

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Modulação da expressão gênica em uma comunidade de bactérias em
resposta aos metais Cobre e Cromo

Julia Sandrini De Biasi

JABOTICABAL – SP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Modulação da expressão gênica em uma comunidade de bactérias em
resposta aos metais Cobre e Cromo

JULIA SANDRINI DE BIASI

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro

Co-orientadora: Me. Michelli Inácio Gonçalves

Funicelli

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal – SP

1º Semestre/2022

B579m

Biasi, Julia Sandrini De

Modulação da expressão gênica em uma comunidade de bactérias em resposta aos metais Cobre e Cromo / Julia Sandrini De Biasi. -- Jaboticabal, 2022

91 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Daniel Guariz Pinheiro

Coorientadora: Michelli Inácio Gonçalves Funicelli

1. Ciências biológicas. 2. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala. 3. Transcriptoma. 4. Metais pesados. 5. Bactérias. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL



DEPARTAMENTO: BIOTECNOLOGIA AGROPECUÁRIA AMBIENTAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM UMA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS EM RESPOSTA AOS METAIS COBRE E CROMO.

ACADÊMICO: JULIA SANDRINI DE BIASI

CURSO: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. DANIEL GUARIZ PINHEIRO
Me. MICHELLI INÁCIO INÁCIO GONÇALVES FUNNICELLI

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

BANCA EXAMINADORA:

(Nomes)

(Assinaturas)

Presidente: Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro
Membro: Prof.^a Dr.^a Lúcia Maria Carareto Alves
Membro: Dr.^a Saura Rodrigues da Silva

Jaboticabal 14 / 03 / 2022

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: / /
"Ad-Referendum" em: 15/03/2022

Chefe do Departamento

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, Jesus e ao meu anjo guardião por toda força e oportunidade, por nunca me deixarem padecer em momentos difíceis e sempre estarem ao meu lado.

Agradeço aos meus pais Ângelo Manoel e Cláudia por sempre me apoiarem e nunca desistirem de mim, me auxiliando e amparando, provavelmente, sem eles não conseguiria ter chego até aqui. Agradeço ao meu irmão André Luiz por toda inspiração e orgulho pelas minhas conquistas.

Não poderia deixar de agradecer ao Professor Dr. Daniel Guariz Pinheiro por todas as oportunidades, ensinamentos, ajuda e paciência. Uma pessoa realmente inspiradora por seu trabalho, dedicação e atenção para com seus alunos.

Gostaria também de agradecer à minha co-orientadora Michelli Inácio Gonçalves Funicelli por sempre estar disposta a me auxiliar e tirar dúvidas, e aos meus colegas do Laboratório de Bioinformática.

Aos meus amigos que o curso de Ciências Biológicas trouxe Ennie Rose, Fernanda, João Paulo e Lígia e a duas pessoinhas incríveis que em todos os momentos me apoiaram, me fizeram rir e ouviram minhas reclamações sempre dispostos a ajudar: Guilherme e Maria Julia.

A todos os meus professores, desde o ensino infantil até a graduação, por todo conhecimento compartilhado e ensinamentos. Agradeço também a minha professora de biologia do ensino médio Rose por toda inspiração e apoio em seguir nesta carreira como futura bióloga.

Agradeço ao Laboratório de Microrganismos e Plantas (LBMP) do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental (DBTAA) da FCAV, coordenado pela Profa. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos e Profa. Lúcia Maria Carareto Alves, que gentilmente cederam os dados de sequenciamento para serem analisados.

Por fim, gostaria de agradecer ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho (edital 2021/2022).

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. | OBJETIVOS | 4 |
| 3. | REVISÃO DE LITERATURA | 5 |
| 3.1 | POLUIÇÃO DO AMBIENTAL | 5 |
| 3.2 | METAIS PESADOS OU POTENCIALMENTE TÓXICOS..... | 6 |
| 3.3 | FONTES DE POLUIÇÃO POR METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS | 8 |
| 3.4 | POSSÍVEIS DANOS CAUSADOS A ALGUNS SERES VIVOS | 10 |
| 3.5 | ESTRATÉGIAS DE REMEDIAÇÃO | 12 |
| 3.6 | MICRORGANISMOS E BIORREMEDIAÇÃO | 13 |
| 3.7 | IMPORTÂNCIA DE ESTUDOS GENÉTICOS EM MICRORGANISMOS | 14 |
| 3.8 | TRANSCRIPTOMA E METATRANSCRIPTOMA | 15 |
| 3.9 | IMPORTÂNCIA EM SE ESTUDAR O METATRANSCRIPTOMA | 17 |
| 3.10 | ANÁLISE DO GENE 16S rRNA..... | 17 |
| 3.11 | DO SEQUENCIAMENTO DE SANGER AO NGS | 18 |
| 3.12 | ANÁLISE <i>SHOTGUN</i> DE TRANSCRIPTOMA COMPLETO - RNA- Seq..... | 19 |
| 3.13 | METATRANSCRIPTOMA E BACTÉRIAS RESISTENTES A METAIS..... | 22 |
| 3.14 | GENES BACTERIANOS EXPRESSOS NA PRESENÇA DE CROMO (Cr) | 23 |
| 3.15 | GENES BACTERIANOS EXPRESSOS NA PRESENÇA DE COBRE (Cu) | 24 |
| 4. | MATERIAIS E MÉTODOS | 26 |
| 4.1 | COMUNIDADE BACTERIANA | 26 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.2 | ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) . | 27 |
| 4.3 | EXTRAÇÃO DE RNA, CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO | 28 |
| 4.4 | ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS DA COMUNIDADE E IDENTIFICAÇÃO | 28 |
| 4.5 | ANÁLISE DOS DADOS DE RNA-SEQ DO METATRANSCRIPTOMA | 29 |
| 4.5.1 | PRÉ-PROCESSAMENTO DE DADOS | 29 |
| 4.5.2 | PROCESSAMENTO DOS DADOS | 31 |
| 4.5.3 | MONTAGEM DO METATRANSCRIPTOMA | 33 |
| 4.5.4 | IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS | 34 |
| 4.5.5 | BUSCAS DE GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A METAIS..... | 34 |
| 4.5.6 | ANOTAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES | 35 |
| 4.5.7 | ANOTAÇÃO TAXONÔMICA DO METATRANSCRIPTOMA . | 35 |
| 4.5.8 | IDENTIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS TRANSCRIPTOMAS NO METATRANSCRIPTOMA..... | 36 |
| 4.5.9 | ANÁLISE DE ABUNDÂNCIA NO METATRANSCRIPTOMA. | 36 |
| 4.5.10 | ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO E ABUNDÂNCIA NO METATRANSCRIPTOMA..... | 37 |
| 4.5.12 | ANÁLISES DE COMPONENTES PRINCIPAIS..... | 38 |
| 4.5.13 | <i>SCRIPTS</i> | 39 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| 5.1 | ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA | 40 |
| 5.2 | IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS | 40 |
| 5.3 | PROCESSAMENTO DE DADOS DE SEQUENCIAMENTO DO METATRANSCRIPTOMA | 41 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.4 | MONTAGEM DO METATRANSCRIPTOMA E ANOTAÇÃO FUNCIONAL | 43 |
| 5.5 | ANÁLISES DE REPRESENTATIVIDADE DE TAXA NO METATRANSCRIPTOMA | 43 |
| 5.6 | IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS COM O BANCO DE DADOS BacMet | 47 |
| 5.7 | IDENTIFICAÇÃO DOS GENES INDUZIDOS EXPRESSOS COM O PROGRAMA DESeq2..... | 48 |
| 5.8 | IDENTIFICAÇÃO DOS GENES REPRIMIDOS EXPRESSOS COM O PROGRAMA DESeq2..... | 50 |
| 5.9 | GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (INDUZIDOS) ANOTADOS..... | 51 |
| 5.9.1 | TRANSPORTADORES ABC..... | 54 |
| 5.9.2 | PROTEÍNAS ATPases | 56 |
| 5.9.3 | GENES DE RESISTÊNCIA ESPECÍFICOS | 58 |
| 5.9.4 | ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DE DADOS DE RNA-Seq..... | 59 |
| 6. | CONCLUSÃO | 59 |
| 7. | REFERÊNCIAS | 62 |

