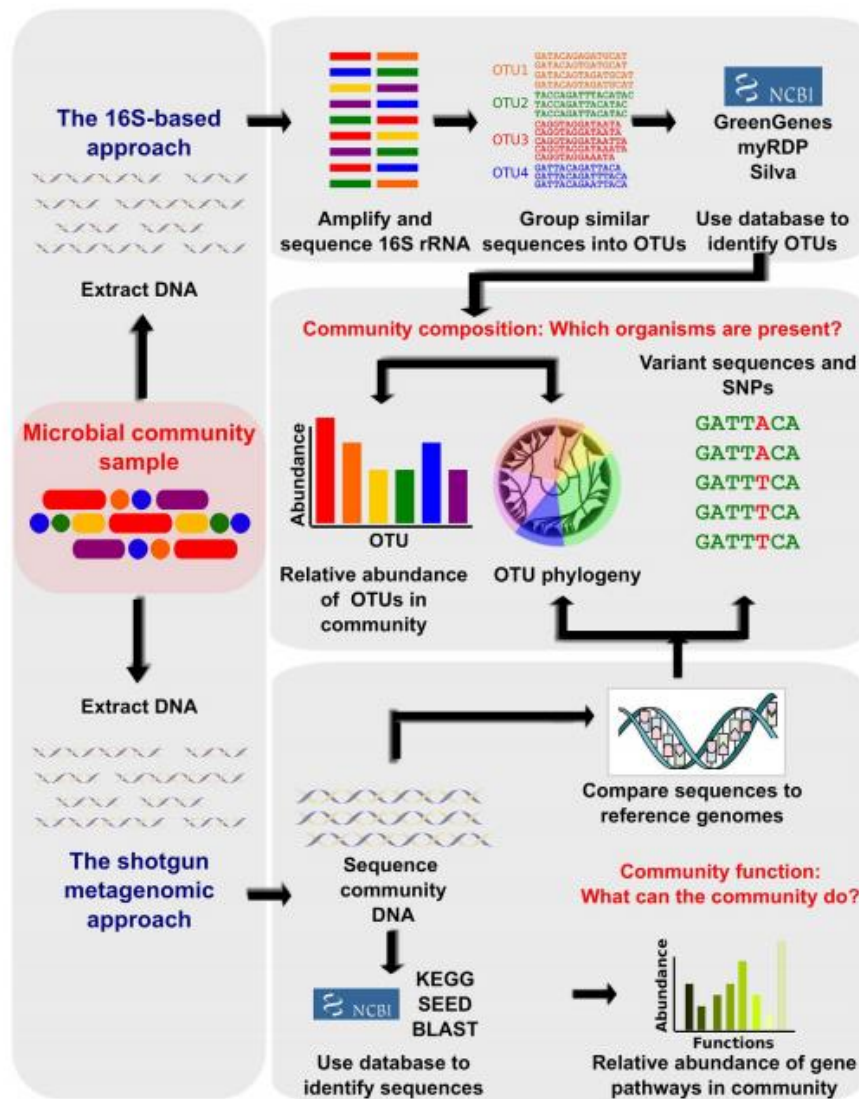


Figura 3. Métodos de análises metagenômicas (MORGAN; HUTTENHOWER, 2012).

4. Referências

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 143–69, 1995.

ANJOS, C.; MAGALHÃES, M. C. F.; ABREU, M. M. Metal (Al, Mn, Pb and Zn) soils extractable reagents for available fraction assessment: Comparison using plants, and dry and moist soils from the Braçal abandoned lead mine area, Portugal. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 113, p. 45–55, 2012.

AZEVEDO, U. R.; MACHADO, M. M. M.; CASTRO, P. T. A.; RENGER, E. F.; TREVISOL, A.; BEATO, D. A. C. Geoparque Quadrilátero Ferrífero (MG). **Geoparques do Brasil / Propostas**, v. 1, p. 183–220, 2012.

BOCCAMINO, G. D. **Desenvolvimento de geometria para empilhamento de rejeito desaguados de minério de ferro**. 2017. 110 f. Dissertação (Mestrado em Geotecnia) - Escola de Minas. Núcleo de Geotecnia Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

BOWEN DE LEÓN, K.; GERLACH, R.; PEYTON, B. M.; FIELDS, M. W. Archaeal and bacterial communities in three alkaline hot springs in Heart Lake Geyser Basin, Yellowstone National Park. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 330, 2013.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 807–838, 2013.

CARVALHO, P. S. L. de; SILVA, M. M. da; ROCIO, M. A. R.; MOSZKOWICZ, J. Minério de ferro. **Biblioteca Digital-BNDS**, p. 197–234, 2014.

COSTA, C. M. R. **Biodiversidade em Minas Gerais- Um atlas para sua conservação**. 1. ed. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1998.

COSTA, P. S.; REIS, M. P.; ÁVILA, M. P.; LEITE, L. R.; DE, F. M. G.; SALIM, A. C. M.; OLIVEIRA, G.; BARBOSA, F.; CHARTONE-, E. Metagenome of a microbial community inhabiting a metal-rich tropical stream sediment. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–21, 2015.

D'AGOSTINO, L. F. **Praias de barragens de rejeitos de mineração: características e análise de sedimentação**. 2008. 374 p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Escola Politécnica - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GARLAND, J. L.; MILLS, A. L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2351–2359, 1991.

GAVRILESCU, M. Environmental biotechnology : achievements , opportunities and challenges. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 4, p. 1–36, 2010.

GILBERT, J. A.; DUPONT, C. L. Microbial metagenomics : beyond the genome. **Annual Review of Marine Science**, v. 3, p. 347-371, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142811>>.

GODZIK, A. Metagenomics and the protein universe. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 21, n. 3, p. 398–403, 2011.

GONÇALVES, L. V. **Qualidade Da Água Em Lagos De Mineração - Estudos De Caso : Águas Claras E Riacho Dos Machados**. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Área Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.

HAHN, M. W. The microbial diversity of inland waters. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 256–261, 2006.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & biology**, v. 5, n. 10, p. R245-9, 1998.

HONG, C.; SI, Y.; XING, Y.; LI, Y. Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. **Environmental science and pollution research international**, v. 22, n. 14, p. 10788–10799, 2015.

INSAM, H. A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. In: **Microbial Communities**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 259–260, 1997.

JANNICHE, G. S.; SPLIID, H.; ALBRECHTSEN, H. J. Microbial community-level physiological profiles (CLPP) and herbicide mineralization potential in groundwater affected by agricultural land use. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 140–141, p. 45–55, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconhyd.2012.08.008>>.

KEMP, P. F.; ALLER, J. Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. **FEMS microbiology ecology**, v. 47, n. 2, p. 161–77, 1 fev. 2004.

LIMA, A.; GARCIA, E. Gestão de águas subterrâneas em ambientes insulares: caso de estudo da ilha do Maio (Cabo Verde). **VI Congresso Planejamento e Gestão das Zonas Costeiras**, 2011.

LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. Global patterns in bacterial diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 27, p. 11436–40, 2007.

LUNDBERG, D. S.; LEBEIS, S. L.; PAREDES, S. H.; YOURSTONE, S.; GEHRING, J.; MALFATTI, S.; TREMBLAY, J.; ENGELBREKTSON, A.; KUNIN, V.; DEL RIO, T. G.; EDGAR, R. C.; EICKHORST, T.; LEY, R. E.; HUGENHOLTZ, P.; TRINGE, S. G.; DANGL, J. L. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 86–90, 2012.

MCCLIMENT, E. A.; VOGLESONGER, K. M.; O'DAY, P. A.; DUNN, E. E.; HOLLOWAY, J. R.; CARY, S. C. Colonization of nascent, deep-sea hydrothermal vents by a novel Archaeal and Nanoarchaeal assemblage. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 114–125, 2006.

MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. **PLOS Computational Biology**, v. 8, n. 12, 2012.

OLSEN, G. J.; LANE, D. J.; GIOVANNONI, S. J.; PACE, N. R.; STAHL, D. A. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 337–365, 1986.

OULAS, A.; PAVLOUDI, C.; POLYMENAKOU, P.; PAVLOPOULOS, G. A.; PAPANIKOLAOU, N.; KOTOULAS, G.; ARVANITIDIS, C.; ILIOPOULOS, Ioannis. Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 9, 2015.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5313, p. 734–40, 1997.

PIERCE, M. L.; WARD, J. E.; DOBBS, F. C. False positives in Biolog EcoPlatesTM and MT2 MicroPlatesTM caused by calcium. **Journal of Microbiological Methods**, v. 97, n. 1, p. 20–24, 2014.

QUARESMA, L. F. **Ferro e Aço**. Sumário Mineral, 2002.

RAMOS, T. C. D. A. D. A. **Identificação e caracterização genética para prospecção do potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de solos do Quadrilátero Ferrífero – Mg.** 2016. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Sete Lagoas - MG, Sete Lagoas, 2016.

RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The Uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 369–394, 2003.

RODRÍGUEZ, L.; RUIZ, E.; ALONSO-AZCÁRATE, J.; RINCÓN, J. Heavy metal distribution and chemical speciation in tailings and soils around a Pb–Zn mine in Spain. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 2, p. 1106–1116, 2009.

RUCHKYS, Ú. A.; MACHADO, M. M. M. Patrimônio geológico e mineiro do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais - Caracterização e iniciativas de uso para educação e geoturismo. **Boletim Paranaense de Geociências**, v. 70, n. 70, p. 120–136, 2013.

SHARPTON, T. J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 209, 2014.

SOO, R. M.; WOOD, S. A.; GRZYMSKI, J. J.; MCDONALD, I. R.; CARY, S. C. Microbial biodiversity of thermophilic communities in hot mineral soils of Tramway Ridge, Mount Erebus, Antarctica. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 715–728, 2009.

STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 492–498, 2004.

THEY, N. H.; FERREIRA, L. M. H.; MARINS, L. F.; ABREU, P. C. Stability of bacterial composition and activity in different salinity waters in the dynamic patos lagoon estuary: evidence from a lagrangian-like approach. **Microbial Ecology**, v. 66, n. 3, p. 551–562, 2013.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1064–1066, 2002.

VARAJAO, C. A. C. a Questão da correlação das superfícies de erosão do quadrilátero ferrífero , Minas Gerais. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 21, n. 2, p. 138–145, 1991.

VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J. F.; HALPERN, A. L.; RUSCH, D.; EISEN, J. A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K. E.; NELSON, W.; FOUTS, D. E.; LEVY, S.; KNAP, A. H.; LOMAS, M. W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKUCH, C.; ROGERS, Y.-H.; SMITH, H. O. Environmental genome shotgun sequencing of the sargasso sea. **Science**, v. 304, n. 5667, p. 66–74, 2004.

Woese, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WRIGHTON, K. C.; THOMAS, B. C.; SHARON, I.; MILLER, C. S.; CASTELLE, C. J.; VERBERKMOES, N. C.; WILKINS, M. J.; HETTICH, R. L.; LIPTON, M. S.; WILLIAMS, K. H.; LONG, P. E.; BANFIELD, J. F. Fermentation, Hydrogen, and Sulfur Metabolism in Multiple Uncultivated Bacterial Phyla. **Science**, v. 337, n. 6102, p. 1661–1665, 2012.

YATSUNENKO, T.; REY, F. E.; MANARY, M. J.; TREHAN, I.; DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; BALDASSANO, R. N.; ANOKHIN, A. P.; HEATH, A. C.; WARNER, B.; REEDER, J.; KUCZYNSKI, J.; CAPORASO, J. G.; LOZUPONE, C. A.; LAUBER, C.; CLEMENTE, J. C.; KNIGHTS, D.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222–7, 2012.

YOZWIAK, N. L.; SKEWES-COX, P.; STENGLEIN, M. D.; BALMASEDA, A.; HARRIS, E.; DERISI, J. L. Virus identification in unknown tropical Febrile illness cases using deep sequencing. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1485, 2012.

ZEHR, J. P. Microbes in Earth's Aqueous Environments. **Frontiers in microbiology**, v. 1, p. 4, 2010.

CAPÍTULO 2 – Diversidade taxonômica e funcional de bactérias em águas residuais de mineração

RESUMO - O impacto causado pela atividade mineradora tem sido objeto de pesquisas nos últimos anos, mas poucos estudos têm se centrado sobre o potencial ecológico da microbiota aquática na mineração de ferro apesar de seu impacto ambiental específico. Neste estudo identificamos a taxonomia e capacidade funcional de comunidades microbianas em amostras de água coletadas de uma Cava de mineração e uma Lagoa de rejeitos de uma região anteriormente utilizada para extração de minério de ferro no Centro de Biodiversidade (CeBio) da empresa VALE/SA, em Sabará/MG. O sequenciamento do gene de 16S rRNA realizado na plataforma Ion PGM™ revelou que o filo Proteobacteria (24%) foi o mais abundante na água da Cava e o filo Cyanobacteria (17%) na água da Lagoa, a qual apresentou maiores índices de diversidade e riqueza quando comparada com a água da Cava. Análises do potencial funcional e do perfil de atividade metabólica indicaram um excelente desempenho quanto à degradação de diferentes compostos, apresentando enriquecimento de subsistemas importantes para ambas as amostras, como o subsistema relacionado a processos celulares e processamento de informação ambiental para a água da Cava e subsistemas relacionados a atividades do metabolismo e processamento de informação genética para a água da Lagoa. Além disso, o isolamento com métodos tradicionais de cultivo mostrou que algumas bactérias apresentam capacidade em produzir algumas enzimas com aplicação biotecnológica. Nossos dados revelaram uma microbiota bem adaptada ao estresse do ambiente que está em processo de recuperação da atividade mineradora e contribuem para ampliar o conhecimento atual da composição taxonômica e funcional de micro-organismos de ambientes aquáticos impactados.

Palavras - chave: actinobacteria, biolog ecoplate, diversidade bacteriana, proteobacteria.

1. Introdução

As atividades de mineração afetam negativamente a qualidade da água e do solo em seu entorno (HONG et al., 2015). O relacionamento entre a mineração de ferro e as comunidades microbianas em águas utilizadas pela indústria para disposição de rejeitos é pouco conhecido apesar de existir grande quantidade de lagoas e barragens de água residuais de mineração no Brasil. Somente em Minas Gerais, existem cadastradas no Banco de Dados Ambiental (BDA) 741 barragens; do total, 454 barragens são relacionadas às atividades mineradoras, e estima-se que 1/3, cerca de 150 barramentos, são para a contenção de rejeitos (FEAM, 2013; BOCCAMINO, 2017).

A intervenção causada ao meio ambiente pela mineração e a disposição de rejeitos em lagoas é uma das causas dos ecossistemas de água doce estarem entre os mais degradados do planeta, tendo sofrido perdas proporcionalmente maiores de espécies e de hábitat que quaisquer outros ecossistemas terrestres ou marinhos (REVENGA, 2000). Deste modo, a diversidade e o metabolismo de comunidades microbianas presentes em tais ambientes podem fornecer informações úteis sobre mudanças ambientais, já que os micro-organismos normalmente são os primeiros organismos a serem influenciados por alterações químicas e físicas (CHÁVEZ et al., 2011).

Uma estratégia poderosa para avaliar a diversidade microbiana em águas residuais de mineração é a abordagem metagenômica. O sequenciamento do gene 16S rRNA permite identificar o conjunto de microrganismos que vivem em tal ambiente e em conjunto com outras técnicas, como o Biolog Ecoplate, fornece informações sobre as potenciais interações das comunidades microbianas com o meio ambiente.

Nas águas residuais de áreas de mineração, encontra-se uma diversidade enorme de micro-organismos com muitos sistemas biológicos complexos. A atividade desses, associada à degradação de diversos compostos, está relacionada com a minimização da poluição ambiental. A biodegradação realiza-se através do aproveitamento dos contaminantes, principalmente como fonte de carbono, o que permite aos micro-organismos biorremediadores seu uso na divisão em novas células, a síntese de moléculas vitais e a obtenção de elétrons para a produção de energia.

Neste estudo, utilizamos o sequenciamento do gene de 16SrRNA juntamente com o isolamento tradicional de bactérias e a ferramenta Biolog Ecoplate para estudar a diversidade taxonômica e funcional dos micro-organismos presentes em águas residuais de mineração.

2. Material e Métodos

As etapas das atividades desenvolvidas neste estudo estão resumidas no fluxograma abaixo (Figura 1).

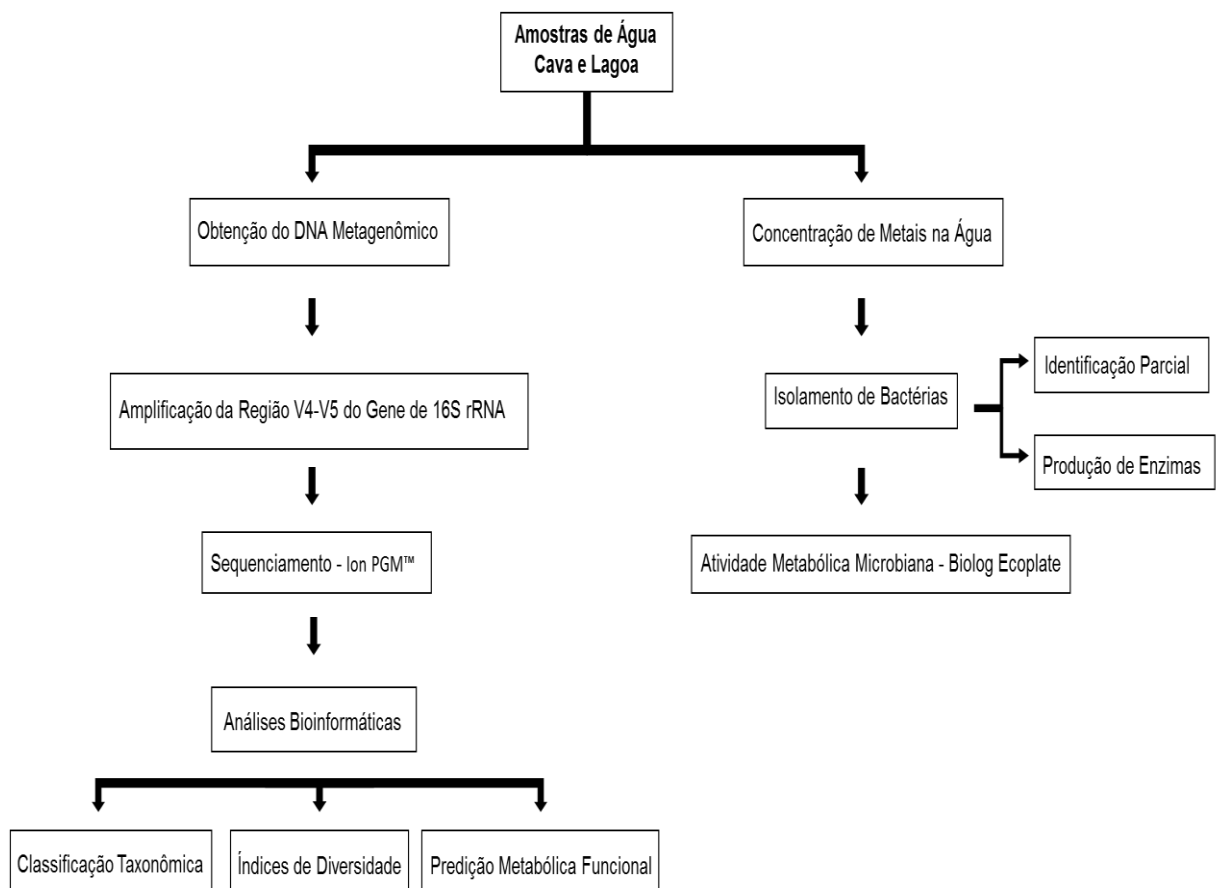


Figura 1. Fluxograma das atividades desenvolvidas.

2.1 Coleta das amostras

As amostras da água da Cava de mineração e da Lagoa de rejeitos (Figura 2 e Figura 3) foram coletadas no dia 13 de setembro de 2013, em uma região utilizada para extração de minério de ferro no Centro de Biodiversidade (CeBio) da empresa VALE/AS em Sabará/MG Brasil, nas seguintes coordenadas geográficas: Lagoa: 19°51'29.02"S / 43°48'16.03"O e Cava: 19°51'41.34"S / 43°47'25.39"O. A coleta foi realizada em triplicata com o auxílio da garrafa de Van Dorn e as amostras armazenadas em recipientes previamente esterilizados de 500 ml. Na Cava de mineração a coleta foi realizada em um único ponto, em 3 profundidades: superfície, 6m e 12 m, chegando ao fundo. Na Lagoa, as amostras foram retiradas de 3 diferentes pontos equidistantes entre si na superfície, próximo à margem.



Figura 2. Cava de mineração do Centro de Biodiversidade (CeBio) da empresa VALE/SA, em Sabará/MG, Brasil.



Figura 3. Lagoa de rejeitos do Centro de Biodiversidade (CeBio) da empresa VALE/SA, em Sabará/MG, Brasil.

2.2 Análise da concentração de metais na água

Para realizar a determinação dos metais, foi feito um “pool” com as triplicatas de cada amostra de água, Cava e Lagoa. A análise do teor de metais na amostra de água foi feita em um espectrômetro de absorção atômica modelo AAnalyst800 (PerkinElmer), utilizando um atomizador de forno de grafite. Os metais analisados foram: Mn, Fe, Zn, Cu, Cr, Pb, Ni, Cd, Al, As e Hg.

2.3 Isolamento de bactérias

Para o isolamento das bactérias foi utilizado o “pool” das triplicatas das 2 amostras de água, Cava e Lagoa. O isolamento foi realizado através de diluições seriadas até 10^{-4} , sendo transferido 100 μ l de cada diluição em placas de Petri contendo meio sólido (K_2HPO_4 0.5g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L; NaCl 0.1g/L; Extrato de levedura 1g/L; Glicose 10g/L; Agar 9g/L; pH 6.8) com Cicloheximida (inibidor da síntese proteica em eucariotas) para a garantia de crescimento apenas de bactérias. Após 120 horas, as colônias com aparência morfológicas diferentes foram coletadas e cultivadas em tubos SIGMA contendo 5mL de meio líquido (K_2HPO_4 0.5g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L; NaCl 0.1g/L; Extrato de levedura 1g/L; Glicose 10g/L; pH 6.8) em agitador orbital por 24 horas, a 30°C e agitação de 200 xg.

Em seguida, 100 μ l do cultivo foi adicionado novamente em placas de Petri para avaliação de sua pureza por observação morfológica. Após o cultivo por 48 horas a 30°C, foi realizado o estoque das bactérias obtidas, em tubos tipo Eppendorf contendo 20% de glicerol. Os tubos com os estoques bacterianos foram armazenados em ultra-freezer -80°C.

2.4 Identificação das bactérias isoladas por sequenciamento do gene de 16S rRNA

Os isolados foram cultivados em meio líquido (K_2HPO_4 0.5g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L; NaCl 0.1g/L; Extrato de levedura 1g/L; Glicose 10g/L; pH 6.8) durante 48 horas, sob agitação de 100 xg, 28°C. A suspensão bacteriana foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o precipitado foi utilizado para a extração de DNA genômico (MARMUR, 1961). A extração do DNA genômico dos isolados foi realizada segundo Marmur (1961) e o gene de 16S rRNA foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o oligonucleotídeo iniciador fD1, que faz parte do conjunto de “primers” universal fD1 / rD1 (WEISBURG et al., 1991)

As reações de PCR continham 20 mM de Tris-HCl; 1,5 mM de $MgCl_2$; 5 pMol do primer; 1,25 U de Taq polimerase e 40 ng/ μ l de DNA. A reação de PCR foi conduzida em termociclador, sendo o primeiro ciclo de desnaturação a 95°C durante 1 minuto, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 2 minutos, 36°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto, seguido de uma extensão final por 5 minutos a 72°C.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega Corporation” e os “amplicons” usados para as reações de sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI 3700 (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos foram analisadas com o banco Ribosomal Database Project (RDPII) utilizando a ferramenta Classifier (WANG et al., 2007).

2.5 Avaliação da produção de enzimas pelos isolados bacterianos

A avaliação da produção de celulase, amilase, protease, lipase e enzimas solubilizadoras de fosfato foi realizada pelo cultivo dos isolados em meios específicos.

A avaliação da produção de celulasas foi feita através do cultivo em meio sólido BHB (BUSHNELL; HAAS, 1940) contendo carboximetilcelulose (0,5%), por cinco dias.

Após o cultivo, a detecção da enzima foi avaliada pela coloração das placas com vermelho congo a 0,1% em água (TEATHER; WOOD, 1982).

A produção de amilase foi verificada utilizando-se meio amido-ágar e coloração com lugol (SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008). Proteases foram identificadas através do cultivo em meio sólido “Yeast Malt Agar – YMA” (VINCENT, 1970), suplementado com leite desnatado (SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008). As lipases foram avaliadas pelo cultivo dos isolados em meio sólido contendo azeite de oliva segundo Sierra, 1957. Para verificar a produção de enzimas solubilizadoras do fosfato de cálcio insolúvel utilizou-se o meio NBRIP descrito por Nautiyal (1999).

Todas as placas foram inoculadas com 25µL de suspensão bacteriana. Os meios foram incubados em estufa tipo BOD a 30°C, durante 5 dias. A produção das enzimas foi avaliada pela formação de halo específico ao redor das bactérias cultivadas.

2.6 Avaliação da diversidade metabólica da população microbiana das amostras de água

A determinação do perfil metabólico das comunidades microbianas foi avaliada inoculando alíquotas de 120 µl das amostras de água nas cavidades das microplacas de Biolog Ecoplate (Biolog, Inc, Harward, CA, USA). Cada microplaca contém 31 fontes de carbono, em triplicata, e 1 cavidade sem fonte de carbono (controle negativo), além de corante indicador tetrazólio violeta (URAKAWA et al., 2013). As placas foram mantidas a 28°C em estufa tipo B.O.D e o consumo de cada substrato foi avaliado pelo desenvolvimento da absorbância por espectrofotometria a 590 nm, a cada 24 horas durante 4 dias.

A capacidade de utilizar uma fonte de C foi calculada conforme Ibekwe e Kennedy (1998) pela avaliação do potencial de redução do corante tetrazólio. Os valores de absorbância foram subtraídos do branco e normalizados segundo Weber et al. (2007), e em seguida foi calculada a mediana dos valores das leituras dos diferentes tempos, pois enzimas apresentam diferentes cinéticas quanto à degradação de substratos.

Os índices de desenvolvimento médio de cor (AWCD), diversidade de Shannon e riqueza de substrato foram realizados por análises estatísticas, tais como análise de variância ANOVA e teste de Tukey da diferença honestamente significativa (0,05%). A análise de agrupamento “heatmap” foi utilizada para avaliar os substratos que foram mais utilizados em cada amostra. Todas as análises foram realizadas com o software R, versão 3.1. Além destas análises também foi realizada a análise dos componentes principais (PCA) da mediana dos valores de absorbância dos diferentes tempos. Esta análise foi expressa graficamente em um plano bidimensional que possibilita observar as associações entre as duas amostras.

2.7 Extração e quantificação do DNA metagenômico

Para a extração do DNA metagenômico 1,5 L de cada amostra de água foi filtrada a vácuo em membranas de 0,45 μm estéreis Millipore Express®. Após a filtragem, cada membrana foi separadamente submetida à extração do DNA total das bactérias utilizando o kit Power Water DNA Isolation (Mo Bio®), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de DNA extraídas totalizaram 18 amostras, sendo 3 amostras para cada ponto de coleta.

Em seguida o DNA metagenômico foi submetido a uma eletroforese realizada em uma cuba Max Cell EC 360M- (Loccus), conduzida em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3), em gel de agarose 0.8% acrescido de brometo de etídio (0,5 mg/mL) durante aproximadamente 2 h, à voltagem constante de 90V. O perfil eletroforético foi visualizado sob luz UV e documentado através de um sistema de documentação de géis GEL DOC Universal Hood II (BIO-RAD). Para quantificar o DNA, foi utilizado o aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) com o kit Qubit™ DNA HS Assay Kit (Invitrogen®) seguindo-se as recomendações do fabricante.

2.8 Amplificação da região V4-V5 do gene de 16S rRNA

O gene 16S rRNA foi amplificado utilizando oligonucleotídeos iniciadores descrito por Quince et al. (2011). Estes oligonucleotídeos compreendem a região V4-V5 do gene, contendo em torno de 400-500pb.

A PCR foi realizada em um volume final de 20 µl contendo: enzima KAPA HIFI Hot Start (ReadyMix PCR Kit), 10 µM de cada primer, 0,001 µg/ µl de BSA e água deionizada ultra pura para completar o volume final da reação. A reação de amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), sendo 3 minutos a 95°C, seguido por 30 segundos a 95 ° C, 1 minuto e 30 segundos a 55°C, 45 segundos a 72°C por 35 ciclos, e em seguida 5 minutos a 72°C.

Após a amplificação o produto de PCR foi purificado utilizando o Kit DNA Clean and Concentrator (Promega), seguindo as instruções do fabricante. A pureza e qualidade das amostras a serem sequenciadas foram verificadas no Agilent 2100 Bioanalyser.

2.9 Sequenciamento da região V4-V5 do gene de 16S rRNA

Após a PCR e purificação das amostras da Cava e da Lagoa, as bibliotecas da região V4-V5 do gene 16S rRNA foram construídas utilizando-se o Prepare Amplicon Library without Fragmentation utilizando o kit Ion Plus Fragment Library, seguindo-se as recomendações do fabricante.

O sequenciamento da região V4-V5 do gene 16S rRNA foi realizado na plataforma Ion PGM™ (Personal Genome Machine) da Thermo Fisher Scientific, utilizando-se o chip 318, e os kits Ion PGM Template OT2 400 (Life Technologies) e o Ion PGM Sequencing 400 (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante.

2.10 Análises bioinformáticas

A qualidade das sequências da região V4-V5 do gene 16S rRNA obtidas foi avaliada utilizando a ferramenta FastQC V.0.10 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Os resultados da análise do FastQC foram visualizados em arquivo HTML, onde observou-se estatísticas básicas das sequências, como o número e o tamanho dos “reads” gerados, valores e índices de qualidade, além do conteúdo GC e níveis de duplicação das sequências.

As sequências de baixa qualidade (PHRED 20) foram removidas utilizando Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Após a análise de tratamento, as sequências foram submetidas ao programa Qiime 1.8.0 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (CAPORASO et al., 2010), seguindo o protocolo SOP (procedimento de operação padrão) onde são realizadas análises para a retirada de possíveis quimeras, geração das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) e classificação taxonômica utilizando uma base de dados de referência. Este conjunto de sequências foi alinhado utilizando como referência o banco de dados Greengenes para os genes 16S rRNA de bactéria (DESANTIS et al., 2006). Em seguida, foi verificada e selecionada a região do alinhamento (V4-V5) onde pelo menos 97% das sequências deveriam apresentar sobreposição. Os dados foram normalizados tomando como base no menor grupo, o grupo CS3, que apresentou a menor quantidade de sequências (11.143), filtrando a matriz de distância de 0,03 entre as sequências (3% de diferença).

As análises estatísticas foram realizadas com SHAMAM (SHiny application for Metagenomic ANalysis), (shaman.c3bi.pasteur.fr) com base no software R v3.1.1 e no pacote Bioconductor v2.14 (GENTLEMAN et al., 2004). A matriz das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) foi normalizada no nível UTOs utilizando o método de normalização incluído no pacote DESeq2 R v1.4.5, descrito por Anders e Huber (2010) e sugerido por Mcmurdie e Holmes (2014). As contagens normalizadas foram então somadas para aumentar o poder da análise estatística. O modelo linear generalizado (GLM) implementado no pacote DESeq2 R v1.4.5 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) foi aplicado para detectar as diferenças na abundância entre os filos

e famílias para o grupo de amostras de água da Cava e Lagoa. Os “p-values” foram ajustados de acordo com Benjamini e Hochberg (1995).

A análise das coordenadas principais (PCoA) foi realizada com ade4 R v1.7.2 e o gráfico foi gerado com ggplot2 v1.0.1.

2.11 Predição metabólica funcional

Para a predição funcional e análise comparativa as UTOs geradas através do programa QIIME versão 1.8.0. As informações dos táxons foram utilizadas como entradas para o software PICRUST versão 1.1.0 (LANGILLE et al., 2013). Assim, foram geradas tabelas no formato BIOM contendo as predições funcionais das amostras da Cava e Lagoa por meio de associações do gene marcador 16S rRNA com os níveis categorizados de acordo com o banco de dados KEGG (KANEHISA et al., 2016)

O software STAMP v 2.1.3 (“Statistical Analysis of Metagenomic Profiles”) (PARKS et al., 2014) foi utilizado para determinar as diferenças de composição funcional, estatisticamente significativas, entre as duas amostras Cava e Lagoa. Para isso, foi utilizado o teste estatístico welch's t-test com o método FDR de Benjamini-Hochberg para correção de testes múltiplos e filtragem por q-value < 0,05.

3. Resultados

3.1 Avaliação da água quanto a concentração de metais e pH

Foi identificada a presença de 5 diferentes metais na água da Cava: Alumínio, Cobre, Ferro, Manganês e Níquel, enquanto na amostra de água da Lagoa detectou-se apenas o Alumínio e o Ferro. A Tabela 1 mostra que as concentrações do Manganês e Níquel na água da Cava excederam o máximo permitido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA para água doce de classes 1 e 2 (resolução 357/2005). O Ferro, Cobre e Alumínio, apesar de detectados, não possuem limites para a forma total estabelecidos pela CONAMA 357/05. O pH da água foi caracterizado como ácido para Cava (pH = 5,5) e neutro (pH=7,2) para a Lagoa.

Tabela 1. Concentração de metal na água da Cava e da Lagoa.

Metais (Total)	Cava (mg L ⁻¹)	Lagoa (mg L ⁻¹)	CONAMA
			Resolução 375/2005 (mg L ⁻¹)
Al	0,01±0,00	0,03±0,00	0,3 (Al dissolvido)
As	0	0	0,01
Cd	0	0	0,001
Cr	0	0	0,05
Cu	0,83±1,44	0	0,009 (Cu dissolvido)
Fe	55,83±7,94	4,33±0,57	0,3 (Fe dissolvido)
Hg	0	0	0,0002
Mn	1,17±0,28	0	0,1
Ni	0,17±0,28	0	0,025
Pb	0	0	0,01
Zn	0	0	0,18

3.2 Produção de enzimas e identificação parcial das bactérias isoladas

No isolamento foram obtidas 08 bactérias que, pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e comparação das sequências com o banco de dados RDP, ao nível de confiança de 80%, foram identificadas como membros do filo Proteobacteria. A grande maioria dos isolados, sendo eles nomeados como: C3, L3, L4, L5 e L6, pertencem à família Oxalobacteraceae e foram identificados como membros do gênero *Undibacterium*. Representantes da família Burkholderiaceae, os isolados C1 e C6 pertencem ao gênero *Ralstonia*, e o isolado L2, à família Comamonadaceae, pertencendo ao gênero *Curvibacter* (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação dos isolados da Cava e Lagoa baseado no banco de dados RDP.

Isolado	pb*	Filo	Família	Gênero
C1	1.169	Proteobacteria	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>
C3	1.323	Proteobacteria	Oxalobacteraceae	<i>Undibacterium</i>
C6	1.290	Proteobacteria	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>
L2	1.290	Proteobacteria	Comamonadaceae	<i>Curvibacter</i>
L3	1.252	Proteobacteria	Oxalobacteraceae	<i>Undibacterium</i>
L4	1.260	Proteobacteria	Oxalobacteraceae	<i>Undibacterium</i>
L5	1.260	Proteobacteria	Oxalobacteraceae	<i>Undibacterium</i>
L6	1.288	Proteobacteria	Oxalobacteraceae	<i>Undibacterium</i>

*Tamanho do fragmento sequenciado em pares de bases

Das bactérias obtidas, 3 isolados da Lagoa de rejeitos e 3 da Cava de mineração apresentaram capacidade de produzir diferentes enzimas em meio sólido, o que pode ser de grande interesse biotecnológico. Dentre as enzimas avaliadas, observou-se a produção de enzimas celulase, protease, lipase e enzimas solubilizadoras de fosfato. Nenhum dos isolados formou halo na presença de amido. Na Tabela 3 podemos observar os isolados que apresentaram atividades enzimáticas.

Tabela 3. Atividade enzimática dos isolados da Cava e Lagoa.

Isolados	Amilase	Protease	Lipase	Celulase	Solubilização de Fosfato
C1	-	-	-	-	+
C3	-	+	-	-	-
C6	-	-	+	-	+
L2	-	+	-	+	+
L3	-	-	-	-	-
L4	-	-	-	+	-
L5	-	-	-	-	-
L6	-	-	+	+	-

3.3 Capacidade funcional da população microbiana através da avaliação do metabolismo de carbono

O estudo do perfil metabólico das comunidades microbianas presentes em águas residuais de mineração empregando a técnica do Biolog Ecoplate visa identificar a capacidade funcional do conjunto de micro-organismos que vivem em tal ambiente. Os valores de AWDC observados na Figura 4 refletem a capacidade da utilização das diferentes fontes de carbono ao longo do tempo.

Este resultado evidenciou um aumento progressivo da atividade metabólica para a população da água da Lagoa, que a partir das primeiras 24 horas apresentou maior consumo das diferentes fontes de carbono, aumentando significativamente ao longo do tempo, enquanto que a população presente na água da Cava atingiu o máximo da utilização dos substratos com 48 horas, e após este período a atividade se tornou estável.

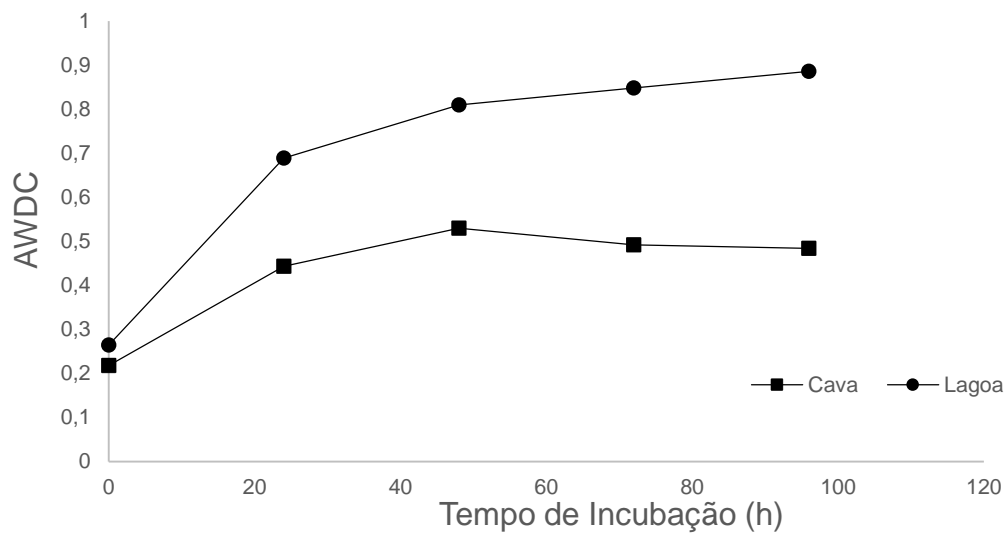


Figura 4. Índice de desenvolvimento médio da cor (AWDC) ao longo do tempo (96 horas) para Cava e Lagoa.

Os índices de diversidade de Shannon (E) e riqueza de substratos (R) foram calculados no tempo de incubação de 48 horas. O índice de Shannon para a Cava foi de 0,7159 e para a Lagoa foi de 0,7222, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 0,05%. Os valores médios dos índices obtidos para a amostra de água da Cava e da Lagoa não apresentam diferenças estatísticas significantes.

Os valores médios da riqueza de substratos para a amostra da Cava de mineração foi de 13,66 e para a Lagoa de rejeitos foi de 19,66. As médias desses tratamentos apresentaram diferenças significantes.

A Figura 5 nos mostra um agrupamento hierárquico com a mediana dos valores da absorvância para as diferentes fontes de carbono utilizadas no Biolog Ecoplate. Observamos que o grupo de substratos mais intensamente utilizados na amostra da água da Cava e Lagoa foram os carboidratos, seguidos dos aminoácidos e dos ácidos carboxílicos, sendo que os polímeros também obtiveram uma porcentagem significativa. Isso demonstra que há uma importante capacidade de consumo de diferentes fontes de carbono por ambas amostras. Por outro lado, o metabolismo de aminas-amidas se mostrou mais acentuado na população da Cava quando se compara com os dados da amostra da Lagoa.

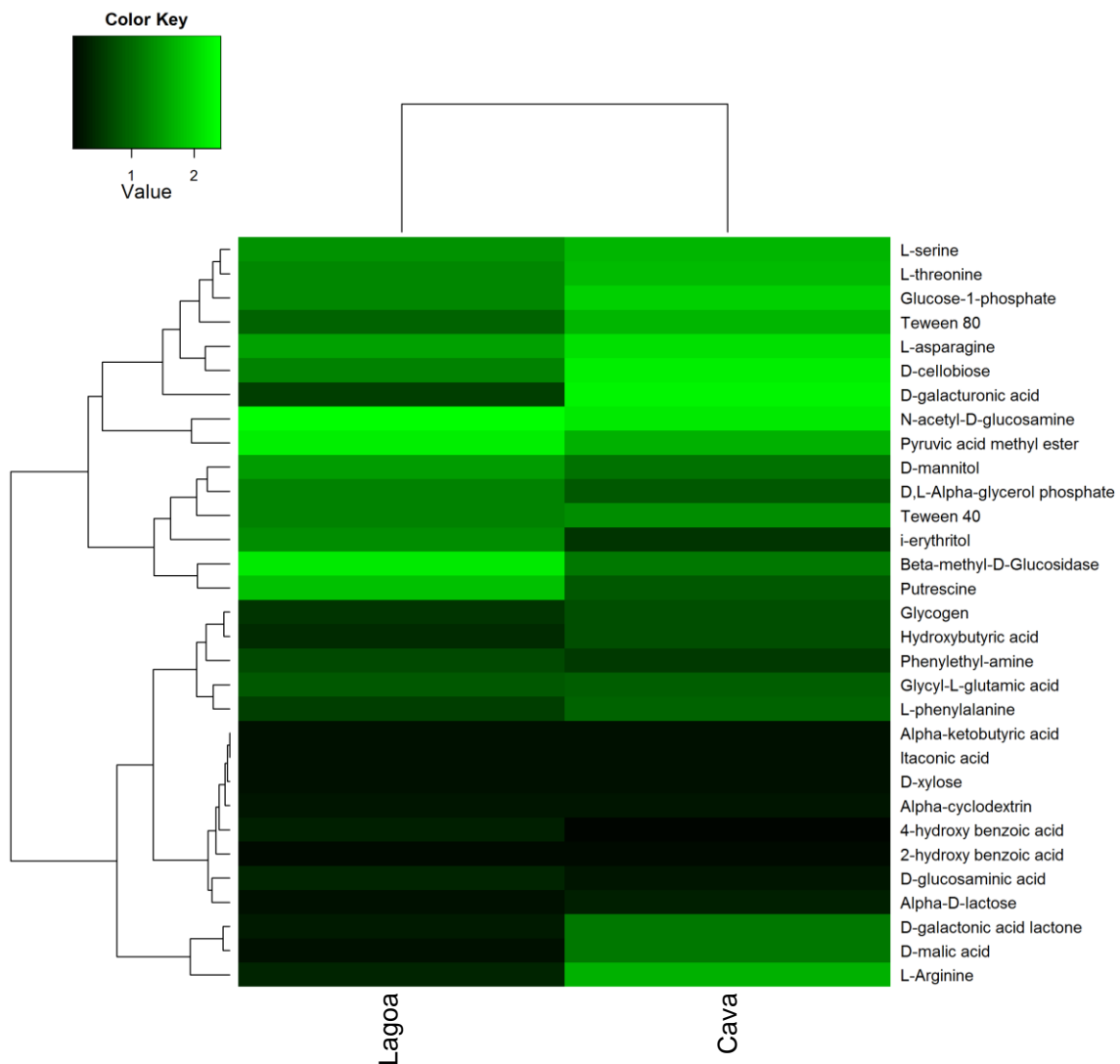


Figura 5. Heatmap mostrando o uso de diferentes fontes de carbono e a intensidade de degradação em escala colorimétrica, comparando os dois ambientes, Cava e Lagoa.

Para investigar como as amostras da água da Cava e Lagoa se correlacionam, foi realizada a partir das medianas dos valores de absorvância a análise de componentes principais (PCA). Esta análise é exibida em um plano bidimensional (Biplot) onde podemos identificar o comportamento das variáveis e observar as associações entre os pontos amostrais. Na Figura 6, observamos um primeiro componente principal (PC1) que explica 79,85% da variação dos perfis das comunidades e um PC2 que explica 20,14% do total da variância. As duas amostras apresentaram tendências para o consumo dos mesmos grupos de fonte de carbono,

como, por exemplo, os carboidratos, mas houve uma diferença onde observamos uma preferência da amostra da água da Lagoa para o consumo de aminoácidos como a L-serina, L-arginina, L-treonina e L-asparagina e a da amostra da água da Cava, para aminas-amidas, com maior consumo da Putrescina.

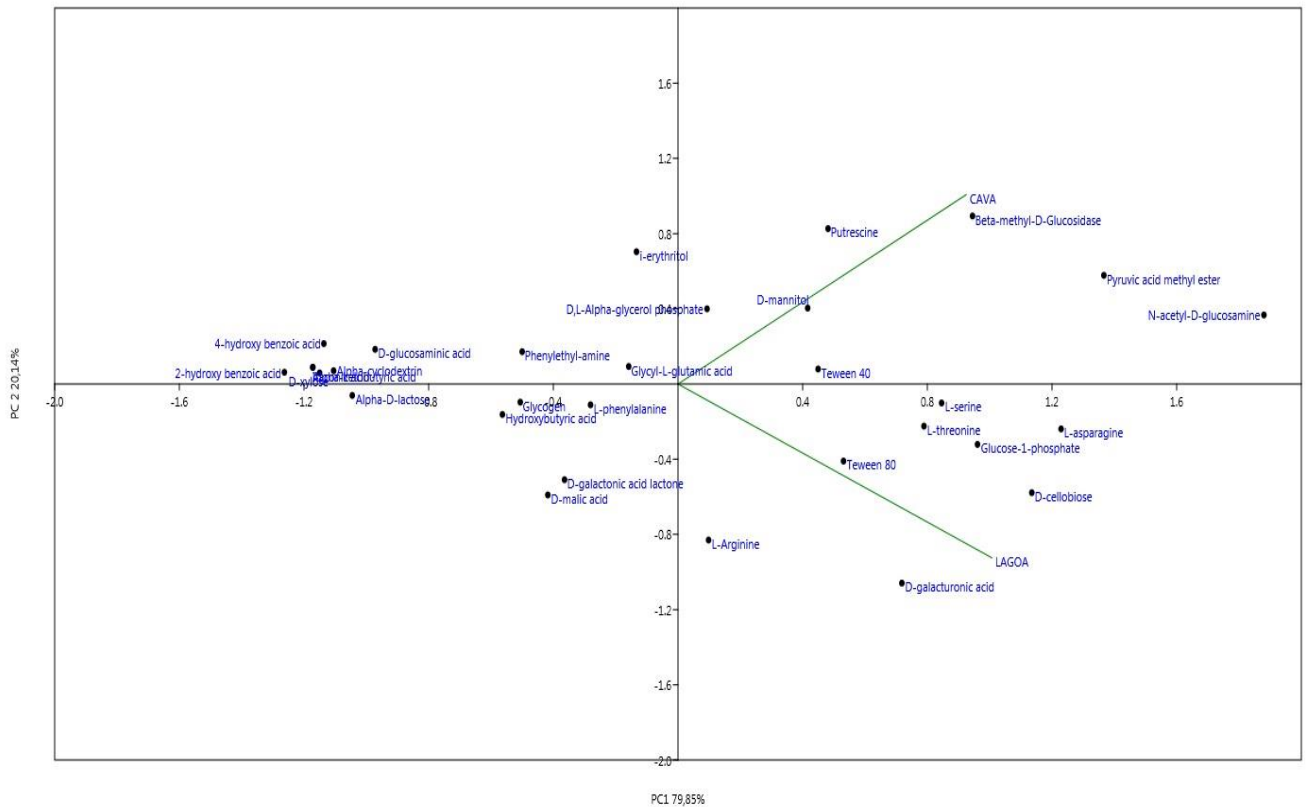


Figura 6. Análise de componentes principais (PCA) das amostras de água da Cava e Lagoa. Foram utilizadas as medianas dos valores de absorbância dos diferentes tempos de leitura.