RESUMO

Devido ao rápido desenvolvimento industrial e crescimento populacional, nosso planeta vem sofrendo a cada dia com problemas de poluição, principalmente devido a atividades antrópicas. O solo, assim como os corpos hídricos, acaba sendo um dos locais mais prejudicados pela poluição, onde, os metais potencialmente tóxicos têm se tornado um dos mais preocupantes poluentes. Metais potencialmente tóxicos são classificados como sendo substâncias que, mesmo presentes em pequenas concentrações, podem proporcionar diversos prejuízos aos seres vivos. Sendo assim, estratégias de remediação têm sido propostas, onde a biorremediação (processo remediativo realizado por organismos vivos) tem ganhado destaque por ser uma estratégia sustentável sob os pontos de vista econômico e ambiental. Dentre os potenciais organismos vivos usados em estudos de biorremediação, os microrganismos, principalmente as bactérias, acabam sendo ótimas escolhas devido à capacidade de sobreviverem a uma diversidade de ambientes graças à rapidez e facilidade com que enfrentam mecanismos evolutivos. Logo, com o intuito de estudar e compreender mais a respeito dos mecanismos genéticos bacterianos envolvidos na resistência a metais, um estudo envolvendo a análise do metatranscriptoma de uma comunidade bacteriana encontrada originalmente em amostras de raízes da leguminosa *Arachis pintoii* foi desafiada frente aos metais cromo (trivalente e hexavalente) e cobre. Com o isolamento e análises de marcadores moleculares (gene 16S), foram identificados quatro isolados bacterianos nessa comunidade, correspondentes às espécies *Brevundimonas vesiculares*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhizobium tropici* e *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti*. A partir da análise do metatranscriptoma foram revelados genes diferencialmente expressos presentes na comunidade desafiada por esses metais. Foram identificados genes relacionados aos principais mecanismos de resistência e tolerância bacteriana a metais, entre eles transportadores ABC, bombas de efluxo e proteínas de membrana, concluindo-se a existência de uma intrínseca e complexa rede de interações entre genes expressos por essas bactérias quando na presença dos metais potencialmente tóxicos.

Palavras-chaves: metais pesados, RNA-Seq, genes bacterianos de resistência a metais.

ABSTRACT

Due to rapid industrial development and population growth, our planet is suffering from pollution problems every day, mainly due to human activities. Soil, as well as water bodies, end up being the places most affected by pollution, where potentially toxic metals have become one of the most worrying pollutants. Potentially toxic metals are classified as substances that, even present in small concentrations, can cause several damages to living beings. Thus, remediation strategies have been proposed, where bioremediation (remediation process carried out by living organisms) has gained prominence for being a sustainable strategy from an economic and environmental point of view. Among the potential living organisms used in bioremediation studies, microorganisms, especially bacteria, end up being great choices due to their ability to survive in a variety of environments thanks to the speed and ease with which they face evolutionary mechanisms. Therefore, in order to study and understand more about the bacterial genetic mechanisms involved in resistance to metals, a study involving the analysis of the metatranscriptome of a bacterial community originally found in the root samples of leguminous plants *Arachis pintoii*, and it was challenged against the metals chromium (trivalent and hexavalent) and copper. With the isolation and analysis of molecular markers (gene 16S), four bacterial isolates were identified in this community, corresponding to the species *Brevundimonas vesiculares*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhizobium tropici* and *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti*. From the analysis of the metatranscriptome, differentially expressed genes present in the community challenged by these metals were revealed. Genes related to the main mechanisms of bacterial resistance and tolerance to metals were identified, including ABC transporters, efflux pumps and membrane proteins, concluding the existence of an intrinsic and complex network of interactions between genes expressed by these bacteria when in the presence of potentially toxic metals.

Keywords: heavy metals, RNA-Seq, bacterial metal resistance genes.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o mundo passa por uma grande onda de desenvolvimento tecnológico e industrial que vem ocorrendo desde a Revolução Industrial a partir da segunda metade do século XVIII (PASQUINI, 2020). Tal desenvolvimento técnico-industrial é um dos responsáveis pelo aparecimento de outros problemas que nunca foram registrados, como o rápido aumento populacional e altos índices de poluição decorrente do consumismo intenso (MATOS, 2020).

A poluição é um grande problema, atingindo diversos locais como o ambiente aquático, atmosférico e terrestre, o que tem preocupado diversas nações devido a elevados índices de acúmulo de substâncias químicas podendo levar a uma série de prejuízos aos organismos vivos (RODRÍGUEZ EUGENIO et al., 2018).

As fontes de poluição podem ser divididas em pontuais ou difusas (RODRÍGUEZ EUGENIO et al., 2018) tendo os metais potencialmente tóxicos como poluentes em comum. Tais metais são assim denominados por representarem grupos de elementos inorgânicos com massas atômicas entre 63,5 e 200,6 e gravidade maior que 5,0 sendo capazes de ocasionar danos nos seres vivos mesmo em baixas concentrações (AFROZE; SEN, 2018). São exemplos desses elementos: zinco (Zn), níquel (Ni), mercúrio (Hg), cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsênio (As), cobre (Cu) e cromo (Cr).

A contaminação por metais potencialmente tóxicos no meio ambiente pode trazer inúmeros problemas à saúde humana assim como às plantas e aos demais seres vivos. Em relação aos humanos altas concentrações de cádmio podem ocasionar fraturas ósseas e problemas de cartilagem; o chumbo afeta o sistema imunológico, reprodutor, gastrointestinal, nervoso, respiratório e urinário; já o cobre, pode levar a sérios problemas cerebrais, irritação no estômago, cirrose e anemia crônica; e o cromo, dependendo da via de contaminação (nasal ou oral) pode ocasionar úlceras, coceiras nasais, danos renais e hepáticos, convulsões, e até mesmo levar o indivíduo a óbito (MISHRA et al., 2019).

Em relação às plantas, o acúmulo de metais potencialmente tóxicos pode prejudicar o desenvolvimento e crescimento vegetal, assim como interferir em mecanismos de reprodução, respiração, fotossíntese e inibição na síntese de diversos micronutrientes (MISHRA et al., 2019).

Perante os perigosos problemas que o acúmulo de metais potencialmente tóxicos pode trazer ao meio ambiente, diversas tecnologias físicas, químicas e biológicas vêm sendo desenvolvidas e estudadas para promover a descontaminação de ambientes poluídos (LI et al., 2019). Todavia, os processos biológicos são os que mais se destacam, sendo a biorremediação o principal deles por representar uma alternativa mais econômica e ecologicamente eficaz além de viável (LI et al., 2019).

A biorremediação pode ser definida como um processo no qual organismos vivos são empregados para reduzir, remover e/ou transformar poluentes. Nesse sentido, os microrganismos têm se apresentado como detentores dos melhores sistemas metabólicos capazes de biodegradar moléculas xenobióticas (moléculas de origem estranha ao meio ambiente), e recalcitrantes (PEREIRA, 2012).

Logo, é possível notar a grande importância dos microrganismos no processo de biorremediação onde as bactérias podem ser uma ótima escolha por possuírem uma maquinaria genética que lhes permite sobreviver em ambientes poluídos por metais. As bactérias podem deter genes que, quando expressos são capazes de interagir com o metal tais como *cadB* e *cadD* (cádmio); *chrA* (cromo); *cusF* e *cueO* (cobre); *pbrD* (chumbo); *merA* e *merB* (mercúrio); *niCoT* (zinco), entre vários outros genes, sendo estes os mais conhecidos atualmente (DAS; DASH; CHAKRABORTY, 2016).

Métodos de cultivos podem ser utilizados para um melhor entendimento sobre mecanismos bacterianos relacionados à resistência a metais potencialmente tóxicos, entretanto, uma grande parte dos microrganismos são difíceis de serem cultivados (VARTOUKIAN; PALMER; WADE, 2010). Sendo assim, o sequenciamento de alto rendimento, aliado aos métodos de Bioinformática, têm se revelado uma excelente abordagem para o entendimento de como os microrganismos conseguem tolerar concentrações elevadas de contaminantes, e, em determinados casos também reduzir a sua toxicidade nos ambientes. Tal abordagem independente de cultivo possibilita a realização de

investigações da composição de comunidades microbianas em termos de estruturação dos *taxa* e seu arsenal gênico (*pool* gênico), em relação à natureza e extensão do poluente assim como das condições ambientais (MALLA et al., 2018).

Dentre as abordagens que mais podem contribuir para o estudo da maquinaria genética envolvida no processo de biorremediação está a Transcriptômica, área responsável por estudar as moléculas de RNA e, conseqüentemente, o processo de transcrição e expressão gênica frente a diferentes condições biológicas (LU et al., 2017). Neste contexto, a técnica de RNA-Seq pode ser uma ferramenta valiosa de sequenciamento de alto rendimento ao fornecer informações transcricionais para genes que podem ser diferencialmente expressos perante inúmeros estresses ambientais, tais como o acúmulo de metais potencialmente tóxicos (LU et al., 2017).

2. OBJETIVOS

Neste trabalho o objetivo principal é obter uma maior compreensão e entendimento frente aos mecanismos bacterianos de resistência aos metais potencialmente tóxicos cromo trivalente (Cr^{+3}), hexavalente (Cr^{+6}) e cobre bivalente (Cu^{+2}). Para tanto, propomos uma abordagem metatranscriptômica a fim de caracterizar a modulação do perfil de expressão gênica de uma comunidade bacteriana isolada de raízes da leguminosa *Arachis pintoii* Krapov. & W.C.Greg. após experimento de desafio com esses metais.

Em um primeiro momento, a partir de ensaios de concentração mínima inibitória (MIC) dos metais frente ao crescimento da comunidade, as condições ideais para o desafio com os metais foram definidas. Utilizando-se a abordagem de sequenciamento RNA-Seq da comunidade, objetivamos realizar a montagem *de novo* do metatranscriptoma bacteriano, a fim de realizarmos análises comparando os genes expressos presentes na amostra da comunidade controle e desafiada. A partir do resultado dessas análises identificar genes diferencialmente expressos relacionados à presença do metal. Dessa forma, esperamos obter uma maior compreensão a respeito de genes responsivos (transcritos) perante a presença ou ausência dos metais, assim como contribuindo para um maior entendimento a respeito de prováveis vias metabólicas envolvidas em mecanismos de tolerância e resistência a Cr^{+3} , Cr^{+6} e Cu^{+2} encontrados em certas espécies bacterianas.

A fim de identificar quais espécies bacterianas estão compondo a comunidade em questão, o isolamento das bactérias e a análise do marcador molecular 16S rRNA desses isolados é necessário para a obtenção das prováveis identificações taxonômicas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 POLUIÇÃO DO AMBIENTAL

Com o advento da Revolução Industrial, muitos avanços técnico-científicos ocorreram principalmente no que diz respeito ao campo científico (XU; DAVID; KIM, 2018), todavia, muitos problemas ambientais tiveram início em grande parte devido ao exacerbado aumento da atividade industrial e ao crescimento exagerado da população urbana que contribuem para a poluição de corpos hídricos, atmosfera e solo (MATOS, 2020; PEREIRA, 2012).

Quando falamos a respeito da poluição de corpos hídricos, estamos abordando um dos grandes problemas que a sociedade atual tem enfrentado. Através do lançamento de materiais residuais de indústrias e lixos domésticos, além de diversas substâncias químicas frequentemente empregues na agricultura, problemas como, eutrofização de mananciais, consumo de oxigênio, mau odor e gosto, além da adsorção de metais potencialmente tóxicos podem ser observados, sendo o último problema citado muito preocupante, uma vez que, os metais potencialmente tóxicos podem bioacumular ao longo das diferentes cadeias tróficas. Problemas ainda relacionados à estética das águas como mudanças na coloração e turbidez representam sérios problemas às Estações de Tratamento de Água (ETAs), enquanto sedimentos advindos de represas e assoreamento de rios interferem na diminuição da velocidade com que as águas cruzam seus cursos (PEREIRA, 2012).

Quanto à poluição do ar, ou poluição atmosférica, é caracterizada pela emissão de gases provindos de automóveis, usinas termolétricas como fábricas, que usam energia de combustíveis fósseis, o que nos faz repensar e principalmente refletir a respeito dos grandes avanços tecnológicos que marcam nossa era, sendo extremamente dependentes do gasto de energia. Pode-se citar como principais fontes de poluição atmosférica a emissão de gases tóxicos, produzidos por indústrias e veículos, assim como os compostos tóxicos formados

a partir de reações químicas entre os citados primeiramente com a atmosfera (PEREIRA, 2012).

Dentre os problemas ocasionados pela poluição, o solo é um dos ambientes mais prejudicados, uma vez que, muitas vezes, este é usado como escoadouro para diversos resíduos sólidos e líquidos, tornando-se um problema alarmante em diversas nações (RODRÍGUEZ EUGENIO et al., 2018).

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO - *Food and Agriculture Organization*) e o Painel Técnico Intergovernamental sobre o Solo (ITPS - *Intergovernmental Technical Panel on Soils*) de 2015, a poluição do solo foi considerada um dos mais alarmantes problemas ambientais na Europa e Eurásia, África do Norte e Subsaariana, Ásia, Pacífico Norte e nas Américas (Global assessment of soil pollution, 2021; RODRÍGUEZ EUGENIO et al., 2018).