3.4 Diversidade da comunidade bacteriana presente nas amostras da Cava e Lagoa avaliadas pelo sequenciamento do 16S rRna na plataforma Ion PGM™

O sequenciamento na plataforma Ion PGM™ Torrent do 16S rRNA das 9 amostras da Cava e das 9 amostras da Lagoa gerou um total de 3.433.255 reads, com

fragmentos variando entre 456 a 508 pb (pares de bases), contendo 905.177 de seqüências após a filtragem realizada com Trimmomatic.

Os valores de riqueza das UTOs das amostras da Cava e da Lagoa foram calculados através do programa QIIME 1.8.0 de acordo com o índice de Chao-1, esta análise revelou que a maior riqueza ou o maior número de contagem de UTOs foi apresentado na amostra da Lagoa (Figura 7).

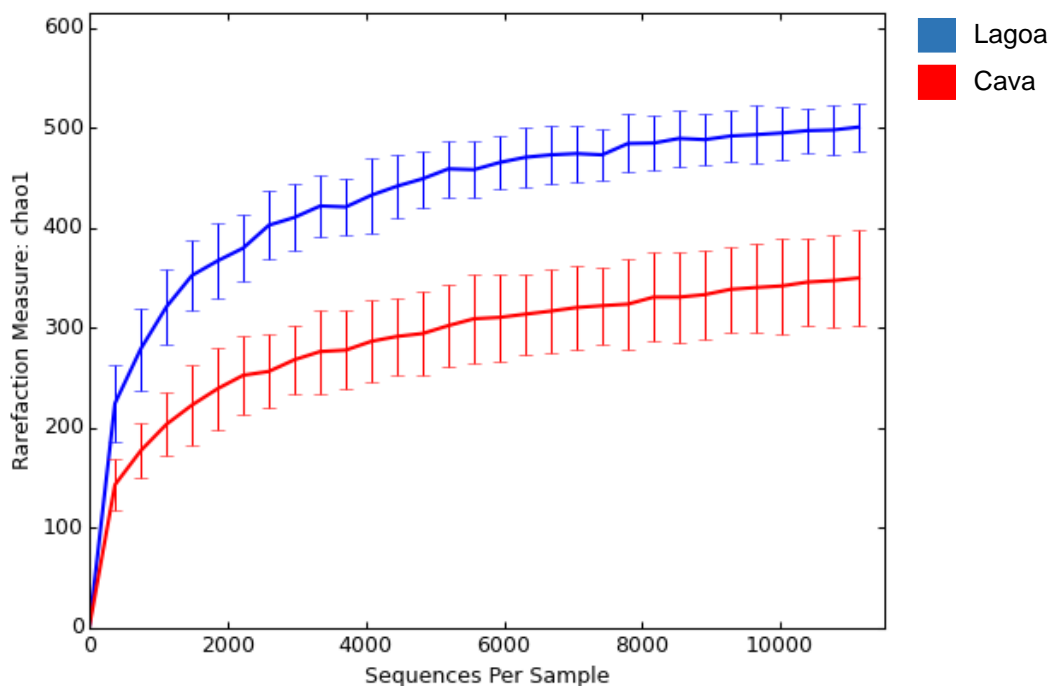


Figura 7. Curva de rarefação riqueza de UTOs dos dois grupos de amostras, Cava e Lagoa, estimados pelo índice Chao-1 através do programa QIIME, demonstrando maior riqueza de UTOs presentes na água da Lagoa.

O padrão da curva de rarefação observado na Figura 7 indica que a amostragem realizada foi suficiente para atingir grande parte do número de espécies total da comunidade e que o número de UTOs por seqüências amostradas foi em torno de 11.000.

Para comparação das amostras de água, foi utilizado a análise de coordenadas principais (PCoA) baseada na distância de Bray-Curtis para visualizar os agrupamentos e a dissimilaridade na composição procariótica das comunidades da

água da Cava e Lagoa. Esta análise revelou uma clara separação entre os dois grupos de bactérias (Figura 8).

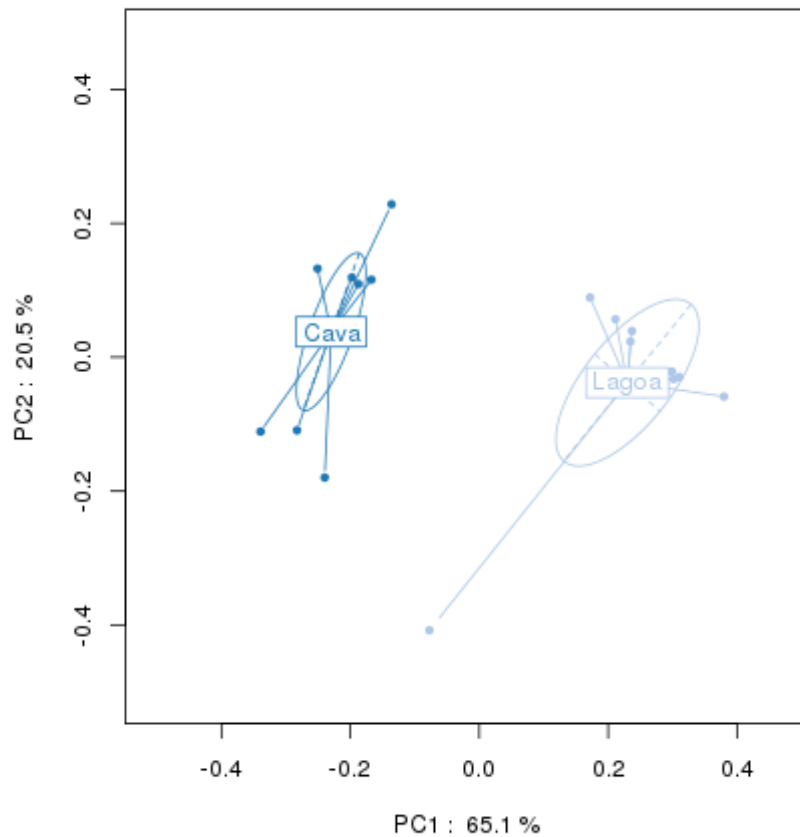


Figura 8. Análise de coordenadas principais (PCoA) das amostras de água da Cava e Lagoa baseada na distância de Bray-Curtis.

Alfa diversidade, índices de Shannon, Simpson e InvSimpson estão exibidas na Figura 9. Esta análise de riqueza e diversidade mostrou que a água da Lagoa possui maiores índices em relação à água da Cava, compatível com o observado na curva de rarefação. Apesar dos índices estarem abaixo aos de um ambiente natural, a diversidade e riqueza presente na água da Cava e Lagoa pode indicar uma grande quantidade de bactérias adaptadas ao estresse do ambiente que está em processo de recuperação da atividade mineradora.

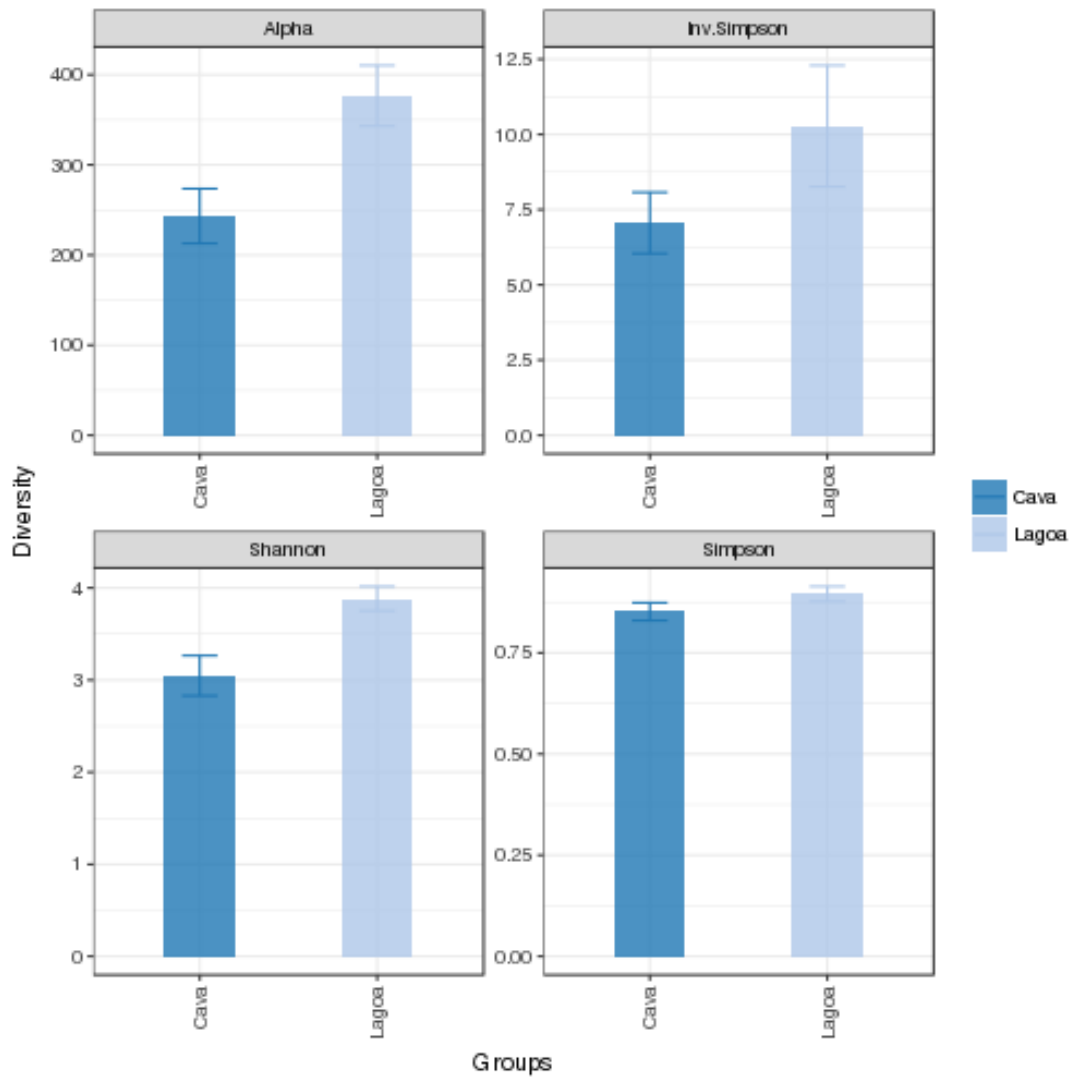


Figura 9. Índices de Alfa diversidade, Shannon, Simpson e InvSimpson para as amostras de água da Cava e Lagoa.

A análise das sequências geradas permitiu a classificação das bactérias com base na matriz de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) através do software QIIME com o banco de dados Greengenes. Os resultados mostraram 12 filós, com uma porcentagem de anotação de 100%. As comunidades mais predominantes na amostra da água da Cava pertencem aos filós Proteobacteria (49,2%) e Cyanobacteria (45,8%), e para a amostra da água da Lagoa foram atribuídas aos filós Cyanobacteria (34%) e Actinobacteria (33,5%) (Figura 10 A).

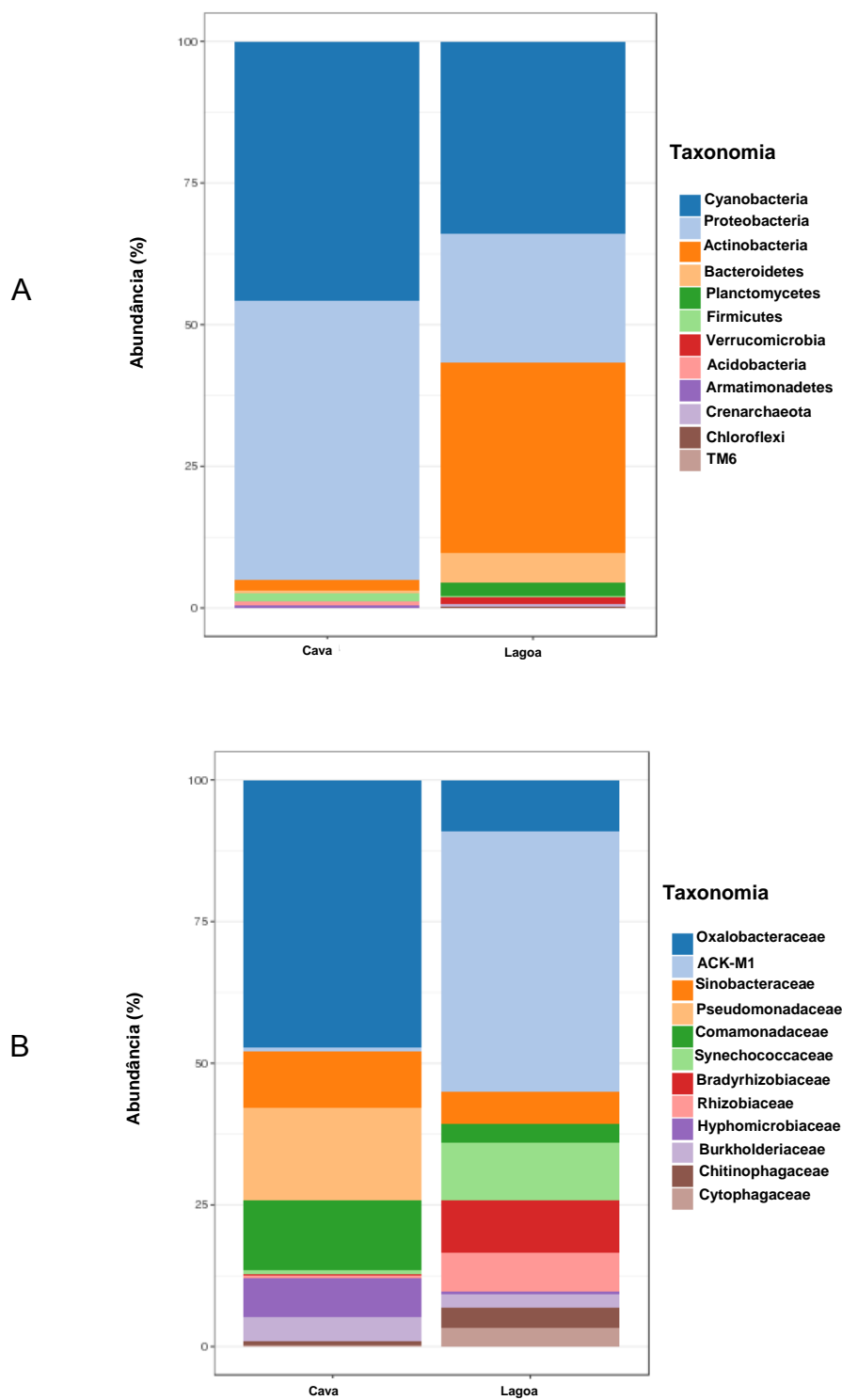


Figura 10. Filiação taxonômica obtida através do banco de dados Greengenes, das amostras de água da Cava e Lagoa em níveis de filo (A) e família (B).

Com a análise de filiação taxonômica foi possível identificar 47 famílias, com uma porcentagem de anotação de 77,88%. A Figura 10B mostra as 12 mais abundantes; dentre elas destacam-se, para a amostra da Cava, as famílias Oxalobacteraceae (47,2%) e Pseudomonadaceae (16,2%), e para a amostra da Lagoa, as famílias ACK-M1 (46%) e Synecochoccaceae (10,2%).

Os principais gêneros identificados na Cava foram: *Pseudomonas* (49,4%) *Hyphomicrobium* (19,8%) e *Burkholderia* (12,4%). Na Lagoa, *Synechococcus* (36,6%), *Agrobacterium* (16,5%), *Bradyrhizobium* (12,1%) e *Hymenobacter* (11,4%) (Figura 11). A porcentagem de anotação, segundo as estatísticas realizadas com SHAMAN para nível de gênero foi de 32,58%.

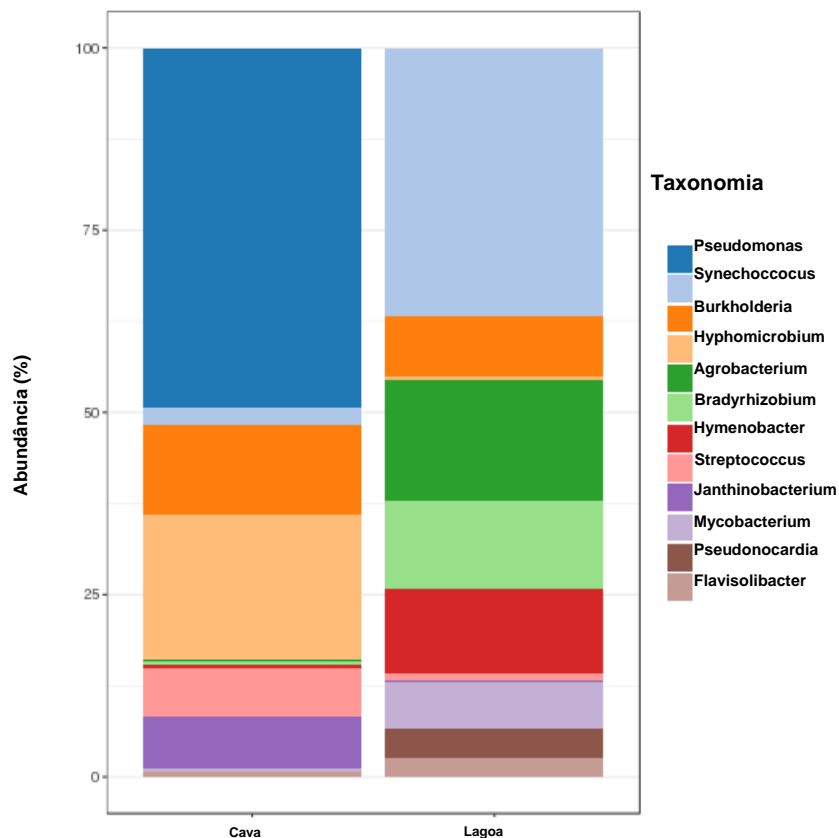


Figura 11. Filiação taxonômica obtida através do banco de dados Greengenes, das amostras de água da Cava e Lagoa em nível de gênero.

3.5 Predição do potencial metabólico funcional

Os resultados da predição do potencial metabólico funcional foram obtidos através do software PICRUST “Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States”. Este software utiliza uma abordagem computacional para prever a composição funcional de metagenomas. As análises são baseadas em pesquisas de genes marcadores 16S rRNA através do uso de banco de dados como IMG “Integrated Microbial Genomes ou Greengenes para inferir o potencial codificador a partir das UTOs e para a classificação funcional, utiliza os bancos de dados KEGG ou COG (*Clusters of Orthologous Groups of Proteins*) (LANGILLE et al., 2013).

Para realizar as predições de potenciais funções metabólicas nas amostras de água da Cava e Lagoa utilizou-se o banco de dados KEGG como referência. O banco de dados KEGG possui 3 níveis de categorização de subsistemas, neste estudo analisamos os níveis 1 e 2.

A categorização de nível 1 inclui: processos celulares, processamento de informação ambiental, processamento de informação genética, metabolismo, sistema do organismo e não classificados. Estão incluídos no nível 2: metabolismo de aminoácidos, metabolismo de carboidratos, comunicação celular, crescimento e morte celular, motilidade celular, energia de metabolismo, adaptação ambiental, metabolismo de lipídio, transporte de membrana e processamento de reparo de DNA.

Através dos testes estatísticos realizados utilizando o software STAMP (Statistical Analyses of Metagenomic Profiles) foi possível realizar a análise comparativa dos perfis metabólicos, na Figura 12 observamos a comparação das amostras com o nível 1 de classificação KEGG. Esta análise revelou diferenças estatisticamente significativas entre as amostras. Na amostra de água da Cava houve mais sequências relacionadas a processos celulares e processamento de informação ambiental, já a amostra da água da Lagoa mostrou maior proporção de sequências em atividades do metabolismo e processamento de informação genética.

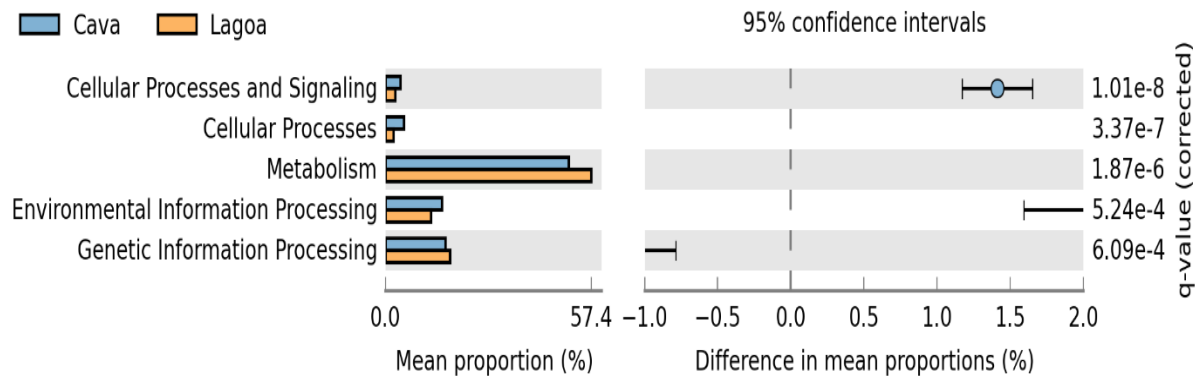


Figura 12. Diferenças estatisticamente significativas no subsistema funcional no nível 1 de classificação no banco de dados KEGG entre as amostras de água da Cava e Lagoa.

Na Figura 13 podem ser observadas as predições das potenciais funções metabólicas no nível 2. A amostra da água da Cava apresentou em maior proporção os subsistemas de motilidade celular, mecanismos de transdução de sinal, canal de íons de poros, moléculas estruturais intracelulares e de membrana e o subsistema relacionado a transporte por membrana.

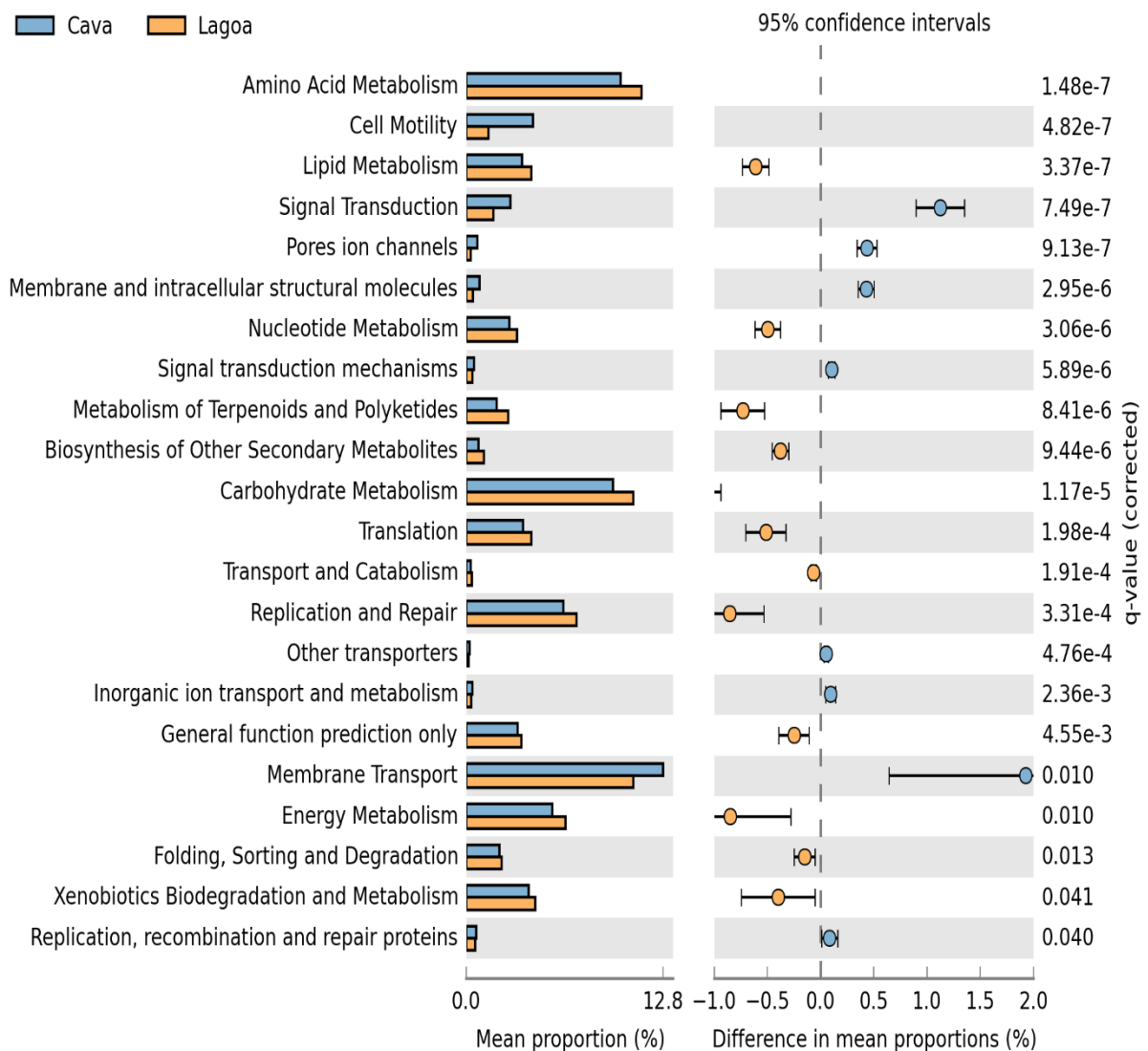


Figura 13. Diferenças estatisticamente significativas no subsistema funcional no nível 2 de classificação no banco de dados KEGG entre as amostras de água da Cava e Lagoa.