A poluição do solo diz respeito a substâncias e/ou produtos químicos presentes em concentrações elevadas no ambiente capazes de ocasionar danos em qualquer ser vivo (RODRÍGUEZ EUGENIO et al., 2018). Estes poluentes podem ter diversas origens sendo estas agrupadas em fontes de poluição naturais ou antropogênicas (ASAD et al., 2019). Sendo ainda possível classificar as fontes de poluição em pontual, de fácil identificação, ou difusa, quando não é possível estabelecer, com maiores precisões, as áreas poluídas (RODRÍGUEZ EUGENIO et al., 2018; TALABI; KAYODE, 2019).

Os poluentes do solo estão divididos em duas classes principais, orgânicos: substâncias cloradas ou não cloradas; e inorgânicos: compostos metálicos ou não metálicos (AKRAM et al., 2018; Global assessment of soil pollution, 2021). Dentre os compostos metálicos, é possível encontrar os metais pesados ou potencialmente tóxicos, que, quando em elevadas concentrações, podem causar sérios danos ao solo como afetar plantas e animais, e prejudicar a saúde humana (YANG et al., 2018).

3.2 METAIS PESADOS OU POTENCIALMENTE TÓXICOS

Os metais pesados podem apresentar dois tipos de definições distintas, sendo uma do ponto de vista químico, onde estes são classificados de acordo

com uma gravidade específica maior que 5 e uma massa atômica superior a 20, tais como o cádmio, chumbo, cobre, cromo, níquel e zinco; ou do ponto de vista biológico onde o termo “pesado” é comumente empregado para referir-se a metais que, quando presentes no meio ambiente mesmo em baixas concentrações, podem causar danos aos organismos vivos (LI et al., 2019a).

Essas diferentes definições levam, muitas vezes, a interpretações equivocadas sobre a relação entre um metal pesado e o ambiente onde ele é encontrado (POURRET; HURSTHOUSE, 2019). Isso ocorre porque nem sempre a presença de um metal pode ser realmente prejudicial ao meio ambiente, sendo alguns considerados essenciais para atividades fisiológicas, bioquímicas e metabólicas para diversos animais, incluindo os seres humanos (TCHOUNWOU et al., 2012). Os metais cobalto, cobre, ferro, manganês, molibdênio e zinco, por exemplo, são metais pesados considerados essenciais aos organismos vivos (ZORODDU et al., 2019).

Entretanto, os mesmos metais pesados essenciais para os humanos podem não ser para os demais seres vivos e vice-versa uma vez que, a relação existente entre um metal pesado e um organismo vivo acaba sendo extremamente complexa, sendo que, a concentração encontrada irá interferir na toxicidade ou não do metal (ALI; KHAN, 2019).

Alguns outros metais pesados não apresentam nenhum benefício aos seres humanos e podem ser responsáveis por diversas doenças estando intimamente relacionados ao desenvolvimento de cânceres, seja por inalação, absorção, ingestão ou via dérmica. Estes podem se acumular no organismo devido a sua natureza não biodegradável e meia-vida longa (LÜ et al., 2018).

De acordo com Loomis e colaboradores (2017), os metais pesados como cádmio, cromo, níquel e arsênio (metaloide) estão classificados entre os principais agentes causadores de câncer em humanos e animais experimentais conforme dados obtidos através da revisão de monografias da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) nos períodos de 1971 á 2017 (LOOMIS et al., 2018). Pelos critérios da IARC, que levam em consideração dados epidemiológicos e experimentais em suas classificações, estes metais juntamente com outros elementos químicos, constituem o chamado “Grupo 1” de carcinógenos, ou seja,

já está comprovado suas ligações com diversos tipos de cânceres, principalmente de pulmão e vias aéreas (MATSUDA; OKUYAMA, 2018).

O maior problema relacionado aos metais pesados reside em suas concentrações presentes no meio ambiente, independente da sua classificação, “essenciais ou não essenciais”, mesmo em concentrações consideradas baixas podem desencadear diversos problemas ambientais ao solo e a biodiversidade por serem bioacumulados ao longo da cadeia trófica, biomagnificados, recalcitrantes e não estarem sujeitos à quebra metabólica em diversos organismos (KAPAHÍ; SACHDEVA, 2019).

Alguns exemplos de metais pesados mais comumente encontrados são: arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), mercúrio (Hg), níquel (Ni), selênio (Sn) e zinco (Zn).

Porém há diversas controvérsias envolvem o uso do termo metais pesados sendo proposta uma substituição do termo por metais “potencialmente tóxicos”, uma vez que, a toxicidade de um elemento está intimamente relacionada à sua concentração presente no meio ambiente (POURRET; HURSTHOUSE, 2019).

Segundo Duffus (2002), um dos primeiros pesquisadores a contestar o termo “pesado”, a maior parte dos metais classificados como pesados não estão biodisponíveis no ecossistema, não podendo, portanto, serem classificados como pesados (DUFFUS, 2002). Há ainda, alguns autores que apoiam a continuação da existência do termo por este estar extremamente difundido nas ciências ambientais e toxicologia (HÜBNER; ASTIN; HERBERT, 2010).

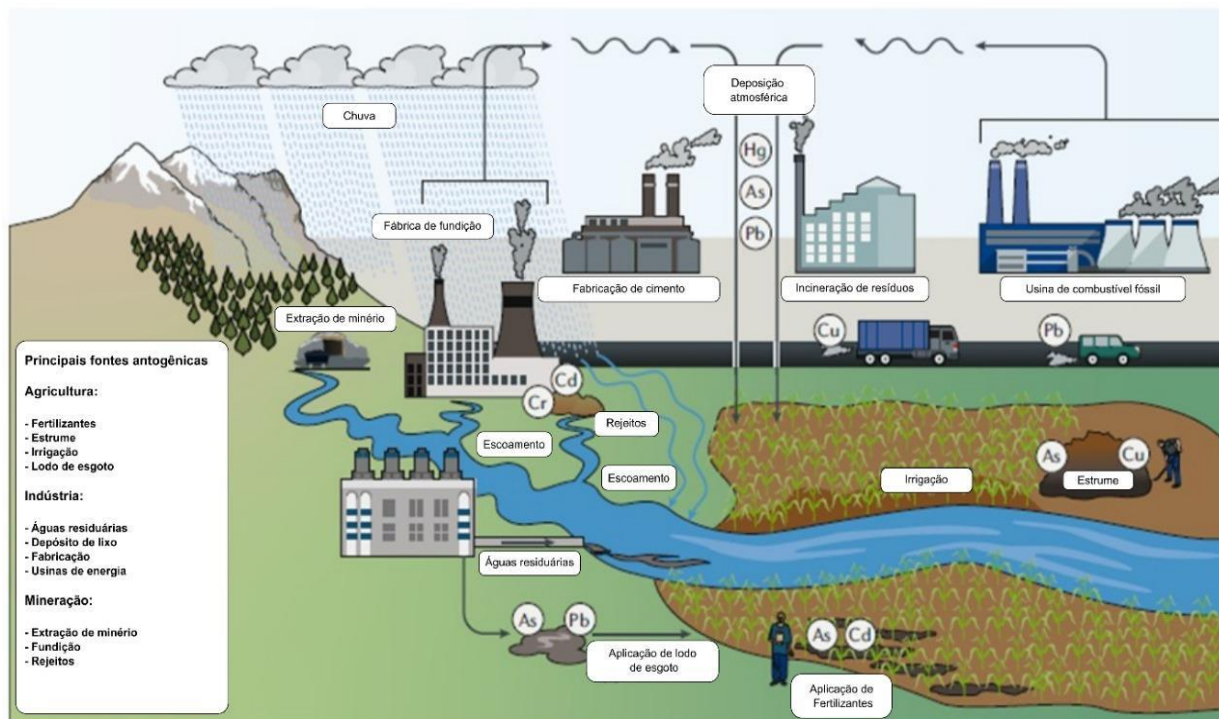
Em virtude de tantas controvérsias relacionadas à dosagem de metais potencialmente tóxicos no ambiente, assim como características físicas, químicas e biológicas, devem ser levadas em consideração antes de classificar um metal como essencial ou não. Apesar disso o que fica claro é que qualquer substância, até mesmo a água, pode se tornar prejudicial à saúde dos seres vivos quando em excesso (MISHRA et al., 2019; POURRET; HURSTHOUSE, 2019).

3.3 FONTES DE POLUIÇÃO POR METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS

Atualmente, as fontes de poluição por metais potencialmente tóxicos podem ser classificadas em fontes naturais ou antropogênicas, sendo a última a

principal contribuidora para a poluição ambiental por tais elementos (PAUL, 2017; WU et al., 2018). As fontes naturais destes metais são provenientes de processos erosivos, lixiviação e intemperismo rochoso, porém, quando comparadas às fontes de poluição antrópicas, acabam não sendo tão prejudiciais (PAUL, 2017). As fontes antropogênicas podem ser divididas em industriais tais como a manufatura, deposição residual, água residual e usinas geradoras de energia; fontes minerais como a extração de minérios, rejeitos e fundição; e atividades intimamente relacionadas à agricultura como o uso de fertilizantes, adubos de origem animal (estrume), irrigação e lodo de esgoto que também, em muitos lugares, acaba sendo usado como adubo para as plantações (Figura 1) (HOU et al., 2020).

Figura 1 - Principais fontes antropogênicas responsáveis pela poluição de metais potencialmente tóxicos no meio ambiente. No quadro branco (lado esquerdo inferior da figura) as fontes de poluição encontram-se divididas em três classes principais: Agricultura, Indústria e Mineração.



Fonte: Adaptado de HOU e colaboradores (2020).

3.4 POSSÍVEIS DANOS CAUSADOS A ALGUNS SERES VIVOS

Os metais potencialmente tóxicos não apresentam apenas um perigo para a qualidade do solo como também podem ser prejudiciais a humanos podendo afetar diversos sistemas do corpo como o respiratório, circulatório, reprodutor, endócrino e nervoso, isso ocorrer, por exemplo, graças à capacidade de oxido-redução (redox) dos metais que interferem em diversas reações celulares como também no material genético do organismo caso atinjam o núcleo celular (WU et al., 2018). A contaminação por metais potencialmente tóxicos em humanos pode ocorrer por três principais vias: ingestão (dieta), inalação e/ou contato dérmico (MISHRA et al., 2019).

Elevadas concentrações de cádmio (Cd), podem causar diversos danos ao sistema esquelético e reprodutor, prejudicar o fígado, rins, visão, audição e, no caso de mulheres grávidas pode causar sérios danos embrionários levando a problemas placentários, parto prematuro e, até mesmo, a perda do feto/embrião (GENCHI et al., 2020a). Já o níquel, é capaz de causar dermatites, doenças cardiovasculares, asma, fibrose pulmonar, câncer intestinal e danos mitocondriais (GENCHI et al., 2020b). O chumbo (Pb) está relacionado à redução da memória,

danos ao sistema nervoso, inibição de cálcio entre outros problemas, assim como o metaloide arsênio (As) que também pode afetar a saúde mental humana, além de estar relacionado à pressão alta e diabetes, podendo levar a morte através da síndrome paralítica que afeta o sistema nervoso central (REHMAN et al., 2018).

Outros dois metais potencialmente tóxicos que podem levar a sérios problemas à saúde humana são o cobre e o cromo. O cobre (Cu) é caracterizado por causar danos cerebrais, cirrose, irritação no estômago e intestino como também anemia crônica; já o cromo (Cr), quando inalado pode levar a danos nos septos nasais, coceiras no nariz, irritações graves e úlceras, mas, ao ser ingerido ou absorvido os problemas são ainda mais graves, podendo causar danos renais e hepáticos, convulsões, náuseas, irritação no trato gastrointestinal e até mesmo a morte (MISHRA et al., 2019).

Não apenas os seres humanos são afetados pela poluição por metais potencialmente tóxicos como vários outros organismos vivos. As plantas, por exemplo, acabam tendo seu crescimento reduzido, como também pode ocorrer a diminuição nas taxas fotossintéticas e teores de clorofila, sendo que, os metais potencialmente tóxicos também podem gerar estresse hídrico e se acumular nos tecidos dos vegetais, sendo ingeridos por herbívoros que comem as plantas contaminadas (SARWAR et al., 2017). Muitas plantas medicinais também podem bioacumular diversos metais potencialmente tóxicos principalmente se cultivadas em zonas próximas a indústrias e fundição; do mesmo modo vegetais cultivados em estufa, quando comparados a aqueles cultivados em campos abertos, apresentam contaminação por metais como Cu, Zn, Mn, Pb e Cd (RAI et al., 2019).

Um estudo conduzido por Maurya e colaboradores (2019) identificou sete espécies de peixes com elevados níveis de Zn, Pb, Cu, Cd e Cr no rio Gange, sendo que, tais espécies são comumente vendidas em diversos mercados populares da Índia (MAURYA et al., 2019). Uma grande preocupação em relação à poluição por metais potencialmente tóxicos é exatamente sua bioacumulação ao longo da cadeia trófica, onde, os metais presentes no ambiente abiótico como a água, sedimentos e solo, são facilmente transferidos e acumulados nos seres vivos, sendo assim, muitos alimentos ingeridos podem acabar apresentando sérios danos à saúde (ALI; KHAN, 2019). Não apenas os seres humanos e as

plantas são prejudicados pela poluição por metais como também organismos invertebrados (MIEDICO et al., 2016; ZIYAADINI et al., 2017), anfíbios (MAHMOOD et al., 2016), répteis (NILSEN et al., 2017), aves (BAUEROVÁ et al., 2017) e mamíferos (KORSTIAN et al., 2018; PÉREZ-LÓPEZ et al., 2016).

Diante aos diversos problemas desencadeados pelo acúmulo de metais potencialmente tóxicos no meio ambiente, o homem vem buscando a cada dia desenvolver estratégias de remediação que, podem ser classificadas em estratégias de remediação *in situ* ou *ex situ* (SONG et al., 2017).