Por outro lado, funcionalmente (Figura 13) a amostra da água da Lagoa destacou-se por apresentar proporções maiores da maioria dos subsistemas encontrados como, por exemplo, os relacionados com o metabolismo de várias moléculas (aminoácidos, lipídios, nucleotídeos, terpenoides e poliketides), biossíntese de outros compostos secundários, metabolismo de carboidrato, tradução, replicação e reparo, funções gerais preditas, metabolismo energético, dobragem, classificação e degradação, metabolismo e degradação de xenobióticos.

Ambas as amostras são enriquecidas com subsistemas importantes em maiores proporções como, por exemplo, o subsistema relacionado ao metabolismo de carboidratos, transporte por membrana e metabolismo de aminoácido, o qual pode indicar que as bactérias estão assimilando nitrogênio ou carbono através dessa via. De um modo geral a presença desses subsistemas identificados em maior abundância demonstram um bom desenvolvimento de funções básicas e vitais dos micro-organismos.

4. Discussão

Alguns estudos demonstraram que os metais influenciam os micro-organismos afetando o seu crescimento, morfologia e metabolismo, resultando num decréscimo da biomassa e diversidade (ELLIS et al., 2003; MALIK; AHMAD, 2002). Desta forma neste estudo, foi analisada a concentração de metais na água de uma Cava de mineração e de uma Lagoa de rejeitos existentes em uma área de mineração de ferro desativada.

A amostra de água da Cava apresentou altas concentrações de metais e alguns deles (manganês e níquel) excederam o nível máximo permitido para água doce de classes 1 e 2, segundo normativa do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (resolução 357/2005). Além desses, o ferro total, mesmo não possuindo limites estabelecidos pela resolução, apresentou alta concentração na água da Cava e Lagoa. Nossas amostras mostraram concentrações bem elevadas (Cava 55,8 mg L⁻¹ e Lagoa 4,3 mg L⁻¹) quando comparadas a lagoas de cava oriundas da mineração do ferro e ouro, estudados por Gonçalves (2013), que apresentaram concentrações máximas de ferro total em torno de 1,7 mg L⁻¹.

O Ferro e o Manganês são comumente detectados acima dos padrões estabelecidos pela resolução CONAMA 357/05 em lagos e rios de Minas Gerais devido às características geoquímicas das bacias. Elevadas concentrações podem ser encontradas em águas subterrâneas e no hipolímnio sem presença de oxigênio. Nestas condições, o ferro e o manganês solubilizam-se (Fe²⁺ e Mn²⁺) e, ao entrarem em contato com o oxigênio, precipitam-se (Fe³⁺ e Mn⁴⁺) (GONÇALVES, 2013).

O níquel é um elemento de ocorrência natural, encontrado principalmente como óxidos e sulfetos (KUMBASAR, 2009), o Brasil possui uma das 7 maiores reservas mundiais de níquel, que são distribuídas em diversos estados, incluindo Minas Gerais. A presença deste elemento na amostra de água da Cava pode estar associada à ocorrência natural do níquel na natureza (MESQUITA, 2010). A presença de cobre também pode ser atribuída a origem natural. Classificado como metal traço, o cobre tende a ser identificado em maior concentração em lagos de pH ácido (GONÇALVES, 2013), característica tal observada na água da Cava. A resolução CONAMA 357/05 não estabelece limite para o cobre total, analisado em nosso estudo; no entanto, determina para o cobre dissolvido (0,009 mg/L).

O potencial hidrogeniônico (pH) está relacionado à concentração dos íons H_3O^+ nas águas. O pH é importante pois afeta a solubilidade de diversas substâncias, a distribuição das formas livre e ionizada de diversos compostos químicos e, em função disso, o potencial de toxicidade de vários elementos (CÉLICO, 2015).

Além das concentrações médias a elevadas de metais pesados, águas de lagos provenientes da extração de minerais, principalmente os sulfetados, tendem a possuir baixo pH (GAMMONS et al., 2009; ZHAO et al., 2009). Os minerais que contêm o ferro podem ser sulfetados ou não, e os lagos formados em ambientes onde os minerais não são sulfetados, como a hematita (Fe_2O_3) possuem pH perto da neutralidade (GODWIN, A. L.; LEE, P. F.; CONLY, A. G.; GOOLD, 2010), o que foi observado na água da Lagoa de rejeitos, que apresentou pH 7,2, e na água da Cava, que apresentou pH 5,5, este apresentando caráter levemente ácido. Para água doce das classes 1 e 2, a Resolução CONAMA 357/2005 estabelece pH entre 6 e 9. Gonçalves (2013) estudou as características limnológicas de lagos formados em cavas de mineração formados a partir da extração de ferro e ouro em Minas Gerais e observou que o pH foi neutro na maioria das amostras observadas (GONÇALVES, 2013).

Mesmo não sendo formada em ambiente que possui minerais sulfetados, o pH com tendência a acidez na Cava de mineração analisada pode estar relacionado a diversos fatores, como por exemplo a composição da rocha, que com as chuvas, aumenta o favorecimento da precipitação e da oxidação de minerais que estão presentes nas paredes da Cava, aumentando, assim, a predisposição para oxidação dos minerais, com conseqüente redução do pH. Segundo Boehrer e Schultze (2008),

a acidez em lagos de mineração também pode estar atribuída ao contato entre as camadas óxica (presença de oxigênio dissolvido) e anóxica (sem presença de oxigênio dissolvido).

Neste trabalho foi utilizada uma combinação de técnicas para inferir a taxonomia e o potencial metabólico da comunidade microbiana, que pode ser utilizada para estimar as modificações causadas por fatores abióticos ou estresse, como por exemplo, a atividade mineradora. Alguns membros das comunidades bacterianas das amostras de água da Cava e Lagoa foram isolados através de técnicas tradicionais de cultivo. Poucos organismos foram isolados e os resultados mostraram que os isolados obtidos pertencem aos gêneros: *Ralstonia*, *Undibacterium* e *Curvibacter* (Tabela 2).

Bactérias do gênero *Ralstonia* identificada nos isolados provenientes da Cava (C1 e C6) são resistentes a Hg e outros metais tóxicos, e possuem capacidade de precipitar metais catiônicos, já tendo sido isoladas de águas residuais da indústria têxtil, onde apresentaram potencial em tolerar 4-aminobenzenesulfonate (4-ABS) e utilizá-lo como única fonte de carbono (LLOYD; LOVLEY, 2001; MING et al., 2011). Mondal, Majumder e Mohanty (2008) mostraram que *Ralstonia* realiza a remoção biológica de arsênio em águas contaminadas com este metal.

Os isolados C3, L3, L4, L5 e L6 correspondem ao gênero *Undibacterium*, pertencente à família Oxalobacteraceae, e são frequentemente encontradas em ambientes aquáticos. Nahm et al. (2017) mostraram em seu estudo que o gênero *Undibacterium* possui atividade celulolítica e capacidade em remover biofilme em lodo ativado. Também foi reportada a presença e tolerância deste gênero em águas subterrâneas contaminadas com arsênio (GHOSH; SAR, 2013).

Curvibacter presente na amostra da água da Lagoa (isolado L2) já foi descrito por sua capacidade em reduzir nitrato (DING; YOKOTA, 2004) e precipitar carbonato de cálcio (ZHANG; LI; LV, 2017), além de degradar diferentes ftalatos, que são utilizados como aditivo para deixar o plástico mais maleável (PAE-UM; ESTER, 2016).

Em síntese todos os gêneros isolados em nossas amostras possuem capacidade em resistir e lidar com diferentes tipos de compostos e são facilmente encontrados em ambientes aquáticos contaminados.

Além disso, as bactérias isoladas em nosso estudo mostraram capacidade em produzir algumas enzimas de interesse biotecnológico como: protease, lipase, celulase e enzimas capazes de solubilizar fosfato (Tabela 3). Amplamente utilizadas na indústria, por exemplo, as proteases bacterianas, identificadas nos isolados *Ralstonia* (C3) e *Curvibacter* (L2), têm grande importância comercial nas indústrias de lavanderia, alimentos, couro e seda devido à sua alta capacidade de produção e atividade catalítica (NAJAFI; DEOBAGKAR; DEOBAGKAR, 2005).

Identificadas nos isolados *Ralstonia* (C6) e *Undibacterium* (L6), as lipases apresentam um amplo espectro de atividade em vários processos biotecnológicos, como a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol, esterificação, transesterificação e esterificação dos lipídeos (COLLA et al., 2010). A transesterificação realizada por lipases é essencial na cadeia de produção de biodiesel (GAO et al., 2009).

Os isolados *Curvibacter* (L2) e *Undibacterium* (L4 e L6), provenientes da Lagoa de rejeitos, foram capazes de produzir celulases em meio de cultivo sólido. As celulases são um complexo de enzimas capazes de hidrolisar materiais celulósicos. Estas enzimas possuem uma ampla variedade de atividades industriais, com particular interesse na produção de biocombustíveis, e suas aplicações vão desde indústrias alimentícias, ração animal, têxtil, detergente, cervejarias, indústria de polpa e papel, gestão de resíduos até a indústria médico farmacêutica (BHAT; BHAT, 1997; CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Enzimas solubilizadoras de fosfatos produzidas por micro-organismos são importantes, pois o fósforo é um nutriente limitante nos solos, e ao solubilizar fosfato inorgânico insolúvel os micro-organismos conseguem aumentar o conteúdo de fósforo solúvel disponibilizando-o para as plantas, e desempenhando assim um papel fundamental no ciclo biogeoquímico do fósforo em ecossistemas naturais (MARRA, 2012). Os isolados C1, C6 e L2, correspondentes aos gêneros *Ralstonia* (C1 e C6) e *Curvibacter* (L2), foram capazes de produzir enzimas solubilizadoras de fosfato inorgânico.

O estudo do perfil metabólico utilizando microplacas Biolog Ecoplate foi realizado a fim de identificar a capacidade da população microbiana presente na água da Cava e da Lagoa em utilizar diferentes fontes de carbono. Este tipo de avaliação foi descrito e proposto pela primeira vez por Garland e Mills (1991) e tem sido usada

com sucesso em diferentes ambientes como solos (LEON et al., 2012; ZAK et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2009); lamas (GRYTA; FRAC; OSZUST, 2014); água doce, sedimentos e biofilmes (GARLAND; MILLS, 1991; SALOMO; MUNCH; ROSKE, 2009; MEDIHALA et al., 2012).

Com os valores de AWCD concluímos que os micro-organismos presentes na água da Lagoa de rejeitos mostrou maior eficiência no consumo em relação ao tempo quando comparada com a Cava (Figura 4). Esta análise nos mostrou que a comunidade da amostra da água da Cava atingiu o máximo da utilização dos substratos com 48 horas, e após este período apresentou um decréscimo na atividade metabólica. Para a amostra da Lagoa observamos que o índice de desenvolvimento médio da cor aumentou gradativamente ao longo do tempo, evidenciando um consumo mais significativo, corroborando assim valores de AWCD obtidos em lagoas da mesma região (LIMA-BITTENCOURT et al., 2014).

Os índices de diversidade de Shannon (E) e riqueza de substratos (R) mostraram menor diversidade quando comparado com outros ambientes aquáticos, como em lagos não expostos a atividades antropogênicas no Parque Estadual do Rio Doce em Minas Gerais. Os resultados obtidos por Lima-Bittencourt et al. (2014) mostraram índices em torno de 0,95 para diversidade de Shannon e 28 para riqueza de substratos, valores estes que indicam alta diversidade (JANNICHE; SPLIID; ALBRECHTSEN, 2012). Da mesma forma, apesar das condições ambientais serem diferentes, água de rios destinadas à irrigação (CÉLICO, 2015) e água dos córregos Cerradinho e Jaboticabal, situado na cidade de Jaboticabal, São Paulo, Brasil (SILVEIRA, 2015), mostraram índices de diversidade e riqueza maiores que os obtidos em nosso estudo, sugerindo assim que o estresse causado pela atividade mineradora pode ter contribuído para diminuição da diversidade microbiana.

O agrupamento hierárquico, assim como o gráfico PCoA revelaram diferenças da diversidade funcional entre as comunidades no consumo de diferentes fontes de carbono. Os resultados mostraram que o metabolismo de amins-amidas foi mais acentuado na população da Cava enquanto que na população da Lagoa houve uma preferência para o consumo de aminoácidos. Ambas amostras apresentaram semelhança no consumo de carboidratos, aminoácidos e ácidos carboxílicos, que estão relacionados e são de extrema importância para a degradação da matéria

orgânica e consequente manutenção dos ciclos biogeoquímicos. A alta capacidade catabólica desses substratos podem indicar a presença de bactérias heterotróficas (POYRAZ; MUTLU, 2017; YANG et al., 2015; LI; JIN; YUA, 2010).

As diferenças identificadas através das análises com as microplacas Biolog Ecoplate podem estar relacionadas ao histórico dos ambientes estudados. A Cava foi formada pela atividade mineradora e por consequência da exploração encheu-se com água subterrânea e das chuvas, já a Lagoa não foi gerada pela atividade extrativista, é um ambiente natural que foi utilizado para lavagem dos rejeitos. Naturalmente este ambiente tende a ter maior variedade de resíduos de plantas, animais e microorganismos que existiam no ambiente antes da exploração e dessa maneira é um ambiente propenso a maior quantidade de compostos orgânicos, que contribui para a diversidade dos microrganismos, aumentando assim o potencial metabólico da comunidade (GRYTA; FRACC; OSZUST, 2014).

As análises realizadas a partir do sequenciamento 16S rRNA revelou uma clara separação entre os dois grupos de amostras de água da Cava e Lagoa. A amostra da água da Lagoa de rejeitos mostrou maior número de UTOs, apresentando maiores índices de Alpha diversidade, índices de Shannon, Simpson e InvSimpson, consolidando os resultados de diversidade gerados através da técnica Biolog EcoPlate, onde a amostra de água da Lagoa mostrou ser mais diversa que a amostra de água da Cava, que provavelmente possui menor diversidade por ser um ambiente artificial gerado através da exploração de minérios, sendo que sua microbiota certamente é afetada pelos fatores antropogênicos e pela alta concentração de metais presentes na água.

As análises taxonômicas realizadas através do banco de dados Greengenes mostrou que as duas amostras compartilham os mesmos filos, porém em porcentagens diferentes. O filo Proteobacteria foi o mais abundante na água da Cava, com 49,2% das UTOs, já na amostra de água da Lagoa esteve presente com 22,7%. Também no isolamento, todas as bactérias obtidas pertencem ao filo das Proteobacteria. As Proteobacteria são conhecidas pelo seu poder de adaptação a diversos ecossistemas, e são predominantemente encontradas em ambientes de minas como solo, água e sedimentos contaminados com diferentes metais pesados

(PEREIRA; VICENTINI; OTTOBONI, 2014; RASTOGI et al., 2009; COSTA et al., 2015).

Pertencente à classe das Betaproteobacteria, a Oxalobacteraceae representa uma família filogeneticamente diversificada, e seus micro-organismos são tipicamente encontrados em ambientes aquáticos incluindo ambientes contaminados, água mineral, água potável e solos (MULLER et al., 2006; FERNANDES et al., 2005; KAMPFER; BUSSE; FALSEN, 2006; EDER et al., 2011).

A família Oxalobacteraceae foi a mais abundante na amostra da água da Cava representando 47,2% das UTOs com representantes do gênero *Janthinobacterium* (7,2%), e na água da Lagoa esteve presente com 8,2% das UTOs. A família Oxalobacteraceae também foi a mais abundante nos isolados identificados em nosso estudo (C3, L3, L4, L5 e L6) com o gênero *Undibacterium*. Essas bactérias, que metabolizam elementos tóxicos, representam uma ferramenta atraente para restaurar ambientes contaminados. Algumas espécies de Oxalobacteraceae têm sido utilizadas nos primeiros passos para a biorremediação de arsênio (SIMEONOVA et al., 2005).

Também em destaque na amostra de água da Cava, a família Pseudomonadaceae representou 16,2% das UTOs. Alguns de seus gêneros são conhecidos por reduzir Cr (IV) em Cr (III), apresentando grande potencial para biorremediação de solos e águas subterrâneas (TURICK; APEL; CARMICOL, 1996). O gênero *Pseudomonas*, identificado com 49% na água da Cava, tem sido muito estudado para a aplicação em biorremediação, seja para a biodegradação de pesticidas e compostos orgânicos aromáticos como para remoção de metais pesados (HORNINK, 2015; WASI; TABREZ; AHMAD, 2013). A identificação dessas bactérias na água da Cava é de fundamental importância pois podem servir como direcionamento de futuros estudos, como a prospecção e clonagem de genes e enzimas importantes para o metabolismo e bioabsorção de metais.

A família Burkholderiaceae foi representada com dois gêneros em nosso estudo, *Ralstonia* (isolados C1 e L2), identificada através do isolamento por métodos tradicionais de cultivo, e *Burkholderia*, que foi identificada com o sequenciamento do gene 16S *rRNA*. O gênero *Burkholderia* contém mais de 30 espécies, que ocupam nichos ecológicos notavelmente diversos, variando de solos contaminados, água doce, oceanos até ao trato respiratório de humanos (COENYE; VANDAMME, 2003).

As *Burkholderia* são exploradas para vários fins, incluindo controle biológico de patógenos das plantas, biorremediação de xenobióticos recalcitrantes e promoção de crescimento de plantas (COENYE; VANDAMME, 2003). Apresenta resistência a metais pesados e a antibióticos, além de ajudar no crescimento e captação de metais pesados por plantas fitorremediadoras, proporcionando uma biorremediação mais eficiente (JIANG et al., 2008; HUANG SHOUCHEG et al., 2017). Este gênero representou 12,4% na água da Cava e 8,4% na Lagoa. Pensando na biorremediação, principalmente da água da Cava que apresentou maior número e concentração de metais acima do permitido pela CONAMA 357/2005, o emprego de plantas fitorremediadoras juntamente com as *Burkholderia* já presentes no ambiente poderia se tornar uma opção simples e eficiente de diminuir as concentrações de metais, até que as mesmas estejam de acordo com a legislação prescrita.

Pertencente ao filo Proteobacteria e a família Hyphomicrobiaceae, bactérias do gênero *Hyphomicrobium* são abundantes na amostra de água da Cava (19,8% das UTOs), enquanto na água da Lagoa foram identificadas em menor quantidade (0,5%). Bactérias do gênero *Hyphomicrobium*, comumente encontradas em solo e água, são conhecidas pela sua capacidade de remover o nitrogênio em águas residuais através da nitrificação/desnitrificação biológica (WANG et al., 2014). Além do envolvimento na nitrificação e desnitrificação, bactérias do gênero *Hyphomicrobium* atuam em ambientes contendo metanol, Dimetilsulfureto (DMS) e dimetilsulfóxido (DMSO) como única fonte de carbono (EYICE; SCHÄFER, 2016). Também atuantes na desnitrificação do nitrogênio em águas residuais, a família Comamonadaceae foi identificada no isolado L2-*Curvibacter* proveniente da água da Lagoa, esta família representou 12,3% das UTOs na água da Cava e 3,3% na Lagoa.

Mesmo não sendo comumente encontradas em ambientes aquáticos *Agrobacterium* e *Bradyrhizobium* foram identificadas com 16,5% e 12,1% das UTOs na água da Lagoa e em menor quantidade na água da Cava (0,5% e 0,3% respectivamente). *Agrobacterium* e *Bradyrhizobium* são frequentemente encontradas em solos e podem viver em simbiose com leguminosas provocando estruturas conhecidas por nódulos, que participam da fixação biológica do nitrogênio, *Agrobacterium* também é bem conhecida pela sua habilidade em transferir DNA para células de plantas, característica muito utilizada na engenharia genética (GELVIN,

2003; COOPER et al., 2017). Visto que ambos os gêneros possuem ligação próxima com o nitrogênio, a presença destas bactérias na água da Cava e Lagoa podem estar relacionadas diretamente ou indiretamente com a nitrificação, desnitrificação e amonificação que também ocorrem no ciclo do nitrogênio na água.

Com expressiva participação nas amostras estudadas, as Cyanobacteria estiveram presentes com o gênero *Synechococcus* em 36,6% das UTOs na amostra de água da Lagoa e 2,2% na Cava. Estas bactérias estão presentes em diversos habitats, e além da capacidade em realizar fotossíntese oxigenada, representantes do filo Cyanobacteria também são capazes de sobreviver a condições ambientais extremas e possuem um importante papel ecológico como produtores primários e produtores de metabólitos com aplicações industriais (SCIUTO; MORO, 2015; ALVARENGA; FIORE; VARANI, 2017).

As Actinobacteria foram dominantes na amostra de água da Lagoa (17% das UTOs), e na água da Cava representaram 1,9%. Bactérias deste filo são geralmente recuperadas em grandes proporções em ambientes de água doce (WANG et al., 2012; NEWTON et al., 2011) e conhecidas por habitar ambientes contaminados com metal, possuindo resistência à Fe, As e Hg (ITOH et al., 2011; REIS; BARBOSA, 2013; HALTER et al., 2011; GREMION; CHATZINOTAS, 2003; VISHNIVETSKAYA et al., 2011).

Classificado em nível de família em nossa análise, o grupo ACK-M1 pertence ao filo Actinobacteria e é frequentemente encontrado em ambientes aquáticos (ZWART et al., 2002; COTTRELL et al., 2005). Possivelmente importante por apresentar 46% na amostra de água da Lagoa, bactérias do grupo Actinobacteria ACK-M1 apresentam capacidade de quimiotaxia (capacidade da célula em se mover na direção de um gradiente químico) que ocorre em resposta a substratos orgânicos (aminoácidos, açúcares e compostos orgânicos de enxofre) e inorgânicos (amônio, nitrato e fosfato), permitindo que os micro-organismos respondam rapidamente a diferentes estímulos ambientais (DENNIS et al., 2013). Na amostra de água da Cava, o grupo ACK-M1 participou com apenas 0,6% da UTOs.

O gênero *Mycobacterium* compreende mais de cento e cinquenta espécies reconhecidas, a maioria dos quais reside no meio ambiente, principalmente em ambientes aquáticos, e muitas podem ser patogênicas para os mamíferos. Com 6,4%

na água da Lagoa e 0,3% na água da Cava, algumas espécies no ambiente podem interferir com a eficácia da vacina BCG e são o agente causador da maioria dos casos de tuberculose (KING et al. 2017). Além disso, esta bactéria é reconhecida pelo alto poder de catabolizar diversos poluentes de água subterrânea como a acetona, ciclohexano, estireno, benzeno, etilbenzeno, propilbenzeno, dioxano e 1,2-dicloroetileno (BURBACK; PERRY, 1993). Outro gênero potencialmente eficiente na degradação de compostos é a *Pseudonocardia*, também pertencente ao filo das Actinobacteria, que são isoladas de diferentes ambientes, como aquáticos, sedimentos marinhos e abissais, e possuem potencial para catabolizar compostos orgânicos contendo éter poluentes como o tetrahydrofurano, 1,4-dioxano (VAINBERG et al., 2006) (LIU et al., 2006) e foram descritas por produzirem dois novos antibióticos, branimicinas B e C (BRAÑA et al., 2017).