3.5 ESTRATÉGIAS DE REMEDIAÇÃO

O termo remediação é frequentemente utilizado para denominar estratégias (sejam elas químicas, físicas ou biológicas) que possibilitam a remoção de poluentes presentes no meio ambiente podendo ser dividida em duas estratégias distintas: remediação *in situ* e *ex situ*. A estratégia *in situ* ocorre quando o processo de remediação acontece no próprio local da contaminação sem que haja a necessidade de mover os poluentes para outros locais. Já a remediação *ex situ* é um processo que não ocorre no local da poluição havendo a necessidade de transferência do poluente a outro local para que haja tratamento, como por exemplo, no caso de aterros sanitários (KUPPUSAMY et al., 2016). Dentre essas estratégias, a remediação *in situ* foi considerada mais econômica, oferecendo melhores vantagens técnicas e ambientais, mas, a escolha de qual técnica deve ser usada dependerá muito das características do solo, tipos de poluentes a serem removidos, suas concentrações e finalidades (LI et al., 2019a). De acordo com Liu e colaboradores (2018), as estratégias de remediação *in situ* podem ser físicas, elétricas, químicas ou biológicas, enquanto que as estratégias *ex situ* podem ser apenas físicas, químicas ou termais (LIU et al., 2018).

Entretanto, as técnicas de remediação classificadas como físicas, químicas, termais e elétricas podem ser inviáveis economicamente e, em muitos casos, podem desencadear outros danos ao solo, como torná-lo impróprio para cultivo, e aos organismos vivos que ali habitam (KHALID et al., 2017). Assim sendo, muito vem se falando a respeito das técnicas de remediação biológicas, também conhecidas apenas pelo termo biorremediação, que são mais fáceis e

baratas de serem implantadas como ambientalmente mais amigáveis e corretas (LELLIS et al., 2019).

A biorremediação é uma técnica que tem por objetivo promover a remoção e/ou conversão de substâncias tóxicas ao meio ambiente, empregando diversos organismos vivos ou biomassa morta (QUINTELLA; MATA; LIMA, 2019). Estes organismos podem, através de processos bioquímicos, fisiológicos e/ou metabólicos converter poluentes em substâncias menos prejudiciais tais como a água, dióxido de carbono e gás nitrogênio (KAPAHI; SACHDEVA, 2019). No caso dos metais potencialmente tóxicos estes podem ter seus estados químicos alterados, tornando-os menos tóxicos como é o caso do cromo hexavalente óxido-reduzido em cromo trivalente (WANG et al., 2017).

Cientificamente, diversos seres vivos já tiveram suas habilidades biorremediadoras confirmadas tais como as algas (ficorremediação) (LEONG; CHANG, 2020); fungos (micorremediação) (QIAN et al., 2017), plantas (fitorremediação) (SARWAR et al., 2017) e bactérias (IRAVANI; VARMA, 2020). Logo, diversas estratégias biológicas de biorremediação puderam ser desenvolvidas, sendo estas a bioestimulação, bioatenuação, biolixiviação, biopilha, biofiltros, bioventilação, bioissorção e compostagem (CRISTALDI et al., 2017).

Entre os organismos possíveis de serem empregados em processos biorremediadores, os microrganismos representam uma das melhores escolhas, isso porque estão adaptados a uma série de ambientes diversos, mas, principalmente por conseguirem converter, modificar e usar os poluentes como forma de alimento para manutenção de energia e/ou produção de biomassa.

3.6 MICRORGANISMOS E BIORREMEDIAÇÃO

Como é de conhecimento geral, os microrganismos foram os primeiros seres vivos a habitarem o planeta Terra, desde então milhões e até mesmo bilhões de anos se passaram permitindo que os microrganismos, principalmente bactérias, conseguissem se adaptar a diversos tipos de ambiente devido a suas

capacidades metabólicas (BAUM et al., 2017; SRISWASDI; YANG; IWASAKI, 2017).

Em relação aos ambientes com altos níveis de poluição, e nestes incluímos principalmente os prejudicados por metais potencialmente tóxicos, as bactérias podem promover a quebra e/ou transformação de compostos tóxicos em menos tóxicos e até mesmo não tóxicos devido à produção de enzimas que possibilitam o uso destes poluentes como fonte de alimento atuando como biocatalizadores e promovendo uma série de reações bioquímicas que facilitam a degradação do contaminante (ABATENH et al., 2017).

Utilizar microrganismos como possíveis organismos biorremediadores não é tarefa fácil, apenas o contato com o poluente não é sinônimo de que determinada comunidade bacteriana sobreviva e consiga quebrar/transformar contaminantes (ABATENH et al., 2017). Para tanto, é necessário à existência de microrganismos selvagens presentes no local poluído que sejam capazes de degradar o contaminante (KAPAHI; SACHDEVA, 2019). Outros fatores como pH, temperatura, solo, presença de oxigênio, aceptores de elétrons, nutrientes e fatores biológicos tais como interações antagônicas e predação entre microrganismos também devem ser considerados (AYANGBENRO; BABALOLA, 2017).

Em relação aos metais potencialmente tóxicos, os microrganismos podem apresentar diversos mecanismos de resistência, tais como oxidação do metal, bombas de efluxo, metilação, desmetilação, degradação de ligante de metal, sequestro intra ou extracelular, exclusão por barreira de permeabilidade bem como produzir quelantes (metalotioneínas e biossurfactantes) (IGIRI et al., 2018). Todos esses mecanismos citados estão intimamente relacionados ao material genético microbiano propenso a diversas mudanças genéticas graças a mecanismos como transferência de genes por conjugação, transformação e transdução, além dos mecanismos de transposição (e.g. transposons), que contribuem para o surgimento de novas características (DAS; DASH; CHAKRABORTY, 2016).

3.7 IMPORTÂNCIA DE ESTUDOS GENÉTICOS EM MICRORGANISMOS

Uma das grandes vantagens em se estudar o material genético de microrganismos a fim de compreender possíveis mecanismos de resistência a metais potencialmente tóxicos, consiste no fato da maioria não ser passível de cultivo por métodos microbiológicos tradicionais ou até mesmo serem incultiváveis, logo, o uso de abordagens independentes de cultura acabam sendo uma alternativa viável para sobrepor esta questão (BERINI et al., 2017). Graças aos avanços das tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (NGS: *Next Generation Sequencing*) e análises de bioinformática, alguns autores como Malla e colaboradores (2018), acreditam que atualmente seja possível haver maiores “insights” sobre as comunidades microbianas em locais contaminados sendo possível estudar mecanismos fisiológicos, bioquímicos e metabólicos dos microrganismos, afirmando ainda, serem de grande auxílio às ferramentas “ômicas”, como genômica, transcriptômica e proteômica, para a compreensão da “black - box” microbiana (MALLA et al., 2018).

Alguns microrganismos tais como *Microbacterium* spp. (CORRETTO et al., 2015), *Alkaliphilus metalliredigens* cepa QYMF (HWANG et al., 2016), *Bacillus cereus* (NAYAK et al., 2018), *Serratia marcescens* RSC-14 (KHAN et al., 2017) e os filos *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes* e *Bacteroidetes* (JIANG et al., 2019) são alguns exemplos de grupos de bactérias que possuem genes que lhes garantem a sobrevivência em meio contaminado por metais potencialmente tóxicos, onde, apenas foi possível identificá-los através do sequenciamento de genomas. No entanto, apenas saber quais os possíveis genes presentes no genoma de um microrganismo, não é garantia de que estarão sendo expressos, porém, ao se utilizar a transcriptômica é possível identificar quais destes genes estão sendo realmente transcritos (CRAMER, 2019).

3.8 TRANSCRIPTOMA E METATRANSCRIPTOMA

Através do dogma central da biologia molecular, hoje é possível entender como as informações genéticas presentes nos genes que constituem a molécula de DNA, são expressas caracterizando, juntamente com os fatores ambientais, o fenótipo de um organismo vivo (CRICK, 1970; KUKURBA; MONTGOMERY,

2015). A informação genética armazenada no DNA é transcrita em RNA e, posteriormente traduzida em proteínas (CRICK, 1970), porém, nem todos os genes presentes em um genoma são transcritos e alguns ainda, são transcritos em determinados momentos, o mesmo ocorre para as proteínas, não são todos os RNAs que serão traduzidos (CRAMER, 2019).

Uma pergunta muito interessante diz respeito à diversidade de tipos celulares que constituem os mais variados tecidos e órgãos de um organismo vivo. Se o material genético é o mesmo, como há tantos tipos celulares diferentes? Isso se dá graças à expressão gênica diferencial que é extremamente dinâmica, não sendo afetada apenas pelo material genético como por questões multifatoriais, por exemplo, o ambiente (MCDERMAID et al., 2019). O RNA é o processo chave da expressão gênica por ser o grande responsável pela complexidade da vida, principalmente em eucariotos (STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019).

As moléculas de RNA, portanto, são muito importantes para que seja possível compreender e interpretar os elementos funcionais de um genoma, a transcrição de um conjunto específico de genes caracteriza a identidade de um tipo celular como regula as atividades biológicas dentro destas. Ao conjunto completo de moléculas de RNA presentes em um organismo vivo é dado o nome de transcriptoma (MANZONI et al., 2016). Estes RNAs podem ser divididos em duas classes principais: os RNAs codificantes de proteínas (cRNA), tais como o RNA mensageiro (mRNA), ribossomal (rRNA) e RNA de transferência (tRNA) (WANG; FARHANA, 2022); e os RNAs não codificantes, chamados em inglês de *Non-coding RNA* (ncRNA), onde estão classificadas aquelas moléculas de RNA que não são traduzidas, mas são de extrema importância em outros processos biológicos como os pequenos RNAs nucleares (snRNA), pequenos RNAs nucleolares (snoRNA), microRNAs (miRNA), piwi RNA (piRNA), RNAs longos não-codificantes (lncRNA) e os RNAs circulares (circRNA) (ANASTASIADOU; JACOB; SLACK, 2018).

Estudos de transcriptômica são geralmente empregados quando o intuito é investigar mudanças fenotípicas, processos de desenvolvimento, estresses ambientais ou doenças (DROST et al., 2018). Também é possível realizar estudos que envolvam o transcriptoma de mais de um indivíduo como, por exemplo,

pesquisas que buscam investigar a expressão de transcritos de uma microbiota, seja no solo, oceano ou até mesmo associadas a hospedeiros, como plantas, e animais. Dessa forma, é possível encontrar associações de perfis transcricionais em relação a um dado momento sob determinadas condições ambientais. Isso também possibilita alcançar uma maior compreensão acerca das funções de genes que estão sendo expressos (SHAKYA; LO; CHAIN, 2019). A esse tipo de estudo é dado o nome de metatranscriptômica, ou seja, conjunto de RNAs de diferentes organismos em um determinado ambiente ou meio de cultura (SHI; ZHANG; HOLMES, 2018).

3.9 IMPORTÂNCIA EM SE ESTUDAR O METATRANSCRIPTOMA

A metatranscriptômica vem sendo constantemente usado em estudos a respeito do material genético coletivo de microrganismos que constituem os mais diversos microbiomas tais como o ambiente aquático (BERG et al., 2018), terrestres (HOLMES et al., 2017), atmosférico (AMATO et al., 2019) e o próprio organismo humano (HATTON et al., 2017; MARCELINO et al., 2019; MEHTA et al., 2018; SOLBIATI; FRIAS-LOPEZ, 2018), além de interações entre animais - micróbios (LI et al., 2019b; LI; GUAN, 2017) e plantas - micróbios (GONZALEZ et al., 2018; IGIEHON; BABALOLA, 2018; LLOYD et al., 2018).

Comunidades bacterianas do solo são vitais em diversos processos envolvendo o ecossistema como ciclagem de nutrientes e de carbono, como também relacionadas ao crescimento vegetal. Com o auxílio de estudos de sequenciamento de alto rendimento, diversas comunidades bacterianas do solo puderam ter sua composição e diversidade identificadas sem precisar de métodos de cultivo laboratoriais (JANSSON; HOFMOCKEL, 2018). Para alcançar diferentes níveis de informação a respeito das comunidades bacterianas alguns métodos podem ser utilizados como a análise de RNA ribossômico (rRNA), análise *shotgun* de genoma completo (WGS; metagenômica) e análise *shotgun* de transcriptoma completo (metatranscriptômica) (NIU et al., 2018).

3.10 ANÁLISE DO GENE 16S rRNA

Segundo Niu e colaboradores (2018) a análise de dados de marcadores moleculares como o gene 16S rRNA pode ser considerada um dos métodos mais populares e baratos na identificação taxonômica até o nível de gênero de uma comunidade bacteriana (NIU et al., 2018). Isso ocorre devido a três pontos importantes: a função do gene 16S rRNA é extremamente conservada em bactérias não tendo se alterado muito ao longo do tempo onde, a presença de mudanças genéticas pode ser relacionada à evolução de determinado microrganismo, também é um gene presente em todas as bactérias e arqueas, além de ter tamanho suficiente para a realização de estudos de bioinformática (CAO et al., 2017; NIU et al., 2018). Com base nas semelhanças das sequências de nucleotídeos presentes no gene 16S rRNA é possível juntar estas sequências em OTUs (Unidade Taxonômicas Operacionais) que são submetidas a bancos de dados biológicos para a identificação taxonômica da comunidade bacteriana (CAO et al., 2017).

Para a obtenção do gene 16S rRNA, é necessário o sequenciamento de *Amplicons* (produtos de amplificação por PCR - Reação em Cadeia da Polimerase) de um único isolado, onde, normalmente o método de sequenciamento de Sanger é utilizado. As sequências obtidas posteriormente devem ser comparadas entre si para a obtenção de uma sequência consenso. Esse procedimento inicia com a leitura das bases a partir dos cromatogramas gerados pelo equipamento sequenciador, passa pela identificação de possíveis artefatos, e segue até a montagem da sequência consenso. Nesta etapa, utiliza-se o pacote de programas denominado phredPhrap desenvolvido pelo Dr. Phil Green e colaboradores da Universidade de Washington (EWING et al., 1998) dividido nos programas Phrep, Phrap, Cross-match e Consed.

Para uma possível identificação das sequências podemos usar certos bancos de dados que permitem como entrada a sequência montada de fragmentos do gene 16S rRNA, tais como o banco de dados RDP (WANG et al., 2007) e o SILVA (QUAST et al., 2013).

3.11 DO SEQUENCIAMENTO DE SANGER AO NGS

As tecnologias de sequenciamento de DNA existem desde os anos de 1970, porém, eram caras, complexas e, muitas vezes, necessitavam de reagentes tóxicos ou radioativos; no ano de 1977 foi desenvolvido por Frederick Sanger o método de sequenciamento de Sanger que formou a base para a primeira geração de sequenciadores automatizados de DNA, apesar do avanço era impossível sequenciar o genoma em sua totalidade, além de ser uma técnica complicada, demorada e custosa (BESSER et al., 2018). Foi no início da década de 1990, com o advento do Projeto Genoma Humano que a demanda por métodos mais sofisticados de sequenciamento se tornou ainda mais premente. Afinal, o objetivo final desse projeto foi sequenciar e interpretar os 3,2 bilhões de pares de bases de nucleotídeos que constituem o genoma humano (VINCENT et al., 2017).