Identificados na água da Lagoa com 5,2 % e 0,5% na água da Cava, membros do filo Bacteroidetes são encontrados em diferentes nichos ecológicos, incluindo solo, oceano, água doce e o trato gastrointestinal de animais, onde exibem várias funções biológicas (THOMAS et al., 2011). Uma análise integrativa das sequências de 16S rRNA bacteriana de lagos e rios de água doce nos últimos 15 anos concluiu que esses ambientes hospedam uma comunidade bacteriana planctônica específica, diferente dos habitats terrestres e sedimentos adjacentes (ZWART et al., 2002). Os Bacteroidetes estavam entre as principais linhagens bacterianas nesta comunidade, juntamente com Proteobacteria, Actinobacteria e Verrucomicrobia, este também identificado em nossas amostras (1,2% Lagoa) (THOMAS et al., 2011).

Os Bacteroidetes são considerados especialistas em degradação da matéria orgânica de alto peso molecular, como proteínas e carboidratos (O'SULLIVAN et al., 2006; THOMAS et al., 2011). Alguns membros deste filo podem ter um forte comportamento patogênico podendo causar infecções oportunistas, e fitopatogênico afetando várias plantas e algas (SMITH; ROCHA; PASTER, 2006; LIAO; WELLS, 1986; SKERRATT et al., 2002). As famílias Cytophagaceae e Chitinophagaceae foram mais abundantes na amostra da Lagoa com 3,7% e 3,2% respectivamente, na água da Cava Cytophagaceae representou 0,6% e Chitinophagaceae 0,3% da UTOs.

O gênero *Hymenobacter* pertence à família Cytophagaceae e foi identificado com 11,4% na amostra da Lagoa e 0,5% na Cava. Este gênero já foi isolado em uma

ampla variedade de ambientes incluindo ar, solo, água doce e ambientes extremos, como por exemplo em águas de uma mina de urânio (KANG et al., 2017; LEE et al., 2017). Também pertencente ao filo Bacteroidetes o gênero *Flavisolibacter* foi identificado com 2,7% das UTOs na água da Lagoa e 0,8% na água da Cava. Este gênero já foi isolado em ambientes aquáticos e solo (LEE et al., 2016; JAHNG et al., 2015) inclusive solos de áreas impactadas pela mineração de ferro (HONG et al., 2015).

O filo Planctomycetes, presente em 2,5% na amostra de água da Lagoa desempenha um papel importante nos ecossistemas aquáticos, podendo representar até 11% da comunidade planctônica (POLLET; HUMBERT; TADONLÉKÉ, 2014). Membros deste filo possuem genes envolvidos na degradação de detritos vegetais e polímeros de algas e são reconhecidos pelo seu envolvimento na ciclagem do nitrogênio e carbono (TADONLÉKÉ, 2007; NEEF et al., 1998).

A análise taxonômica também identificou o filo Firmicutes em 1,4% das UTOs na água da Cava e 0,3% na Lagoa. Estudos apontam que os organismos do filo Firmicutes estão significativamente correlacionados a ambientes contaminados com metais. Olukoya, Smith e Ilori (1997) em seu estudo mostraram que bactérias do gênero *Streptococcus* (6,5% na água da Cava e 1% na Lagoa) possuem resistência a cobalto, chumbo, zinco cromo e cobre.

Os resultados obtidos pela taxonomia nos mostraram claramente que a maioria dos filos e famílias identificados nas amostras de água da Cava e da Lagoa está correlacionada à resistência de diferentes metais em ambientes aquáticos e a maioria apresenta potencial para biorremediação. Além disso, na análise comparativa dos perfis metabólicos com a classificação KEGG observamos que ambas as amostras apresentaram subsistemas importantes e possuíram diferenças estatisticamente significativas entre si. A amostra de água da Cava apresentou em maior proporção subsistemas relacionados a processos celulares e processamento de informação ambiental, com destaque para os subsistemas relacionados ao transporte de substâncias. O qual pode incluir mecanismos de transporte de íons metálicos, importantes quando pensamos no excesso de Ferro presente na água.

Já a amostra da Lagoa apresentou maiores proporções da grande maioria dos subsistemas identificados, com destaque para o metabolismo e processamento de

informação genética e subsistemas relacionados ao metabolismo de aminoácidos e carboidratos, que estão associados a manutenção básica das células, sugerindo assim que a população da Lagoa participa mais ativamente de processos vitais dos micro-organismos como replicação, transcrição e tradução. Também tem destaque na água da Lagoa o metabolismo energético, um subsistema que engloba o metabolismo de nitrogênio, que é de suma importância em ambientes aquáticos. Micro-organismos que participam do ciclo do nitrogênio ajudam a prevenir a eutrofização da água e disponibilizam o N para níveis tróficos mais elevados, já que a maioria do nitrogênio existe sob a forma de moléculas orgânicas (COSTA et al., 2015).

O conjunto de análises realizadas mostrou que os dois ambientes estudados, ambos impactados pela atividade mineradora, diferem entre si. A técnica do Biolog Ecoplate separou a população de acordo com o potencial metabólico, caracterizando a água da Lagoa por consumir alguns tipos de substratos como o grupo dos aminoácidos, que estão relacionados à degradação da matéria orgânica e consequente manutenção dos ciclos biogeoquímicos, como o ciclo do nitrogênio. Com a taxonomia também observamos que a Lagoa possui grande quantidade de bactérias participantes do ciclo do nitrogênio e, funcionalmente, mais genes relacionados a esse metabolismo.

Concluindo, a Lagoa por ser um ambiente de formação natural e dispor de vegetação ao redor, possui mais matéria orgânica adjacente que pode estimular o desenvolvimento de uma população mais diversa e com funções biológicas diferentes da população da água da Cava, que por ser um ambiente formado pela exploração de minérios tem uma vegetação pobre ao redor, o que implica em menor quantidade de matéria orgânica e, conseqüentemente, menor diversidade na atividade metabólica funcional microbiana. Mesmo possuindo uma diversidade menor e mais específica, a água da Cava de mineração pode ser utilizada, após um processo para diminuição de metais (principalmente o ferro) esta água poderia servir como fonte para irrigação local, estimulando a vegetação ao redor da Cava para regeneração do ambiente.

5. Conclusão

O desenvolvimento deste estudo forneceu informações importantes sobre a estrutura da comunidade microbiana procariótica e a diversidade metabólica de dois ambientes aquáticos que sofreram os impactos da atividade mineradora. As oito bactérias isoladas, pertencentes ao filo Proteobacteria, apresentaram habilidade em produzir enzimas biotecnologicamente importantes, como proteases, lipases, celulasas, e solubilizadoras de fosfato. Na avaliação da diversidade metabólica, os micro-organismos mostraram um perfil metabólico altamente eficiente para degradação de diferentes fontes de carbono. O estudo do gene de 16S rRNA revelou que o filo Proteobacteria (24%) foi o mais abundante na água da Cava e o filo Cyanobacteria (17%) na água da Lagoa, a qual apresentou maiores índices de diversidade e riqueza. Ambas amostras, mostraram através da taxonomia que a diversidade desses ambientes está relacionada com micro-organismos potencialmente utilizados para biorremediação. Além disso, a predição do perfil metabólico funcional indicou que a comunidade microbiana da água da Lagoa participa mais ativamente de processos vitais dos micro-organismos enquanto que na água da Cava os micro-organismos mostraram subsistemas baseados em processos celulares e processamento de informação ambiental, o que pode indicar a adaptação ao ambiente que por muitos anos sofreu efeitos antropogênicos.

Por ser a primeira vez que essa região é estudada, nossos dados contribuem para ampliar o conhecimento atual da composição taxonômica e funcional da microbiota de ambientes aquáticos impactados pela atividade mineradora. Nesse sentido, a possibilidade de estudos futuros mostrando ou não a recuperação dessa área, que já teve a atividade mineradora encerrada, pode se beneficiar desse estudo prévio para posterior comparação.

6. Referências

ALVARENGA, D. O.; FIORE, M. F.; VARANI, A. M. A Metagenomic Approach to Cyanobacterial Genomics. **Frontiers in microbiology**, v. 8, n. 809, p. 1–16, 2017.

ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, v. 11, n. 106, 2010.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG., Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 57, p. 289–300, 1995.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 0734–9750, p. 583–620, 1997.

BOCCAMINO, G. D. **Desenvolvimento de geometria para empilhamento de rejeito desaguados de minério de ferro**. 2017. 110 f. Dissertação (Mestrado em Geotecnia) - Escola de Minas. Núcleo de Geotecnia Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

BOEHRER, B.; SCHULTZE, M. Stratification of lakes. **Reviews of Geophysics**, v. 46, n. 2, p. 1–27, 2008.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Genome analysis Trimmomatic : a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BRAÑA, A. F.; SARMIENTO-VIZCAÍNO, A.; PÉREZ-VICTORIA, I.; OTERO, L.; FERNÁNDEZ, J.; PALACIOS, J. J.; MARTÍN, J.; DE LA CRUZ, M.; DÍAZ, C.; VICENTE, F.; REYES, F.; GARCÍA, L. A.; BLANCO, G. Branimycins B and C, Antibiotics Produced by the Abyssal Actinobacterium *Pseudonocardia carboxydivorans* M-227. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 2, p. 569–573, 2017.

BURBACK, B. L.; PERRY, J. J. Biodegradation and biotransformation of groundwater pollutant mixtures by *Mycobacterium vaccae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1025–9, 1993.

BUSHNELL; HAAS. The Utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **J Bacteriol**, n. 199, p. 653–673, 1940.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; PEÑA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J. R.; TURNBAUGH, P. J.; WALTERS, W. A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. correspondence QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. **Nature Publishing Group**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth0510-335>>.

CASTRO, A. M. de; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

CÉLICO, A. S. **Influência da adubação orgânica na qualidade da água destinada à irrigação de hortaliças**. 93 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2015.

CHÁVEZ, L. F.; ESCOBAR, L. F.; ANGHINONI, I.; CARVALHO, P. C. de F.; MEURER, E. J. Diversidade metabólica e atividade microbiana no solo em sistema de integração lavoura-pecuária sob intensidades de pastejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 10, p. 1254–1261, 2011.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 719–729, 1 set. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1462-2920.2003.00471.x>>.

COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8308–8314, 2010.

COOPER, B.; CAMPBELL, K. B.; BEARD, H.; GARRETT, W. M.; MOWERY, J.; BAUCHAN, G. R.; ELIA, P. A proteomic network for symbiotic nitrogen fixation efficiency in *Bradyrhizobium elkanii*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 2017. Disponível em <<http://doi:10.1094/MPMI-10-17-0243-R>>.

COSTA, P. S.; REIS, M. P.; ÁVILA, M. P.; LEITE, L. R.; DE, F. M. G.; SALIM, A. C. M.; OLIVEIRA, G.; BARBOSA, F.; CHARTONE, E. Metagenome of a microbial community inhabiting a metal-rich tropical stream sediment. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–21, 2015.

COTTRELL, M. T.; WAIDNER, L. A.; YU, L.; KIRCHMAN, D. L. Bacterial diversity of metagenomic and PCR libraries from the Delaware River. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 1883–1895, 2005.

DENNIS, P. G.; SEYMOUR, J.; KUMBUN, K.; TYSON, G. W. Diverse populations of lake water bacteria exhibit chemotaxis towards inorganic nutrients. **The ISME Journal**, 2013 v. 7, n. 8, p. 1661–1664, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2013.47>>.

DESANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E. L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSEN, G. L. Greengenes , a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069–5072, 2006. Disponível em : <<http://10.1128/AEM.03006-05>>

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen . nov ., sp . nov . and *Herbaspirillum putei* sp . nov . for bacterial strains isolated from well water and reclassification of *[Pseudomonas] huttiensis* , *[Pseudomonas] lanceolata* , *[Aquaspirillum] delicatum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2223–2230, 2004.

ELLIS, R. J.; MORGAN, P.; WEIGHTMAN, A. J.; FRY, J. C. Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3223–30, 2003.

EYICE, Ö.; SCHÄFER, H. Culture-dependent and culture-independent methods reveal diverse methylotrophic communities in terrestrial environments. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 1, p. 17–26, 2016.

FEAM, F. E. do M. A. **Inventário estadual de barragens do Estado de Minas Gerais**. Minas Gerais, 2013.

GAMMONS, C. H.; HARRIS, L. N.; CASTRO, J. M.; COTT, P. a.; HANNA, B. W. Creating lakes from open pit mines : processes and considerations , with emphasis on northern environments- **Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2826. Fisheries (Bethesda)**, n. 867, p. 1–117, 2009.

GAO, B.; SU, E.; LIN, J.; JIANG, Z.; MA, Y.; WEI, D. Development of recombinant Escherichia coli whole-cell biocatalyst expressing a novel alkaline lipase-coding gene from Proteus sp. for biodiesel production. **Journal of Biotechnology**, v. 139, n. 2, p. 169–175, jan. 2009.

GARLAND, J. L.; MILLS, A. L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2351–2359, 1991.

GELVIN, S. B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 67, n. 1, p. 16–37, table of contents, 2003.

GENTLEMAN, R. C.; CAREY, V. J.; BATES, D. M.; BOLSTAD, B.; DETTLING, M.; DUDOIT, S.; ELLIS, B.; GAUTIER, L.; GE, Y.; GENTRY, J.; HORNIK, K.; HOTHORN, T.; HUBER, W.; IACUS, S.; IRIZARRY, R.; LEISCH, F.; LI, C.; MAECHLER, M.; ROSSINI, A. J.; SAWITZKI, G.; SMITH, C.; SMYTH, G.; TIERNEY, L.; YANG, J. Y. H.; ZHANG, J. Bioconductor : open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, n. 10, 2004.

GHOSH, S.; SAR, P. ScienceDirect identification and characterization of metabolic properties of bacterial populations recovered from arsenic contaminated ground water of North East India (Assam). **Water Research**, v. 47, n. 19, p. 6992–7005, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.044>>.

GODWIN, A. L.; LEE, P. F.; CONLY, A. G.; GOOLD, A. R. Predicting toxicity of future combined pit lakes at the former steep rock iron Mine near Atikokan, Ontario. **Mine Water and Innovative Thinking**, 2010.

GONÇALVES, L. V. **Qualidade Da Água Em Lagos De Mineração - Estudos De Caso : Águas Claras E Riacho Dos Machados**. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Área Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.

GREMION, F.; CHATZINOTAS, A. Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal- contaminated bulk and rhizosphere soil. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 896–907, 2003.

GRYTA, A.; FRAC, M.; OSZUST, K. The application of the biolog ecoplate approach in ecotoxicological evaluation of dairy sewage sludge. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1434–1443, 2014.

GRYTA, A.; FRACC, M.; OSZUST, K. The Application of the Biolog EcoPlate approach in ecotoxicological evaluation of dairy sewage sludge. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1434–1443, 2014.

HALTER, D.; CORDI, A.; GRIBALDO, S.; GOULHEN-CHOLLET, F.; HEINRICH-SALMERON, A.; CARAPITO, C.; PAGNOUT, C.; MONTAUT, D.; SEBY, F.; DORSSELAER, A. Van; SCHAEFFER, C.; BERTIN, P. N.; BAUDA, P.; ARSE, F. Taxonomic and functional prokaryote diversity in mildly arsenic-contaminated sediments. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 877-887, 2011.

HONG, C.; SI, Y.; XING, Y.; LI, Y. Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. **Environmental science and pollution research international**, v. 22, n. 14, p. 10788–10799, 2015.

HORNINK, K. R. **Isolamento e identificação de bactérias com potencial para realizar biorremediação de cobre**. 2015. 30 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

HUANG SHOUCHEG; WANG XIAODONG; LIU XU1; HE GENHE; WU JICHUN. Isolation, Identification and Characterization of an Aluminum-Tolerant Bacterium *Burkholderia* sp. SB1 from Acidic Red Soil. **Pedosphere**, 2017.

IBEKWE, A. M.; KENNEDY, A. C. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 151-163, 1998.

ITOH, T.; YAMANOI, K.; KUDO, T.; OHKUMA, M.; TAKASHINA, T. *Aciditerrimonas ferrireducens* gen. nov., sp. nov., an iron-reducing thermoacidophilic actinobacterium isolated from a solfataric field. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 1281–1285, 2011.

JAHNG, K. Y.; KIM, C. H.; SEO, J.-W.; CHUN, J.; KANG, J. Y. *Flaviaesturariibacter amyovorans* gen. nov., sp. nov., a starch-hydrolysing bacterium, isolated from estuarine water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2209–2214, 1 jul. 2015.

JANNICHE, G. S.; SPLIID, H.; ALBRECHTSEN, H. J. Microbial community-level physiological profiles (CLPP) and herbicide mineralization potential in groundwater affected by agricultural land use. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 140–141, p. 45–55, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconhyd.2012.08.008>>.

JIANG, C.; SHENG, X.; QIAN, M.; WANG, Q. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. **Chemosphere**, v. 72, p. 157–164, 2008.

KANEHISA, M.; SATO, Y.; KAWASHIMA, M.; FURUMICHI, M.; TANABE, M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D457–D462, 4 jan. 2016.

KANG, J. W.; LEE, J. H.; CHOE, H. N.; SEONG, C. N. *Hymenobacter tenuis* sp. nov., isolated from wastewater of an acidic water neutralization facility. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2171–2177, 1 2017.

KING, H. C.; KHERA-BUTLER, T.; JAMES, P.; OAKLEY, B. B.; ERENZO, G.; ASEFFA, A.; KNIGHT, R.; WELLINGTON, E. M.; COURTENAY, O. Environmental reservoirs of pathogenic mycobacteria across the Ethiopian biogeographical landscape. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0173811, 2017.

KUMBASAR R. A. Selective extraction of nickel from ammoniacal solutions containing nickel and cobalt by emulsion liquid membrane using 5,7-dibromo-8-hydroxyquinoline (DBHQ) as extractant. **Minerals Engineering**, v. 22, n. 6, p. 530–536, 2009.

LANGILLE, M. G. I.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J. G.; MCDONALD, D.; KNIGHTS, D.; A REYES, J.; CLEMENTE, J. C.; BURKEPILE, D. E.; VEGA THURBER, R. L.; KNIGHT, R.; BEIKO, R. G.; HUTTENHOWER, C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, v.31, n.9 p. 1-10, 2013. Disponivel em: <<http://dx.doi:10.1038/nbt.2676>>.

LEE, J.-J.; KANG, M.-S.; KIM, G. S.; LEE, C. S.; LIM, S.; LEE, J.; ROH, S. H.; KANG, H.; HA, J. M.; BAE, S.; JUNG, H.-Y.; KIM, M. K. *Flavisolibacter tropicus* sp. nov., isolated from tropical soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3413–3419, 1 set. 2016.

LEE, J.-J.; LEE, Y.-H.; PARK, S.-J.; LEE, S.-Y.; PARK, S.; KIM, M. K.; TEN, L. N.; JUNG, H.-Y. *Hymenobacter seoulensis* sp. nov., isolated from river water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 596–601, 2017.

LEON, C.; CAMPOS, V.; URRUTIA, R.; MONDACA, M.-A. Metabolic and molecular characterization of bacterial community associated to Patagonian Chilean oligotrophic-lakes of quaternary glacial origin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1511–1521, 2012.

LI, J.; JIN, Z.; YUA, B. Changes in the structure and diversity of bacterial communities during the process of adaptation to organic wastewater. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 352–355, 2010.

LIAO, C. H.; WELLS, J. M. Properties of *Cytophaga johnsonae* strains causing spoilage of fresh produce at food markets. **Applied and environmental microbiology**, v. 52, n. 6, p. 1261–5, dez. 1986.

LIMA-BITTENCOURT, C. I.; COSTA, P. S.; REIS, M. P.; SANTOS, A. B.; BARBOSA, F. A. R.; VALENTIN, J. L.; THOMPSON, F. L.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. A survey on cultivable heterotrophic bacteria inhabiting a thermally unstratified water column in an Atlantic Rainforest lake. **PeerJ**, v. 2, p. e478, 2014.

LIU, Z. P.; WU, J. F.; LIU, Z. H.; LIU, S. J. *Pseudonocardia ammonioxydans* sp. nov., isolated from coastal sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 555–558, 2006.

LLOYD, J. R.; LOVLEY, D. R. Microbial detoxification of metals and radionuclides. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 12, p. 248–253, 2001.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. p. 1–21, 2014.

MALIK, A.; AHMAD, M. Seasonal variation in bacterial flora of the wastewater and soil in the vicinity of industrial area. **Environmental monitoring and assessment**, v. 73, n. 3, p. 263–73, 2002.

MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, n. 2, p. 208–IN1, 1961. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80047-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80047-8)>.

MARRA, L. M. **Solubilização de fosfatos por bactérias e sua contribuição no crescimento de leguminosas e gramíneas**. 2012. 141 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Waste Not , Want Not : Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. **PLOS Computational Biology**, v. 10, n. 4, 2014.

MEDIHALA, P. G.; LAWRENCE, G. D. W.; SWERHONE, D. R.; KORBER, D. R. Effect of pumping on the spatio-temporal distribution of microbial communities in a water well field. **Water Research**, v. 46, n. 4, p. 1286–1300, 2012.

MESQUITA, M. C. **Extração de cobalto (ii), ferro (iii) e níquel (ii) na presença de kscn utilizando sistemas aquosos bifásicos formados por poli (óxido de etileno) ou copolímero tribloco I35 e sais de sulfato**. 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

MING, H.; SHAHIR, S.; IBRAHIM, Z.; YAHYA, A. Chemosphere biodegradation of 4-aminobenzenesulfonate by *Ralstonia* sp . *PBA* and *Hydrogenophaga* sp . *PBC* isolated from textile wastewater treatment plant. **Chemosphere**, v. 82, n. 4, p. 507–513, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.094>>.

MONDAL, P.; MAJUMDER, C. B.; MOHANTY, B. Treatment of arsenic contaminated water in a batch reactor by using *Ralstonia eutropha* MTCC 2487 and granular activated carbon. **Journal of Hazardous Materials**. v. 153, p. 588–599, 2008.

NAHM, C. H.; LEE, S.; LEE, S. H.; LEE, K.; LEE, J.; KWON, H.; CHOO, K.; LEE, J.; JANG, J. Y.; LEE, C.; PARK, P. Mitigation of Membrane Biofouling in MBR Using a Cellulolytic Bacterium, *Undibacterium* sp. DM-1, Isolated from Activated Sludge. **Journal of Microbiology Biotechnoly**, v. 27, n. 3, p. 573–583, 2017.

NAJAFI, M. F.; DEOBAGKAR, D.; DEOBAGKAR, D. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 197–203, 2005.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**. v. 170, n. 436, p. 265–270, 1999.

NEEF, A.; AMANN, R.; SCHLESNER, H.; SCHLEIFER, K.-H. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. **Microbiology**, v. 144, n. 12, p. 3257–3266, 1998.

NEWTON, R. J.; JONES, S. E.; EILER, A.; MCMAHON, K. D.; BERTILSSON, S. A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 75, p. 14-49, 2011. Disponível em <<http://doi:10.1128/MMBR.00028-10>>.

O'SULLIVAN, L. A.; RINNA, J.; HUMPHREYS, G.; WEIGHTMAN, A. J.; FRY, J. C. Culturable phylogenetic diversity of the phylum "Bacteroidetes" from river epilithon and coastal water and description of novel members of the family Flavobacteriaceae: *Epilithonimonas tenax* gen. nov., sp. nov. and *Persicivirga xylanidelens* gen. nov., sp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 169–180, 2006.

OLIVEIRA, C. A. de; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. .; LANA, U. G. P.; SCOTTI, M. R.; ALVES, V. M. C. Diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1473–1482, 2009.

OLUKOYA, D. K.; SMITH, S. I.; ILORI, M. O. Isolation and characterization of heavy metals resistant bacteria from Lagos Lagoon. **Folia microbiologica**, v. 42, n. 5, p. 441–4, 1997.

PAE-UM, S.; ESTER, P. Genome Sequence of a Typical Ultramicrobacterium. **Genome Announcements** v. 4, n. 1, p. 1–2, 2016. Disponível em <<http://doi:10.1128/genomeA.01510-15>>.

PARKS, D. H.; TYSON, G. W.; HUGENHOLTZ, P.; BEIKO, R. G. STAMP : statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics applications note**. v. 30, n. 21, p. 3123–3124, 2014.

PEREIRA, 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, 2014.

POLLET, T.; HUMBERT, J.-F.; TADONLÉKÉ, R. D. Planctomycetes in lakes: poor or strong competitors for phosphorus. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 3, p. 819–28, fev. 2014.

POYRAZ, N.; MUTLU, M. Assessment of Changes in Microbial Communities in Different Operational Units from a Wastewater Treatment Plant. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, n. 4, p. 1615–1625, 2017. Disponível em: <<http://www.pjoes.com/doi/10.15244/pjoes/68870>>.

QUINCE, C.; LANZEN, A.; DAVENPORT, R. J.; TURNBAUGH, P. J. Removing Noise From Pyrosequenced Amplicons. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 38, 2011.

RASTOGI, G.; STETLER, L. D.; PEYTON, B. M.; SANI, R. K. Molecular Analysis of Prokaryotic Diversity in the Deep Subsurface of the Former Homestake Gold Mine, South Dakota, USA. **The Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 371–384, 2009.

REIS, M. P.; BARBOSA, F. A. R. The prokaryotic community of a historically mining-impacted tropical stream sediment is as diverse as that from a pristine stream sediment. **Extremophiles**, v. 17, p. 301–309, 2013.

REVENGA, C. **Pilot analysis of global ecosystems : freshwater systems**. World Resources Institute, 2000.

SALOMO, S.; MUNCH, C.; ROSKE, I. Evaluation of the metabolic diversity of microbial communities in four different filter layers of a constructed wetland with vertical flow by BiologTM analysis. **Water Research**, v. 43, n. 18, p. 4569–4578, 2009.

SCIUTO, K.; MORO, I. Cyanobacteria : the bright and dark sides of a charming group. **Biodiversity and Conservation**, 2015. Disponível em : <[http:// DOI 10.1007/s10531-015-0898-4](http://DOI.10.1007/s10531-015-0898-4)>.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, p. 15–22, 1957.

SILVEIRA, A. G. **Influência do manejo do solo em atributos químicos , físicos e microbiológicos**. 2015. 105 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticaba, 2015.

SKERRATT, J.; BOWMAN, J.; HALLEGRAEFF, G.; JAMES, S.; NICHOLS, P. Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. **Marine Ecology Progress Series**, v. 244, p. 1–15, 29 nov. 2002.

SMITH, C. J.; ROCHA, E. R.; PASTER, B. J. The Medically Important Bacteroides spp. in Health and Disease. In: **The Prokaryotes**, p. 381–427, 2006

SOUZA, H. Q. de; OLIVEIRA, L. A. de; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 116–124, 2008.

TADONLÃÉKÃÉ, Rã. D. Strong coupling between natural Planctomycetes and changes in the quality of dissolved organic matter in freshwater samples. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, n. 3, p. 543–555, 2007.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. **Applied and environmental microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777–780, 1982.

THOMAS, F.; HEHEMANN, J.-H.; REBUFFET, E.; CZJZEK, M.; MICHEL, G. Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 93, 2011.

TURICK, C. E.; APEL, W. A.; CARMIOLO, N. S. Isolation of hexavalent chromium-reducing anaerobes from hexavalent-chromium-contaminated and noncontaminated environments. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 44 p. 683–688, 1996.

URAKAWA, H.; ALI, J.; KETOVER, R. D. J.; TALMAGE, S. D.; GARCIA, J. C.; CAMPBELL, I. S.; LOH, A. N.; PARSONS, M. L. Shifts of Bacterioplankton Metabolic Profiles along the Salinity Gradient in a Subtropical Estuary. **Oceanography**, v. 2013, 2013.

VAINBERG, S.; MCCLAY, K.; MASUDA, H.; ROOT, D.; CONDEE, C.; ZYLSTRA, G. J.; STEFFAN, R. J. Biodegradation of ether pollutants by *Pseudonocardia sp. strain ENV478*. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5218–24, 2006.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford, 1970.

VISHNIVETSKAYA, T. A.; MOSHER, J. J.; PALUMBO, A. V.; YANG, Z. K.; PODAR, M.; BROWN, S. D.; BROOKS, S. C.; GU, B.; SOUTHWORTH, G. R.; DRAKE, M. M.; BRANDT, C. C.; ELIAS, D. A. Mercury and Other Heavy Metals Influence Bacterial Community Structure in Contaminated Tennessee Streams **applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 1, p. 302–311, 2011.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R.; AL, W. E. T. 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, 2007.

WANG, Y.; SHENG, H.; HE, Y.; WU, J.; JIANG, Y.; TAM, N. F.; ZHOU, H. Comparison of the Levels of Bacterial Diversity in Freshwater , Intertidal Wetland , and Marine Sediments by Using Millions of Illumina Tags. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8264–8271, 2012.

WANG, Z.; ZHANG, X. X.; LU, X.; LIU, B.; LI, Y.; LONG, C.; LI, A. Abundance and diversity of bacterial nitrifiers and denitrifiers and their functional genes in tannery wastewater treatment plants revealed by high-throughput sequencing. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–19, 2014.

WASI, S.; TABREZ, S.; AHMAD, M. Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 10, p. 8147–8155, 2013.

WEBER, K. P.; GROVE, J. A.; GEHDER, M.; ANDERSON, W. A.; LEGGE, R. L. Data transformations in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 461–469, 2007.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J.; PELLETIE, D. a; LANE, D. J.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.

YANG, J. S.; CAO, J.; XING, G. L.; YUAN, H. L. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 537–544, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.124>>.

ZAK, J. C.; WILLIG, M. R.; MOORHEAD, D. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 9, p. 1101–1108, 1994.

ZHANG, C.; LI, F.; LV, J. Morphology and formation mechanism in precipitation of calcite induced by. **Journal of Crystal Growth**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrysgr.2017.08.019>>.

ZHAO, L. Y. L.; MCCULLOUGH, C. D.; LUND, M. A.; MANAGEMENT, M. for E. **Pit Lake Resources of the Collie Basin. MiWER/Centre for Ecosystem Management Report 2009-10 Edith Cowan University**. Perth, Australia. 215pp. Unpublished report to Department of Water, 2009.

ZWART, G.; CRUMP, B. C.; KAMST-VAN AGTERVELD, M. P.; HAGEN, F.; HAN, S. K. Typical freshwater bacteria: An analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 28, n. 2, p. 141–155, 2002.

CAPÍTULO 3 - Diversidade e estrutura funcional de comunidades microbianas presentes na água de uma cava de mineração

RESUMO - Utilizando técnicas metagenômicas, foram determinadas a diversidade da comunidade microbiana e o potencial funcional de um ambiente que sofreu intervenção pela atividade mineradora. Amostras de água foram coletadas de uma Cava de mineração de ferro desativada, localizada em uma área em processo de recuperação do Centro de Biodiversidade (CEBIO) da empresa VALE/SA, em Sabará/MG-Brasil. A análise metagenômica da comunidade microbiana foi realizada pelo sequenciamento do DNA total utilizando a plataforma ION Proton. O perfil taxonômico revelou uma comunidade microbiana complexa, com predominância do domínio Bacteria (79,8%), seguido de Eucaryota (19,85%) e Archaea (0,1%), onde grande parte dos organismos bacterianos foi atribuída aos filos Proteobacteria (33%) e Actinobacteria (11%), para o domínio Eucaryota, a maioria dos integrantes pertence à flora aquática comum, com os filos Chlorophyta (55,5%) e Streptophyta (29,1%), e para o domínio Archaea, representantes dos filos Thaumarchaeota (71,4%) e Crenarchaeota (28,5%), diretamente relacionados com o ciclo do N. A análise funcional dos genes identificados no metagenoma utilizando o banco de dados SEED revelou genes associados à manutenção celular e ao ciclo do nitrogênio, sugerindo que a comunidade microbiana está bem adaptada ao processo de recuperação da área. ORFs preditas do metagenoma foram utilizadas para uma análise para resistência a metais no banco de dados BacMet, revelando uma abundância de genes relacionados a metais. Estes resultados expandem os conhecimentos sobre a estrutura e capacidade funcional das comunidades microbianas de ambientes aquáticos impactados, fornecendo uma melhor compreensão do papel dos micro-organismos em processos de remediação natural.

Palavras - chave: diversidade microbiana, genes de resistência a metais, metabolismo do nitrogênio, metagenômica, mina de ferro

1. Introdução

A atividade mineradora pode ser entendida como o ato, o processo ou o trabalho de se extrair minérios ou minerais industriais de seu ambiente natural e transportá-los até o ponto de seu tratamento ou uso. No entanto, esta atividade pode afetar negativamente a qualidade da água e do solo em seu entorno, ameaçando a saúde humana e os ecossistemas (BEALL, 1973; HONG et al., 2015). A indústria da mineração do ferro tem grande importância econômica no Brasil. O quadrilátero ferrífero localizado no centro sul do estado de Minas Gerais é uma das maiores e mais ricas estruturas de depósito mineral em todo o mundo (DESCHAMPS et al., 2002). O último anuário mineral brasileiro elaborado pelo Departamento Nacional de Produção Mineral mostra que no ano de 2015 a extração de ferro no Brasil teve uma produção comercializada de mais de 42 bilhões de reais com uma produção bruta de 525 milhões de toneladas de ferro.

O acúmulo de metais pesados na água e no solo é uma consequência da indústria extrativista tanto do ferro quanto de outros minerais, causando problemas ambientais. Nos últimos anos, várias tecnologias foram desenvolvidas com o objetivo de reduzir ou remover os metais do ambiente, e muitas dessas tecnologias são baseadas no uso de micro-organismos que podem solubilizar, adsorver ou precipitar metais em solução aquosa (CABRERA; GÓMEZ; CANTERO, 2005).

A descoberta da dimensão da diversidade microbiana e das interações entre os micro-organismos em ambientes complexos tem aumentado o interesse no estudo de comunidades microbianas de ambientes pouco avaliados, impactados ou extremos, e dentre esses ambientes, a interferência da atividade mineradora se destaca pelo grau de impacto causado e a importância econômica associada. Nesse aspecto, o interesse se justifica principalmente pelo conhecimento da grande potencialidade que a população microbiana desses locais têm para aplicação em processos relacionados à “*White Biotechnology*” (LOUIS; POIRIER; BIOTECHNOLOGY, 2003). Os micro-organismos como participantes ativos nos processos de ciclagem de materiais podem apresentar características importantes em processos de biorremediação, biomineração e em outros diversos segmentos produtivos.

Para revelar novos micro-organismos, genes e proteínas com potencial biotecnológico na capacidade de reduzir ou remover metais, foi obtido um avanço nos estudos de ecologia microbiana, ampliado com o advento de técnicas moleculares baseadas na análise do DNA de micro-organismos retirados diretamente dos ambientes naturais, sem a necessidade de isolamento e multiplicação prévia das células (PACE, 1997). O sequenciamento de DNA de nova geração pode fornecer um resultado mais direto da população microbiana em amostras de diversos ambientes, incluindo água e sistemas de águas residuais (GILBRIDE; LEE; BEAUDETTE, 2006).

O objetivo deste trabalho foi utilizar a abordagem metagenômica pela técnica de shotgun a partir de DNA extraído de amostras de água acumulada em uma Cava de mineração desativada para entender a estrutura da comunidade microbiana no local e avaliar seu potencial funcional para aplicação biotecnológica.

2. Material e Métodos

As etapas referentes a seção material e métodos estão resumidas no fluxograma abaixo (Figura 1).

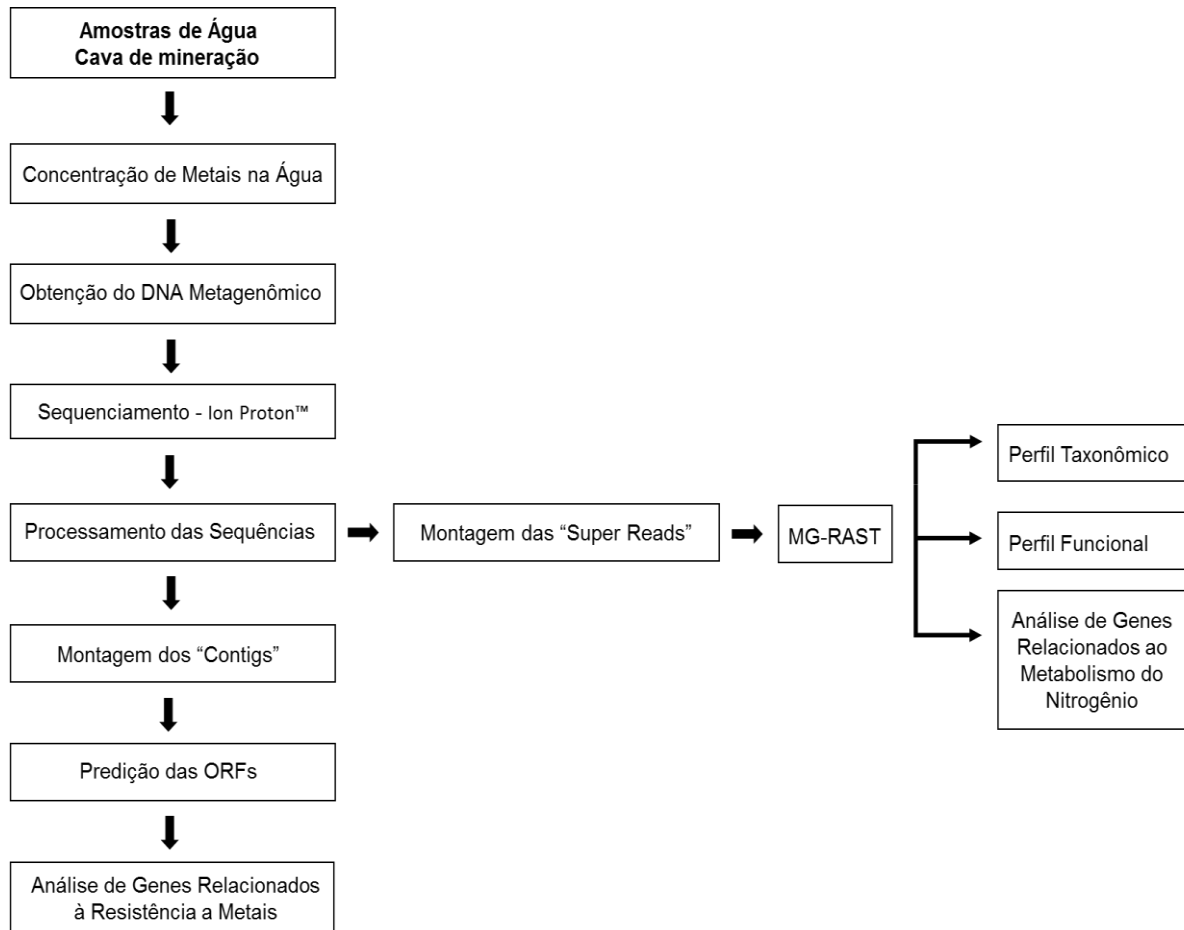


Figura 1. Fluxograma das atividades desenvolvidas.

2.1 Áreas de estudo e coleta de amostras

As amostras de água utilizada neste estudo foram retiradas de uma Cava de mineração de uma região anteriormente utilizada para extração de minério de ferro pertencente ao Centro de Biodiversidade (CEBIO) da empresa VALE/SA, em Sabará/MG, Brasil.

As amostras da água da Cava foram coletadas no dia 13 de setembro de 2013 nas seguintes coordenadas: 19°51'41.34"S/ 43°47'25.39"O (Figura 2). A região de Sabará é caracterizada por possuir clima quente e temperado com período de chuvas no verão e seca no inverno. As amostras foram coletadas no período considerado de seca com um total de 32,8 mm de precipitação e temperatura média de 21°C no mês de setembro.

A coleta da água da Cava foi realizada com o auxílio da garrafa de Van Dorn em um único ponto, na região central da Cava, em 3 profundidades: superfície, 6m e 12 m (chegando ao fundo), em triplicata, e armazenadas em recipientes plásticos estéreis de 500 mL. As amostras foram transportadas em isopor contendo gelo até chegarem ao laboratório, para a extração do DNA metagenômico.

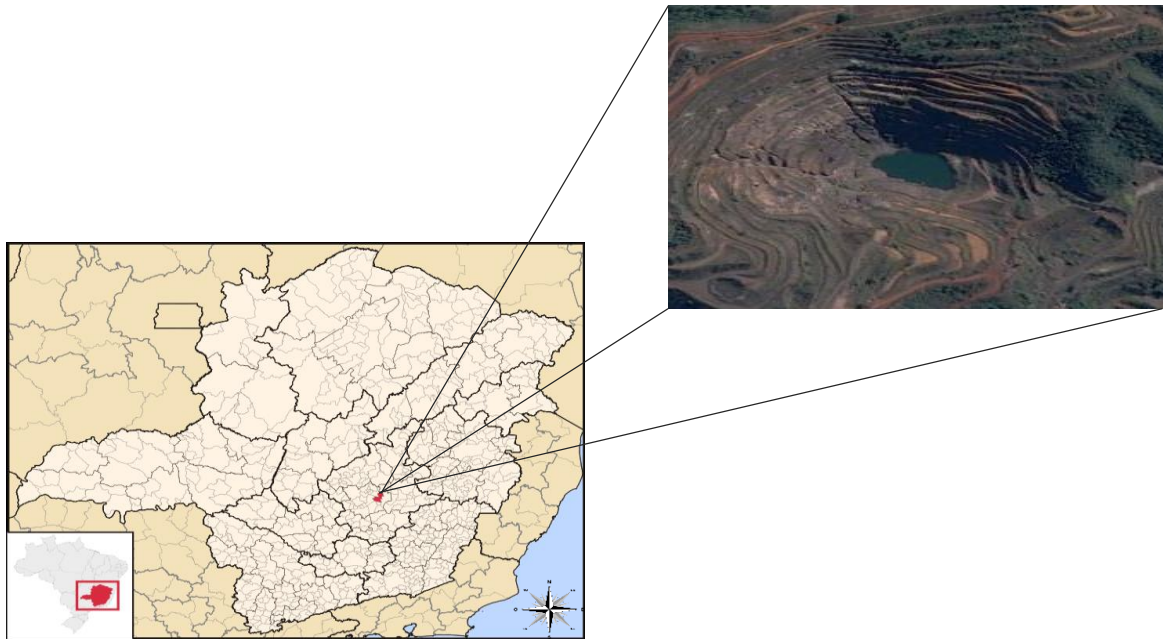


Figura 2. Imagem da Cava de mineração recuperada pelo *Google Earth*, localizada em Sabará, município do estado de Minas Gerais-Brasil.

2.2 Análise da concentração de metais na água

Para realizar a determinação dos metais, as triplicatas das 3 profundidades foram agrupadas em uma única amostra. A análise do teor de metais na amostra de água foi feita em um espectrômetro de absorção atômica modelo AAnalyst800

(PerkinElmer), utilizando um atomizador de forno de grafite. Os metais analisados foram: Mn, Fe, Zn, Cu, Cr, Pb, Ni, Cd, Al, As e Hg.

2.3 Extração do DNA metagenômico

Para a extração do DNA 1,5 L de cada amostra de água foi filtrada a vácuo em membranas de 0,45 µm estéreis (Millipore Express®). Após a filtragem, cada membrana foi separadamente submetida à extração do DNA total das bactérias utilizando o kit Power Water DNA Isolation (Mo Bio®), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas e avaliadas quanto a sua pureza em espectrofotômetro Nano Drop ND-1000 (Thermo Scientific).

A qualidade do DNA metagenômico foi avaliada por eletroforese realizada em uma cuba Max Cell EC 360M- (Loccus), conduzida em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3), em gel de agarose 0,8% acrescido de brometo de etídio (0,5 mg/mL) durante aproximadamente 2 h, a voltagem constante de 90V. O perfil eletroforético foi visualizado sob luz UV e documentado através do equipamento para documentação de géis, GEL DOC Universal Hood II (BIO-RAD) (SAMBROOK, JF RUSSELL, 2001).

2.4 Preparação da biblioteca de DNA para sequenciamento

Para o preparo do DNA metagenômico da água da Cava de mineração para sequenciamento, foi feito um “pool” com as triplicatas de cada amostra de DNA. As amostras foram quantificadas no aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) com o kit Qubit™ DNA HS Assay Kit seguindo-se as recomendações do fabricante. Posteriormente as amostras foram fragmentadas enzimaticamente (~200 bp), de acordo com as recomendações do kit Ion Express Plus gDNA Fragment Library Preparation (Thermo Fisher Scientific). A validação da biblioteca foi realizada utilizando o 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, Calif.).

A biblioteca de DNA metagenômico foi sequenciada na plataforma ION Proton (Thermo Fisher Scientific), utilizando-se o chip PI e os kits Ion PI Template OT2 200 v3 e o Ion PI Sequencing 200 v3 (Thermo Fisher Scientific).

2.5 Processamento das sequências, montagem e anotação gênica

A qualidade das sequências no formato FASTQ foram analisadas com o programa FastQC v0.10 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Bases com qualidade inferior a phred 20 e com tamanho mínimo de 50 pb foram descartadas utilizando o programa Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014).

Uma montagem para gerar “super reads” foi realizada com o programa MaSuRCA (ZIMIN et al., 2013), utilizando parâmetros “default”. Os “super reads” obtidos foram submetidos na plataforma de anotação de dados metagenômicos MG-RAST (MEYER et al., 2008), que faz análises metagenômicas automatizadas, como predição de rDNA, genes e funções de proteínas. A análise taxonômica foi realizada utilizando o banco de dados RDP (COLE et al., 2003), e para a análise funcional de genes, foi utilizado o banco de dados SEED, disponível no MG-RAST, com os parâmetros de corte de e-value 1×10^{-5} e 60% de identidade. Gráficos foram obtidos utilizando-se o programa SigmaPlot 13.0.

A montagem dos “contigs” foi realizada com o SPADES (BANKEVICH et al., 2012), utilizando os parâmetros padrão do programa. Para a predição de ORFs (Open Reading Frames), foi utilizada a ferramenta Prodigal 2.6.1 (HYATT et al., 2010). As ORFs preditas foram submetidas ao banco de dados BacMet (PAL et al., 2014) para a análise de genes de resistência a metais, e os resultados, visualizados através do software Circos (CONNORS et al., 2009).

3. Resultados

3.1 Avaliação da água quanto a concentração de metais e pH

Foram identificados 5 diferentes metais na Cava de mineração: Alumínio ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$), Cobre ($0,83 \text{ mg L}^{-1}$), Ferro ($55,83 \text{ mg L}^{-1}$), Manganês ($1,17 \text{ mg L}^{-1}$) e Níquel,

com 0,17 mg L⁻¹. Os outros metais analisados (As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb e Zn) não apresentaram concentração suficiente para leitura. A água da Cava de mineração apresentou pH 5, não havendo diferença de pH entre as profundidades coletadas.

3.2 Sequenciamento do DNA metagenômico

Os dados gerados pelo sequenciamento em plataforma ION Proton para a amostra de água da Cava de mineração, resultou em 9.0 GBp de dados (86.846.085 “single reads”), com comprimento médio de leitura de 104 pb. Após a análise do filtro de qualidade, foram removidas 35.886.207 “reads”, tendo passado pelo controle de qualidade 50.959.878, onde estes foram submetidos para a plataforma MG-RAST para avaliar a diversidade bacteriana e predição funcional dos genes, disponível sob o ID 4690189.3.

O resultado da montagem do metagenoma da água da Cava com o programa SPADES resultou em 139.855 “contigs”, sendo o maior “contig” com 359.997 pb, e N50 de 1.656. A partir da ferramenta Prodigal foram preditas 258.230 ORFs.

3.3 Diversidade taxonômica

A análise de diversidade taxonômica da água da Cava de mineração revelou 4.690 sequências com similaridade ao banco de dados RDP, sendo a maioria delas pertencente ao domínio Bacteria (79,8%), seguido de Eucariotos (19,8%), Archaea (0,1%) e sequências não classificadas (0,1%).

A Figura 3 mostra a filiação taxonômica em nível de filo e classe dos organismos mais abundantes. Os filios bacterianos mais predominantes foram Proteobacteria (33%) e Actinobacteria (11%), grande parte dos filios foram atribuídos a sequências não classificadas (42,09%), sendo que a alta porcentagem de sequências não classificadas sugere que podem corresponder novos táxons ou não possuir relação com o banco de dados RDP. No total foram identificados 15 filios, a maioria com poucos representantes, mas que possuem grande interesse para busca de genes

biotecnologicamente importantes. As Proteobactérias foram representadas pelas classes Alphaproteobacteria (7,4%), Betaproteobacteria (12,9%), Deltaproteobacteria (0,5%) e Gammaproteobacteria (11,9%) (Fig. 3C).

No metagenoma da água da Cava de mineração foi possível identificar 6 filos de eucariotos (Figura 2B), sendo a maioria representada pela flora aquática comum, como Chlorophyta (55,5%) e Streptophyta (29,1%), e em uma menor porcentagem, representantes de fungos e protozoários, 0,1 % e 0,5 % respectivamente (Fig. 3B e D). A filiação taxonômica do domínio Archaea revelou dois filos, Thaumarchaeota e Crenarchaeota, representando apenas 0,1% do total das sequências atribuídas.

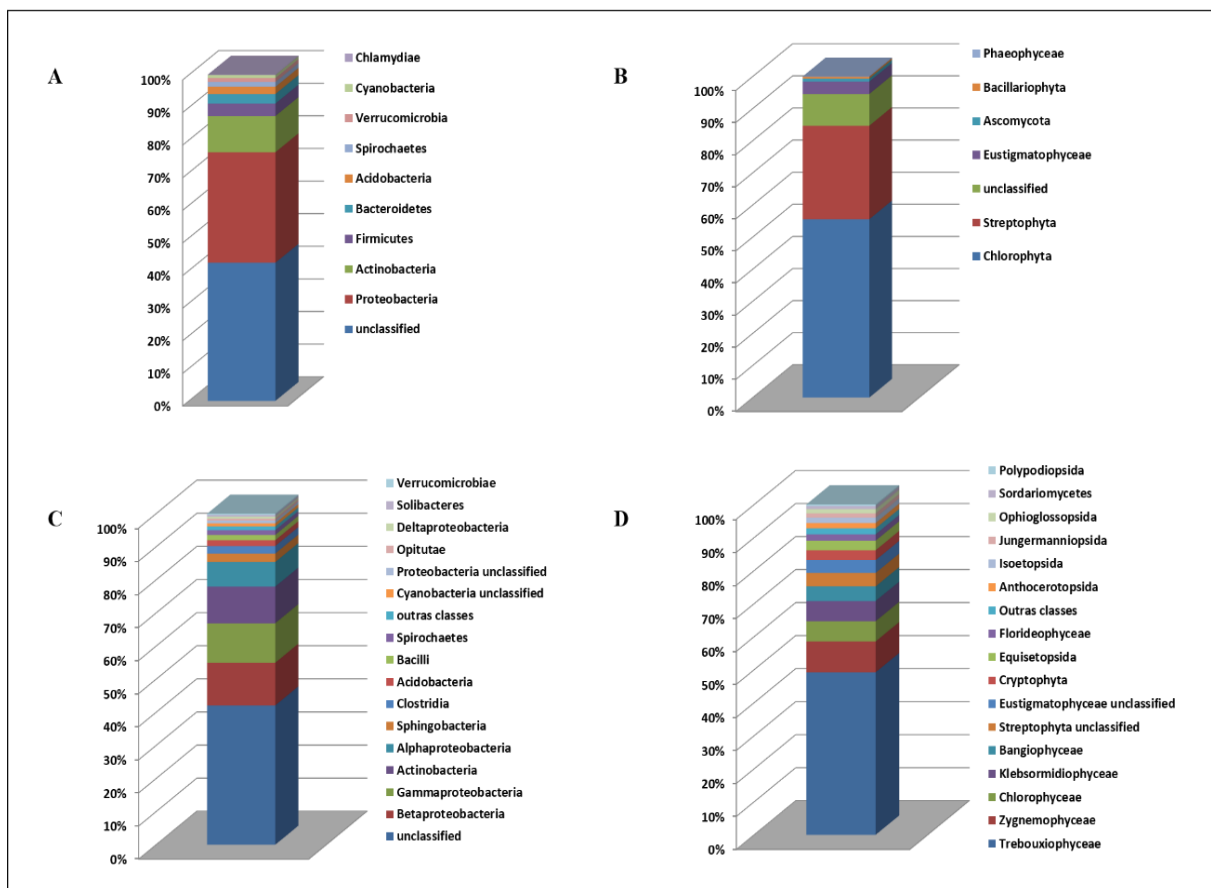


Figura 3. Composição taxonômica da água baseada no banco de dados RDP dos principais grupos observados: (A) filos bacterianos (B) filos eucarióticos (C) classes bacterianas (D) classes eucarióticas.

3.4 Diversidade funcional

Vinte e oito subsistemas funcionais foram identificados no metagenoma da água da Cava, com um total de 418.617 “reads” anotados (Figura 4). Entre as categorias funcionais identificadas pelo MG-RAST, destacaram-se quatro como dominantes: “clustering-based subsystems” (11,8%), metabolismo de carboidratos (11,3%), genes associados ao metabolismo de aminoácidos e derivados (9,6%) e metabolismo de proteínas (9,4%).

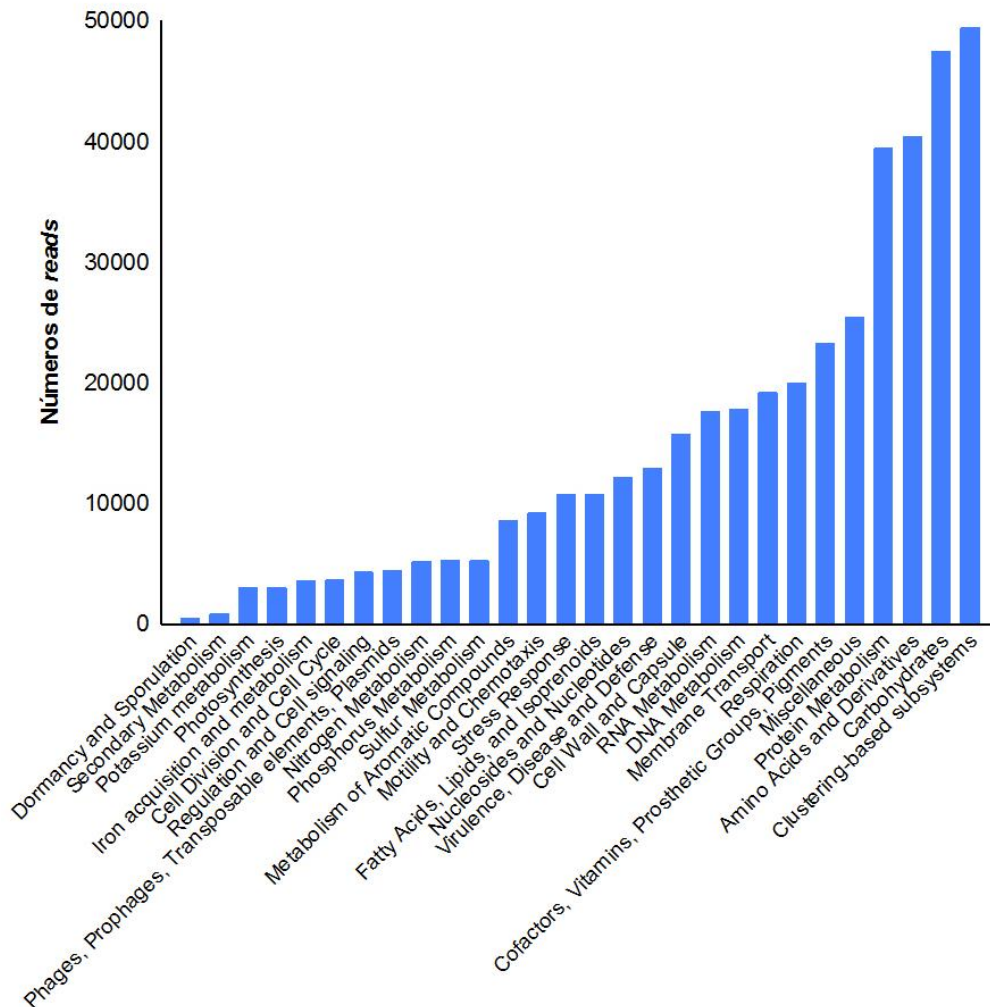


Figura 4. Categorias funcionais, nível 1, identificadas pelo MG-RAST no metagenoma da água da Cava através do banco de dados SEED. Os parâmetros de corte foram e-value 1×10^{-5} e 60% de identidade.

A Figura 5, mostra a identificação para as categorias funcionais dentro do subsistema “Virulence, Disease and Defense”, onde foram encontrados genes relacionados à resistência a antibióticos e resistência a metais. A resistência a antibióticos e a compostos tóxicos como os metais é extremamente importante para a sobrevivência e adaptação microbiana em ambientes contaminados (SILVA et al., 2012), e foram os subsistemas baseados em agrupamento mais abundantes dentro do metagenoma da água da Cava (87%).

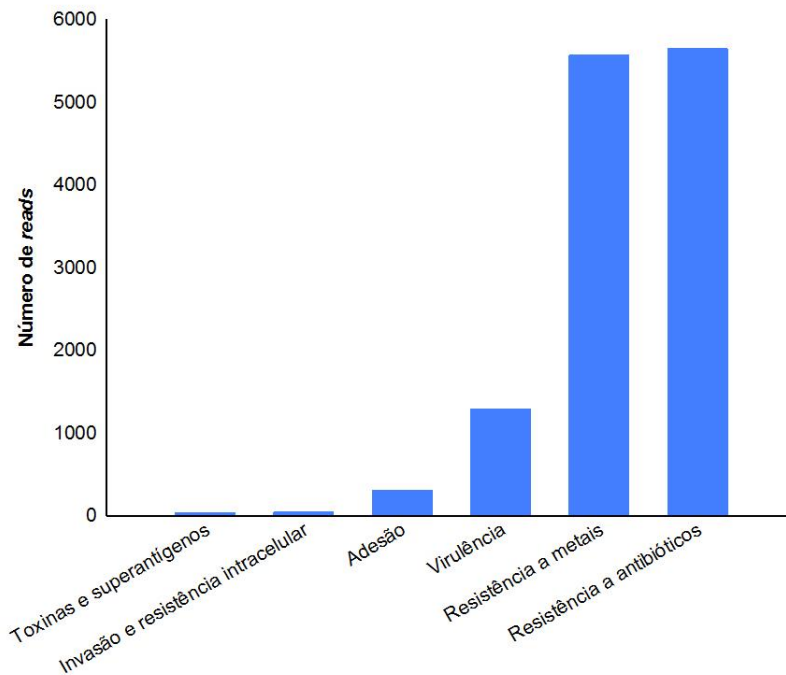


Figura 5. Atribuição funcional do Subsistema “Virulence, Disease and Defense” identificado pelo MG-RAST no metagenoma da água da Cava através do banco de dados SEED.

Considerado de fundamental importância no metagenoma da água da Cava o subsistema “Iron acquisition and metabolism” foi identificado com 0,8% (3.561 “reads”). Dentro desse subsistema observaram-se diversas categorias funcionais como aquisição, transporte e metabolismo de ferro e compostos sideróforos,

apresentadas na Figura 6. Essas categorias funcionais estão relacionadas com os diversos mecanismos que os micro-organismos possuem para utilizar o ferro presente no ambiente.

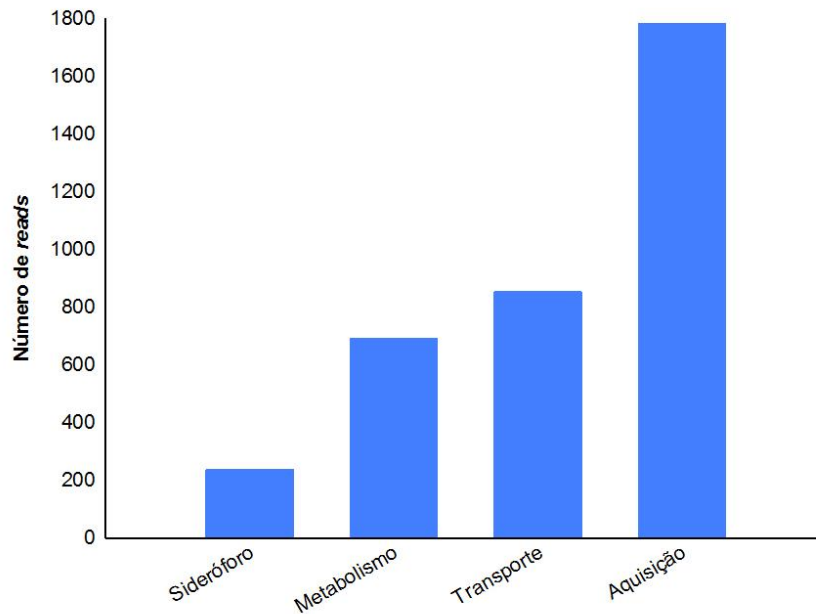


Figura 6. Atribuição funcional do subsistema “Iron acquisition and metabolism” identificado pelo MG-RAST no metagenoma da água da Cava utilizando o banco de dados SEED.

3.5 Resistência a metais

Alguns metais possuem um importante papel em processos vitais dos micro-organismos, são nutrientes necessários e essenciais, mas a maioria pode ser considerada não essencial e possui efeito tóxico para os micro-organismos (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000). No metagenoma da água da Cava foram identificados 3.036 genes associados ao metabolismo de metais essenciais e à resistência a metais não essenciais. A Figura 7 nos mostra que a maioria foi representada por genes relacionados à resistência aos metais Zinco (12,3%), Cobre (12,1%), Níquel (11,3%), Ferro (7,31%). Além disso, foi observada a grande quantidade de genes resistentes a

múltiplos metais, com destaque para Tungstênio-Molibdênio (8,3%), Cobre-Prata (3,4%), Cromo-Telúrio-Selênio (3%) e Ferro-Gálio (3%).

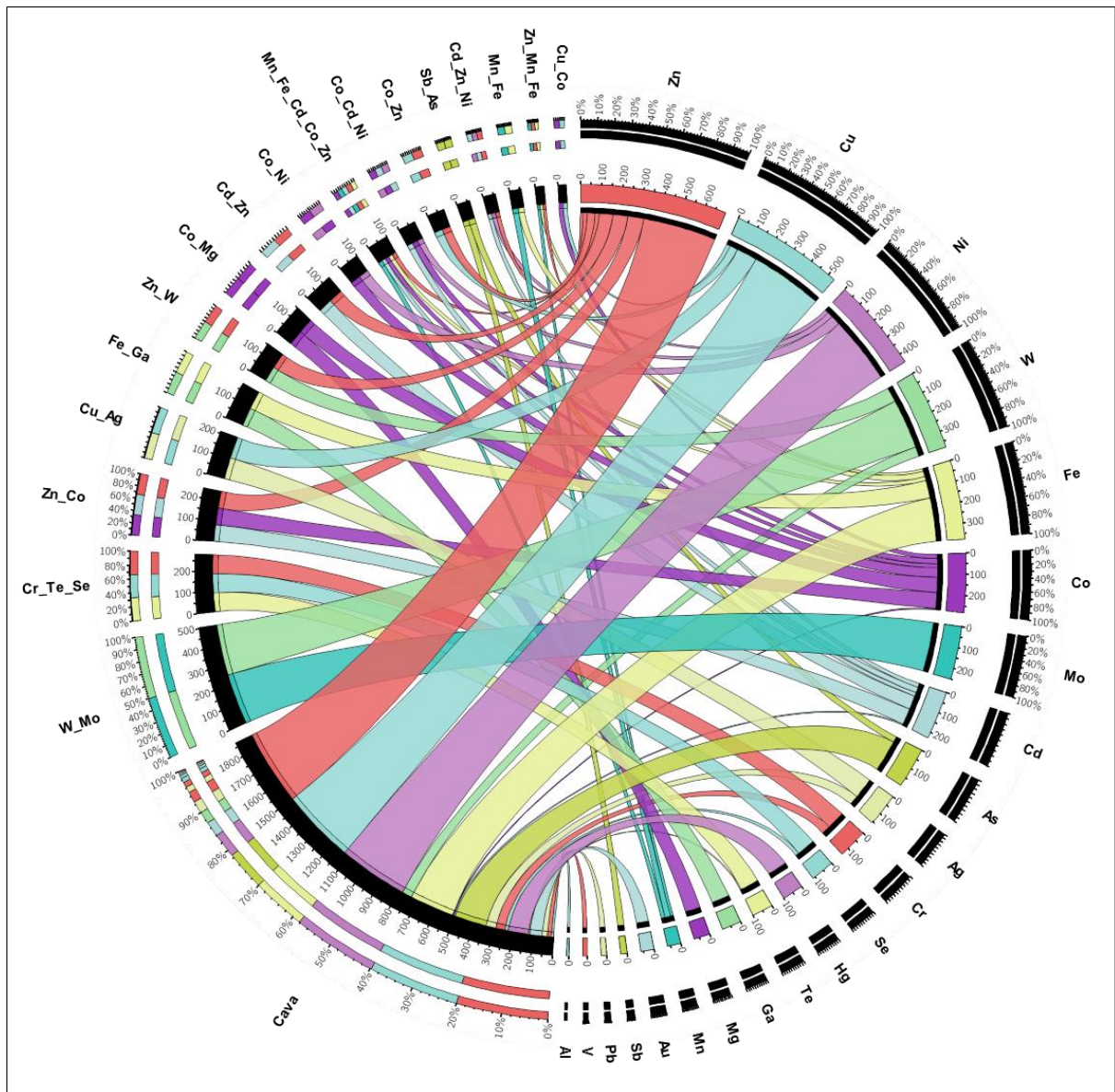


Figura 7. Genes relacionados à resistência a únicos e múltiplos metais no metagenoma da água da Cava. As ORFs preditas foram utilizadas para a análise com o banco de dados BacMet. O comprimento das barras e dos anéis exteriores representam a porcentagem dos genes identificados.

3.6 Metabolismo do nitrogênio

Águas residuárias de mineração podem conter altas concentrações de nitrogênio, provenientes de substâncias químicas utilizadas em processos de enriquecimento ou da detonação de explosivos que contem nitrogênio (JERMAKKA et al., 2015). Apesar de ser um macro nutriente importante em sistemas aquáticos, o nitrogênio, quando presente em grandes quantidades, também pode ser um potencial risco ambiental, podendo causar eutrofização da água. Portanto, analisamos através do banco de dados SEED os genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio. Esta análise revelou a presença de vários genes envolvidos com a utilização de alantoína (6,3%), assimilação de amônia (58,5%), hidrólise de cianato (3,2%), desnitrificação (0,7%), amonificação de nitratos e nitritos (27,4%), síntese de óxido nítrico (3,2%) e estresse nitrosativo (0,6%) (Tabela 1).

Tabela 1. Proteínas mais frequentes relacionadas ao metabolismo do nitrogênio identificado pelo MG-RAST no metagenoma da água da Cava através do banco de dados SEED.

Proteínas	Número de "reads"
Utilização de Alantoína	289
2-hydroxy-3-oxopropionate reductase (EC 1.1.1.60)	31
Allantoate amidohydrolase (EC 3.5.3.9)	58
Allantoinase (EC 3.5.2.5)	31
Glyoxylate carboligase (EC 4.1.1.47)	124
Ureidoglycolate dehydrogenase (EC 1.1.1.154)	45
Assimilação de Amônia	2759
Ammonium transporter	587
Ferredoxin-dependent glutamate synthase (EC 1.4.7.1)	82
Glutamate synthase [NADPH] large chain (EC 1.4.1.13)	749
Glutamate synthase [NADPH] small chain (EC 1.4.1.13)	46
Glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferase (EC 2.7.7.42)	136
Glutamine amidotransferase, class-II	94
Glutamine synthetase type I (EC 6.3.1.2)	178
Nitrogen regulation protein NR(I)	372
Nitrogen regulation protein NR(II) (EC 2.7.3.-)	98
Nitrogen regulatory protein P-II	261
[Protein-PII] uridylyltransferase (EC 2.7.7.59)	156
Hidrólise de Cianato	155
Cyanate ABC transporter, ATP-binding protein	36
Cyanate ABC transporter, permease protein	36
Cyanate ABC transporter, substrate binding protein	52
Cyanate hydratase (EC 4.2.1.104)	31
Desnitrificação	33
NnrU family protein	33
Amonificação de Nitratos e Nitritos	1292
Assimilatory nitrate reductase large subunit (EC:1.7.99.4)	288
Nitrate ABC transporter, ATP-binding protein	58
Nitrate ABC transporter, nitrate-binding protein	145
Nitrate ABC transporter, permease protein	51
Nitrate/nitrite transporter	243
Nitrite reductase [NAD(P)H] large subunit (EC 1.7.1.4)	281
Respiratory nitrate reductase alpha chain (EC 1.7.99.4)	119
Respiratory nitrate reductase beta chain (EC 1.7.99.4)	77
Response regulator NasT	30
Síntese de Óxido Nítrico	153
putative cytochrome P450 hydroxylase	153
Estresse Nitrosativo	32
Anaerobic nitric oxide reductase flavorubredoxin	32

4. Discussão

A análise taxonômica da água da Cava de mineração revelou uma comunidade bacteriana complexa. Dados obtidos através do banco de dados RDP indicaram as Proteobacteria como o mais abundante filo, com quatro classes identificadas Alfa- (22%), Beta- (38%), Gamma- (35%) e Deltaproteobacteria (1%). As Proteobacteria têm sido frequentemente encontradas em ambientes de minas, e é sabido que por sua capacidade degradante de várias moléculas orgânicas complexas, determinam grande poder de adaptação e recuperação de diferentes ambientes (PEREIRA; VICENTINI; OTTOBONI, 2014).

Foram identificados 67 gêneros pertencentes às Proteobacteria. Dentre eles estão importantes gêneros envolvidos com o processo de biolixiviação e abundantemente encontrados em ambientes ácidos com a presença de ferro, como *Acidiphilum* e *Acidithiobacillus*. Estudos anteriores mostraram que a interação destes dois gêneros tem efeito benéfico mútuo pois o sinergismo dessas espécies ativa genes relacionados à oxidação do ferro e ao aumento da fixação de CO₂, tornando o processo de biolixiviação mais eficiente (LIU; YIN; DAI, 2011). Pertencente às Proteobacteria, também foram identificados gêneros como *Alcanivorax*, que podem usar alcanos como única fonte de carbono (SHIGEAKI HARAYAMA, YUKI KASAI, 2004), *Desulforhabdus* e *Desulfovibrio*, que são conhecidos por serem bactérias anaeróbias capazes de reduzir sulfato, ferro e oxidar metano (SALAM et al., 2017). Outros dois gêneros que desempenham papel importante em ambientes contaminados com metal dentro do filo das Proteobacteria são o *Thiobacillus* e o *Thiomonas*.

Thiomonas é identificado como um gênero de bactérias extremófilas e encontrada em ambientes contaminados com Arsênio que são oxidantes de As III e obtêm energia com a oxidação de compostos reduzidos de enxofre inorgânico (BRYAN et al., 2009; MULLER et al., 2007). *Thiobacillus* também é conhecido por desempenhar um papel importante no ciclo do nitrogênio, bem como oxidar formas reduzidas de enxofre inorgânico. Este gênero oxidante de ferro também é tolerante a 3,5% de cloreto de sódio, o que equivale a 0,6 M, enquanto que a maioria das bactérias oxidantes de ferro toleram no máximo 0,1M de sal (HEDRICH; SCHLÖMANN; BARRIE JOHNSON, 2011).

As Actinobacteria foram o segundo filo mais abundante identificado na água da Cava de mineração com 11% das sequências. Este filo é importante para remediação de metais devido ao seu metabolismo e a capacidade de colonizar rapidamente substratos seletivos (NARENDRULA-KOTHA; NKONGOLO, 2017). Com 63% de abundância nas Actinobacteria identificadas, o gênero *Arthrobacter* é conhecido por remover metais pesados como chumbo, níquel e cádmio, além de oxidar Cr IV em Cr III em efluentes líquidos (HLIHOR et al., 2017; GELAGUTASHVILI; PATARAIA; GURIELIDZE, 2011).

Na Figura 3 são observados os filios e classes identificados no sequenciamento de amostras da água da Cava de mineração, inclusive os filios menos abundantes, que não podem ser considerados menos importantes, pois pequenas comunidades podem ser cruciais para as relações bioquímicas e funções do ecossistema em estudo.

Como exemplo, o filo Verrucomicrobia, com apenas 1,2% das sequências identificadas. Sendo as bactérias deste filo morfologicamente diversas e capazes de metabolizar uma variedade de compostos de carbono, sendo conhecidas por serem metanotróficas aeróbicas, capazes de utilizar o metano como única fonte de carbono. As bactérias deste filo já foram isoladas de ambientes geotérmicos na Itália, Nova Zelândia e Rússia (DUNFIELD et al., 2007; ISLAM et al., 2008). Alguns de seus gêneros são extremófilos, sendo capazes de crescer em pH = 1 e suportar temperaturas de até 65°C (OP DEN CAMP et al., 2009), tornando-se as metanotróficas mais acidófilas conhecidas. O integrantes do filo Verrucomicrobia são capazes de utilizar celulose, xilana e pectina. Herlemann, Lundin e Labrenz (2013) reconstruíram o genoma e estudou o potencial metabólico de um Verrucomicrobiota da classe Spartobacteria, também identificada em nosso estudo. A partir de amostras do mar báltico, os autores encontraram alta frequência de genes codificadores de glicosil hidrolases que provavelmente permitem o uso de uma variedade de carboidratos, sugerindo assim sua importância no ciclo do carbono em ambientes aquáticos.

Nesse ambiente foram identificados, ainda, membros do filo Firmicutes (3,8%), Acidobacteria (2,3%), Bacteroidetes (3%) e Spirochaetes (1,4%), que podem ocorrer também em ambientes aquáticos como lagos e oceanos, mas são encontrados em

menores quantidades (NEWTON et al., 2011). Com destaque para o filo Firmicutes, Samanta et al. (2012) observaram que espécies do gênero *Bacillus* têm tolerância e resistência a vários metais pesados e antibióticos, sendo este gênero também conhecido por possuir mecanismos de adsorção de metais pela parede celular (MORIWAKI; YAMAMOTO, 2013). Tal gênero foi encontrado em nossas amostras com 2,7% das sequências relacionadas ao filo Firmicutes.

Os eucariotos representaram 19,8% das leituras na análise do metagenoma da água da Cava de mineração. A grande maioria das sequências foi atribuída à flora aquática comum (98%), com maior incidência do filo Chlorophyta e com destaque para os gêneros *Auxenochlorella*, *Chlamydomonas* e *Chlorella*.

Algas do filo Chlorophyta são frequentemente encontradas em ambientes de minas com águas com pH ácido, sendo que alguns gêneros atuam como produtores primários nesses ambientes, sendo considerados mixotróficos (ÑANCUCHEO; JOHNSON, 2012). As algas são amplamente conhecidas e estudadas pela sua eficácia no tratamento de águas residuais, remoção de nutrientes, remoção de produtos químicos e metais pesados, produção de biodiesel, além de inúmeras outras aplicações (TOFANA; MIHAIESCU; ODAGIU, 2016). As microalgas têm sido estudadas pela sua capacidade de incorporar íons metálicos no vacúolo celular.

O gênero *Chlorella* com 35% de abundância dentro do domínio eucarioto em nossas amostras, é uma alga oleaginosa que mostrou alto desempenho na produção de lipídios e remoção de metais (Zn, Mn, Cd e Cu) por biosorção e bioacumulação em um sistema de água residual artificial (YANG et al., 2015). Ñancucho e Johnson (2012) observaram que *Chlorella* cresceu na presença de 10 a 50 mM de Ferro ferroso e férrico, e forneceu hipóteses sobre os benefícios da interação entre algas e bactérias acidófilas para prevenção e remoção de metais em minas.

Esses estudos são de fundamental importância pois nos sugerem que a presença desta alga na água da Cava de mineração e sua interação com as comunidades bacterianas pode estar auxiliando na remoção de ferro na água, ajudando a diminuição do impacto causado pela exploração deste ambiente.

Os integrantes do domínio Archaea geralmente são bem adaptados em ambientes extremos como altas temperaturas, baixo pH, altas concentrações de ferro e outros metais (BRUNEEL et al., 2008). Pertencentes aos filios Thaumarchaeota e

Crenarchaeota, as Archaea representaram 0,1% do total das sequências atribuídas. Todos os integrantes do domínio Archaea identificados no metagenoma da água da Cava estão relacionados com o ciclo do nitrogênio, entre eles, os gêneros *Candidatus Nitrososphaera*, *Cenarchaeum*, *Nitrosopumilus* e *Thermocodium*. Estes micro-organismos também foram detectados em colunas de água do rio Amazonas, indicando a importância dessas espécies no ciclo do nitrogênio (N) em ambientes de água doce (PORAT et al., 2010; MCMAHON et al., 2011). Alguns destes gêneros também foram identificados em sedimento de água doce tropical contaminado com metal no quadrilátero ferrífero (COSTA et al., 2015).

Na categorização do potencial funcional das comunidades presentes na água da Cava, destacou-se com a maioria dos “reads” o subsistema “clustering-based subsystems” (11,8%). Esta categoria refere-se a um conjunto de genes relacionados entre si, mas que não possui uma função clara. Esta categoria também foi encontrada como a mais abundante em amostras de água doce no bioma Caatinga no Brasil (ANDRADE et al., 2017). Outros subsistemas identificados em maior abundância foram relacionados a genes associados à manutenção de básica de células, como metabolismo de carboidratos (11,3%), genes associados ao metabolismo de aminoácidos e derivados (9,6%) e metabolismo de proteínas (9,4%) (Figura 4).

É sabido que alguns metais, quando em quantidade mínima, são de fundamental importância para os micro-organismos, estão presentes nos centros ativos de muitas enzimas e suas propriedades são úteis para catalisar reações chave ou para manter a estrutura protéica. Mas quando em excesso, os metais podem causar sérios problemas, exercendo uma ação inibitória nos micro-organismos através do bloqueio de enzimas, do sistema de transporte de nutrientes e substituição de íons essenciais ou até mesmo a alteração da estrutura conformacional de ácidos nucleicos e proteínas (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000). O metagenoma da Cava de mineração apresentou uma grande quantidade de genes codificadores para resistência a metais, com destaque para os metais de transição níquel, zinco e cobre, que são essenciais para as células. Os genes de resistência ao níquel foram identificados como os mais abundantes em nossa amostra com 12,3%. O níquel também é considerado elemento traço essencial e constituinte de enzimas como as hidrogenases, desidrogenases e ureases, mas quando em excesso pode interagir com outros componentes celulares

como aminoácidos e nucleotídeos, causando problemas nas atividades enzimáticas das células (CHAUDHARY et al., 2017).

O zinco representou 12,3% dos genes identificados. Considerado menos tóxico que outros metais, os genes de resistência relacionados à resistência ao zinco e ao grupo cobalto-zinco-cádmio (2,7%) são transportados pela célula bacteriana através de um mecanismo onde proteínas de membrana denominadas Czc (czcA, czcB, czcC) são responsáveis pela expressão de uma bomba de efluxo que transporta os íons Co^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} do citoplasma para fora da célula bacteriana (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000).

O segundo grupo mais abundante foi o relacionado à resistência ao cobre (12,1%). A presença de genes relacionados à resistência ao cobre pode estar ligada a mecanismos de proteção celular, pois o cobre é essencial para a célula bacteriana, mas pode ser tóxico mesmo em baixas concentrações. Para lidar com isso são necessários mecanismos para controlar a disponibilidade intracelular de cobre (OUTTEN et al., 2001).

Em destaque na Figura 7, observamos a grande quantidade de genes resistentes a múltiplos metais, como: Tungstênio-Molibdênio (8,3%), Cobre-Prata (3,4%), Cromo-Telúrio-Selênio (3%), Ferro-Gálio (3%) entre outros.

Genes relacionados à resistência ao alumínio, antimônio, arsênio, cádmio, cobre, cobalto, chumbo, cromo, gálio, magnésio, manganês, mercúrio, molibdênio, ouro, vanádio, prata, telúrio e tungstênio também foram identificados no metagenoma da água da Cava (Figura 7). Mesmo sem a presença destes metais na água da Cava, os genes identificados são importantes para os mecanismos de resistência das bactérias em adquirir ou rejeitar diferentes tipos de metais e assegurar a adaptação desses micro-organismos a mudanças hostis de ambiente, como aconteceu na área da Cava em estudo, que sofreu estresse por um longo período (VALLS; DE LORENZO, 2002).

Diferente dos outros metais, a grande quantidade de ferro presente no ambiente aquático da Cava pode ser responsável pela seleção de genes relacionados ao subsistema de aquisição e metabolismo de ferro. Os genes com resistência a Ferro representaram 7,3% em nossa amostra. A baixa solubilidade do íon férrico em solução aquosa torna sua obtenção mais difícil, portanto os micro-organismos criaram muitas

estratégias para adquirir ferro solúvel, como por exemplo a produção e utilização de sideróforos, que são reservatórios transitórios de ferro para o transporte do íon para o citoplasma celular (VOSS et al., 1999). De acordo com a análise através do banco de dados SEED, os genes relacionados com a produção e utilização de sideróforos representaram 7% das “reads”, enquanto os outros 92% pertencem a diferentes genes com as funções de adquirir, utilizar e transportar o íon férrico.

Micro-organismos que possuem a capacidade de conviver com o ferro tem sido foco de inúmeros estudos devido à sua importância tanto no ciclo global do ferro quanto em aplicações industriais, principalmente relacionadas às bactérias mineradoras, que possuem particular interesse econômico (HEDRICH; SCHLÖMANN; BARRIE JOHNSON, 2011).

O nitrogênio é um macronutriente importante em sistemas aquáticos, e é a chave para a formação de aminoácidos, proteínas, enzimas e componentes estruturais das paredes celulares. As principais transformações do nitrogênio dependem de microrganismos como arqueias, bactérias e fungos (JURETSCHKO et al., 2000) (OFFRE; SPANG; SCHLEPER, 2013) (RICHARDSON; WATMOUGHT, 1999). A análise de genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio na água da Cava de mineração revelou genes envolvidos na assimilação de amônio e amonificação de nitrato e nitrito como os mais abundantes, 58,5% e 27,4% respectivamente.

O processo de amonificação é realizado por bactérias saprófitas e é baseado na decomposição de moléculas orgânicas contendo nitrogênio, como, por exemplo, aminoácidos e DNA, que são liberados para o meio ambiente quando um organismo excreta resíduos ou morre (COSTA et al., 2015). Como a maioria do N existe sob a forma de moléculas orgânicas, a disponibilidade do nitrogênio para níveis tróficos mais elevados depende da transformação microbiana (COSTA et al., 2015).

Alguns gêneros de bactérias e arqueias relacionadas ao ciclo do nitrogênio foram identificados na água da Cava, como, por exemplo, *Cenarchaeum*, *Candidatus Nitrososphaera*, *Nitrosopumilus*, *Thermocladium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Thiobacillus*, *Pseudomonas*, *Nitrosococcus*, mostrando, assim, a participação da comunidade microbiana da água da Cava no metabolismo do nitrogênio.

5. Conclusão

O estudo do metagenoma da água da Cava de mineração é um exemplo de como as abordagens metagenômicas nos permitem estudar o metabolismo microbiano sem a necessidade de cultivo. O perfil taxonômico revelou que a comunidade microbiana presente na água da Cava de mineração é composta pelos domínios Bacteria (79,8%), Eucaryota (19,85%) e Archaea (0,1%). Grande parte dos organismos bacterianos foram atribuídos aos filos Proteobacteria (33%) e Actinobacteria (11%), para o domínio Eucaryota, a maioria dos integrantes pertencem à flora aquática comum, com os filos Chlorophyta (55,5%) e Streptophyta (29,1%), e para o domínio Archaea, foram identificados representantes dos filos Thaumarchaeota (71,4%) e Crenarchaeota (28,5%). Também neste estudo, foi identificado 3.306 genes importantes para os mecanismos de resistência das bactérias em adquirir ou rejeitar diferentes tipos de metais, assegurando a adaptação desses micro-organismos a mudanças hostis de ambiente. A análise funcional revelou genes associados à manutenção celular e ao metabolismo do nitrogênio, o qual contou com genes envolvidos na assimilação de amônio e amonificação de nitrato e nitrito.

Esse estudo forneceu dados importantes sobre as interações da comunidade microbiana com o meio ambiente e permitirá pesquisas mais aprofundadas dos genes encontrados em processos de biorremediação, biomineração e em outros diversos processos com importância biotecnológica. Além disso, esse foi o primeiro estudo dessa Cava que está em recuperação e poderá servir de base para avaliações posteriores de controle do processo de transformação dessa área explorada pela atividade mineradora.

6. Referências

ANDRADE, A. C.; FRÓES, A.; LOPES, F. Á. C.; THOMPSON, F. L.; KRÜGER, R. H.; DINSDALE, E.; BRUCE, T.; RECEIVED: Diversity of microbial carbohydrate-active enzymes (CAZymes) associated with freshwater and soil samples from caatinga biome. **Microbial Ecology**, p. 1–17, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-016-0911-9>>.

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A. S.; LESIN, V. M.; NIKOLENKO, S. I.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A. D.; PYSHKIN, A. V.; SIROTKIN, A. V.; VYAHHI, N.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M. A.; PEVZNER, P. A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology**, v. 19, n. 5, p. 455–77, 2012.

BEALL, J. V. **Mining's Place and Contribution**. New York: ME Mining Engineering Handbook, 1973.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Genome analysis Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 45, n. 3, p. 198–207, mar. 2000.

BRUNEEL, O.; PASCAULT, N.; EGAL, M.; BANCON-MONTIGNY, C.; GOÑI-URRIZA, M. S.; ELBAZ-POULICHET, F.; PERSONNÉ, J. C.; DURAN, R. Archaeal diversity in a Fe-As rich acid mine drainage at Carnoulès (France). **Extremophiles**, v. 12, n. 4, p. 563–571, 2008.

BRYAN, C. G.; MARCHAL, M.; BATTAGLIA-BRUNET, F.; KUGLER, V.; LEMAITRE-GUILLIER, C.; LIÉVREMONT, D.; BERTIN, P. N.; ARSÈNE-PLOETZE, F. Carbon and arsenic metabolism in *Thiomonas* strains: differences revealed diverse adaptation processes. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 127, 2009.

CABRERA, G.; GÓMEZ, J. M.; CANTERO, D. Kinetic study of ferrous sulphate oxidation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the presence of heavy metal ions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 2–3, p. 301–306, 2005.

CHAUDHARY, A.; SHIRODKAR, S.; SHARMA, A.; CHAUDHARY, A.; SHIRODKAR, S.; SHARMA, A. Characterization of nickel tolerant bacteria isolated from heavy metal polluted glass industry for its potential role in bioremediation. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 26, n. 2, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/15320383.2017.1267110>>.

COLE, J. R.; CHAI, B.; MARSH, T. L.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM, S. A.; CHANDRA, S.; MCGARRELL, D. M.; SCHMIDT, T. M.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 1, p. 442–443, 2003.

CONNORS, J.; KRZYWINSKI, M.; SCHEIN, J.; GASCOYNE, R.; HORSMAN, D.; JONES, S. J.; MARRA, M. A. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. **Genome Research**, v. 19, n. 9, p. 1639–1645, 2009.

COSTA, P. S.; REIS, M. P.; ÁVILA, M. P.; LEITE, L. R.; DE, F. M. G.; SALIM, A. C. M.; OLIVEIRA, G.; BARBOSA, F.; CHARTONE-, E. Metagenome of a Microbial Community Inhabiting a Metal-Rich Tropical Stream Sediment. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–21, 2015.

DESCHAMPS, E.; CIMINELLI, V. S. T.; LANGE, F. T.; MATSCHULLAT, J.; RAUE, B.; SCHMIDT, H. Soil and Sediment Geochemistry of the Iron Quadrangle, Brazil. **Journal of Soils and Sediments**, v. 4, n. 3, p. 169–169, 2002.

DUNFIELD, P. F.; YURYEV, A.; SENIN, P.; SMIRNOVA, A. V.; STOTT, M. B.; HOU, S.; LY, B.; SAW, J. H.; ZHOU, Z.; REN, Y.; WANG, J.; MOUNTAIN, B. W.; CROWE, M. A.; WEATHERBY, T. M.; BODELIER, P. L. E.; LIESACK, W.; FENG, L.; WANG, L.; ALAM, M. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 879–882, 2007.

GELAGUTASHVILI, E.; PATARAIA, E. G. D.; GURIELIDZE, M. Biosorption of Cr (VI) and Cr (III) Arthrobacter species. **ARXIV eprint arXiv:1106.2918**, p. 1–8, 2011.

GILBRIDE, K. A.; LEE, D.-Y.; BEAUDETTE, L. A. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. **Journal of microbiological methods**, v. 66, n. 1, p. 1–20, jul. 2006.

HEDRICH, S.; SCHLÖMANN, M.; BARRIE JOHNSON, D. The iron-oxidizing proteobacteria. **Microbiology**, v. 157, n. 6, p. 1551–1564, 2011.

HERLEMANN, D. P. R.; LUNDIN, D.; LABRENZ, M. Metagenomic de novo assembly of an aquatic representative of the verrucomicrobial class Spartobacteria. **mBio**, v. 4, n. 3, p. 1–9, 2013.

HLIHOR, R. M.; ROSCA, M.; TAVARES, T.; GAVRILESCU, M. The role of *Arthrobacter viscosus* in the removal of Pb(II) from aqueous solutions. **Water Science and Technology**, p. wst2017360, 2017.

HONG, C.; SI, Y.; XING, Y.; LI, Y. Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. **Environmental science and pollution research international**, v. 22, n. 14, p. 10788–10799, 2015.

HYATT, D.; CHEN, G.; LOCASCIO, P. F.; LAND, M. L.; LARIMER, F. W.; HAUSER, L. J. Prodigal : prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. **BMC Bioinformatics.**, v. 8, p. 11–119, 2010.

ISLAM, T.; JENSEN, S.; REIGSTAD, L. J.; LARSEN, O.; BIRKELAND, N.-K. Methane oxidation at 55 C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the Verrucomicrobia phylum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 1, p. 300–304, 2008.

JERMAKKA, J.; MERTA, E.; WENDLING, L. A.; MROUEH, U.-M. **Nitrogen compounds at mines and quarries . Sources , behaviour and removal from mine waters Nitrogen compounds at mines and quarries.** VTT Technical Research Centre of Finland Ltd, 2015.

JURETSCHKO, S.; PURKHOLD, U.; POMMERENING-RO, A.; SCHMID, M. C.; KOOPS, H.; WAGNER, M. Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and amoA Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5368–5382, 2000.

LIU, H.; YIN, H.; DAI, Y. The co-culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidiphilium acidophilum* enhances the growth , iron oxidation , and CO₂ fixation. **Arch Microbiol**, v. 193, p. 857–866, 2011.

LOUIS, S.; POIRIER, Y.; BIOTECHNOLOGY, P. White biotechnology. **EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION**, v. 4, p. 835–837, 2003.

MCMAHON, K. D.; TOYAMA, D.; RINKE, R.; GHAI, R.; RODR, F.; GARCIA, W.; MIRANDA, F. P. De; HENRIQUE-, F.; CRISTINA, T.; OLIVEIRA, S. De. Metagenomics of the Water Column in the Pristine Upper Course of the Amazon River. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R. A. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 386, 2008.

MORIWAKI, H.; YAMAMOTO, H. Interactions of microorganisms with rare earth ions and their utilization for separation and environmental technology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 1, p. 1–8, 2013.

MULLER, D.; MÉDIGUE, C.; KOECHLER, S.; BARBE, V.; BARAKAT, M.; TALLA, E.; BONNEFOY, V.; KRIN, E.; ARSÈNE-PLOETZE, F.; CARAPITO, C.; CHANDLER, M.; COURNOYER, B.; CRUVEILLER, S.; DOSSAT, C.; DUVAL, S.; HEYMAN, M.; LEIZE, E.; LIEUTAUD, A.; LIÈVREMONT, D.; MAKITA, Y.; MANGENOT, S.; NITSCHKE, W.; ORTET, P.; PERDRIAL, N.; SCHOEPP, B.; SIGUIER, P.; SIMEONOVA, D. D.; ROUY, Z.; SEGURENS, B.; TURLIN, E.; VALLENET, D.; VAN DORSSELAER, A.; WEISS, S.; WEISSENBACH, J.; LETT, M. C.; DANCHIN, A.; BERTIN, P. N. A tale of two oxidation states: Bacterial colonization of arsenic-rich environments. **PLoS Genetics**, v. 3, n. 4, p. 0518–0530, 2007.

ÑANCUCHEO, I.; JOHNSON, D. B. Acidophilic algae isolated from mine-impacted environments and their roles in sustaining heterotrophic acidophiles. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–8, 2012.

NARENDRULA-KOTHA, R.; NKONGOLO, K. K. Ecological Genetics and Genomics Bacterial and fungal community structure and diversity in a mining region under long-term metal exposure revealed by metagenomics sequencing. **Ecological Genetics and Genomics**, v. 2, p. 13–24, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.egg.2016.11.001>>.

NEWTON, R. J.; JONES, S. E.; EILER, A.; MCMAHON, K. D.; BERTILSSON, S. A. A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 75, p. 14-49, 2011.

OFFRE, P.; SPANG, A.; SCHLEPER, C. Archaea in Biogeochemical Cycles. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 437–457, 2013.

OP DEN CAMP, H. J. M.; ISLAM, T.; STOTT, M. B.; HARHANGI, H. R.; HYNES, A.; SCHOUTEN, S.; JETTEN, M. S. M.; BIRKELAND, N. K.; POL, A.; DUNFIELD, P. F. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 5, p. 293–306, 2009.

OUTTEN, F. W.; HUFFMAN, D. L.; HALE, J. A.; O'HALLORAN, T. V. The Independent cue and cus Systems Confer Copper Tolerance during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 30670–30677, 2001.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, n. 5313, p. 734–40, 1997.

PAL, C.; BENGTSSON-PALME, J.; RENSING, C.; KRISTIANSSON, E.; LARSSON, D. G. J. BacMet : antibacterial biocide and metal resistance genes database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. December 2013, p. 737–743, 2014.

PEREIRA, 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, 2014.

PORAT, I.; VISHNIVETSKAYA, T. A.; MOSHER, J. J.; BRANDT, C. C.; YANG, Z. K.; BROOKS, S. C.; LIANG, L.; DRAKE, M. M.; PODAR, M.; BROWN, S. D.; PALUMBO, A. V. Characterization of archaeal community in contaminated and uncontaminated Surface Stream Sediments. **Environmental microbiology**, v. 60, p. 784–795, 2010.

RICHARDSON, D. J.; WATMOUGHT, N. J. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, p. 207–212, 1999.

SALAM, L. B.; ILORI, M. O.; AMUND, O. O.; LIIMIEN, Y. Characterization of bacterial community structure in a hydrocarbon-contaminated tropical african soil. **Environmental Technology**, v. 0, n. 0, p. 1–16, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2017.1317838>>.

SAMANTA, A.; BERA, P.; KHATUN, M.; SINHA, C.; PAL, P.; LALEE, A.; MANDAL, A. An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus* sp. isolated from municipal waste. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research Scholars**, v. 2, n. 1, p. 178–189, 2012.

SAMBROOK, JF RUSSELL, D. **Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd.** New York: Cold Spring Harbor Press, 2001.

SHIGEAKI HARAYAMA, YUKI KASAI, A. H. Microbial communities in oil-contaminated seawater. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 205–214, 2004.

SILVA, C. C.; HAYDEN, H.; SAWBRIDGE, T.; MELE, P.; KRUGER, R. H.; RODRIGUES, M. V. N.; COSTA, G. G. L.; VIDAL, R. O.; SOUSA, M. P.; TORRES, A. P. R.; SANTIAGO, V. M. J. Phylogenetic and functional diversity of metagenomic libraries of phenol deg1. Silva CC, Hayden H, Sawbridge T, et al. Phylogenetic and functional diversity of metagenomic libraries of phenol degrading sludge from petroleum refinery wastewater treatment s. **AMB Express**, v. 2, p. 1–13, 2012.

TOFANA, M.; MIHAIESCU, T.; ODAGIU, A. Applications of Microalgae in wastewater treatments : a review. **ProEnvironment**, v. 9, p. 459–463, 2016.

VALLS, M.; DE LORENZO, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 327–338, 2002.

VOSS, J. J. De; RUTTER, K.; SCHROEDER, B. G.; III, C. E. B.; VOSS, J. J. D. E. Iron acquisition and metabolism by *Mycobacteria*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 15, p. 4443–4451, 1999.

YANG, J. S.; CAO, J.; XING, G. L.; YUAN, H. L. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 537–544, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.124>>.

ZIMIN, A. V; MARÇAIS, G.; PUIU, D.; ROBERTS, M.; SALZBERG, S. L.; YORKE, J. A. The MaSuRCA genome assembler. **Bioinformatics**, v. 29, n. 21, p. 2669–77, 2013.