O sequenciamento de nova geração ou de próxima geração (NGS – *Next-generation sequencing*) surgiu no início dos anos 2000 proporcionando uma grande mudança nas tecnologias de sequenciamento, agora era possível sequenciar muito mais pares de base, tornando a tecnologia mais barata e rápida comparada ao método de Sanger (VAN DIJK et al., 2014). Segundo MacCannell (2016), essa nova abordagem de sequenciamento poderia, em termos de contribuição aos avanços científicos, ser comparada ao surgimento da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) desenvolvida por Kary Mullis na década de 1980 (MACCANNELL, 2016).

Não apenas foi possível sequenciar genomas completos como também transcritos e proteínas. Em 1995 foi criado o primeiro método de sequenciamento de transcriptomas (em escala “ômica”) o sequenciamento SAGE (Análise serial de expressão gênica) baseado no método de Sanger (WANG et al., 2019); com o surgimento de NGS, técnicas de sequenciamento de transcritos ficaram mais rápidas e baratas possibilitando o sequenciamento de bilhões de pares de bases, tendo como principais métodos o RNA-Seq. Os métodos baseados em sequenciamento como o RNA-Seq tornaram obsoletos os microarranjos baseados em hibridização em larga-escala (LOWE et al., 2017).

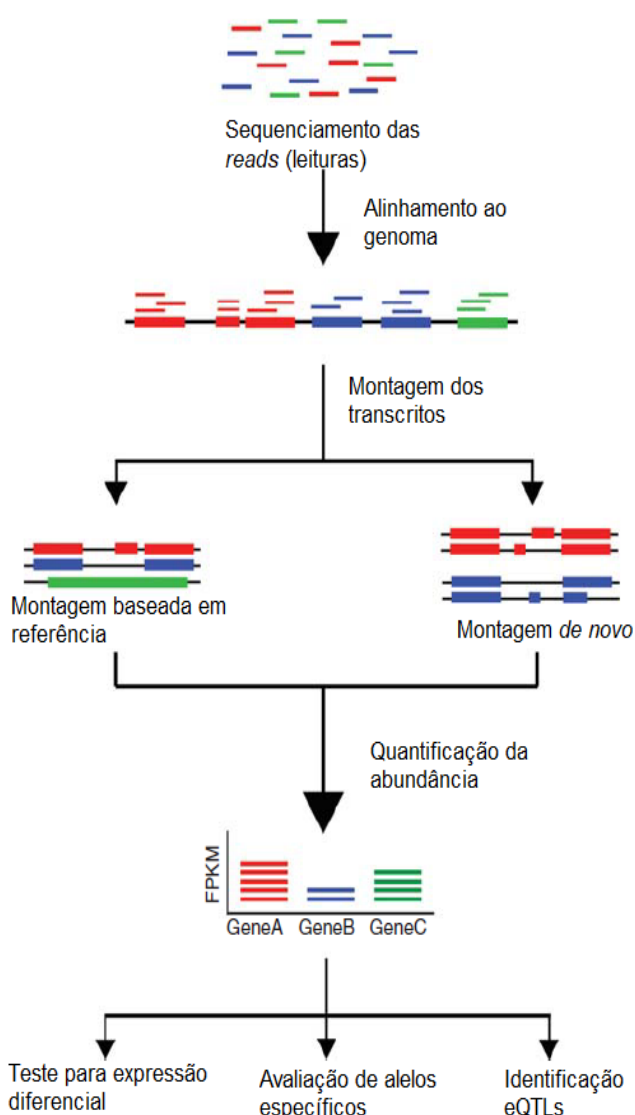
3.12 ANÁLISE SHOTGUN DE TRANSCRIPTOMA COMPLETO - RNA-Seq

Atualmente é possível sequenciar todo genoma de um organismo, para tanto muito se adota o método de sequenciamento denominado de estratégia de *shotgun*, onde, enzimas de restrição são empregues com o intuito de fragmentar, em milhares ou milhões de “pedaços” (leituras ou *reads*) um cromossomo (SHARPTON, 2014). Após esta etapa é como se tivéssemos milhares de peças de um quebra-cabeça e devêssemos montá-lo, podendo utilizar duas abordagens distintas: montagem com referência ou montagem *de novo* (Figura 2). Na primeira abordagem às diversas leituras são comparadas a um genoma referência aonde irão se sobrepor a regiões similares do genoma (DIERCKXSENS; MARDULYN; SMITS, 2017); na analogia do quebra-cabeça é como se olhássemos para a imagem da caixa do jogo onde há uma figura da imagem que se deseja montar. Já na abordagem *de novo*, a montagem das sequências parte do zero, ou seja, não há um genoma no qual seja possível comparar às sequências, logo, as leituras serão comparadas entre si (LISCHER; SHIMIZU, 2017; SCHNEEBERGER et al., 2011); ou seja, não há nenhuma imagem de como seria a figura do quebra-cabeça devendo montá-lo apenas com base no encaixe das peças.

A metodologia *shotgun* não é apenas usada em estudos genômicos como também em análises de transcriptômica, para tanto é empregue uma técnica denominada de RNA-Seq onde, após o isolamento das moléculas de RNA, é preciso criar bibliotecas de RNA-Seq (KUKURBA; MONTGOMERY, 2015). Porém, as tecnologias de sequenciamento requerem moléculas de DNA, logo, as moléculas de RNA devem ser transcritas em moléculas de cDNA através do processo de transcrição reversa. Às moléculas de cDNA, as quais durante o processo são fragmentadas, são adicionados adaptadores para que sejam amplificadas (HRDLICKOVÁ; TOLOUE; TIAN, 2016). Várias plataformas de sequenciamento podem ser usadas, entretanto, nos dias atuais, a empresa Illumina é a responsável por fornecer as plataformas mais usadas, aplicando uma abordagem de sequenciamento por síntese, onde a leitura das bases é realizada a partir da síntese de fita complementar as fitas moldes que previamente foram amplificadas diretamente em uma lâmina de fluxo, ou *flow cell* (LAHENS et al., 2017).

Após a etapa de sequenciamento das bibliotecas de RNA-Seq tem se início a análise dos dados brutos, ou seja, uma análise prévia de qualidade das sequências que ainda não passaram pela etapa de processamento, para este fim pode ser usado um programa denominado FastQC (LEGGETT et al., 2013). Estas sequências brutas passarão por uma etapa de processamento onde ocorrerá a remoção de adaptadores que pode ser realizada pelo programa Atropos (DIDION; MARTIN; COLLINS, 2017), e por uma remoção de bases e leituras que tenham baixa qualidade de acordo com o índice de qualidade Phred ("Q score", relacionado à probabilidade P de a base ter sido lida incorretamente, ou seja, $Q = -10 \cdot \log_{10}[P]$), podendo ser utilizado o programa Prinseq (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011). Em seguida a etapa de processamento, novamente o programa FastQC pode ser usado para a checagem de qualidade das sequências. Com as sequências processadas é possível realizar a montagem de um transcriptoma ou metatranscriptoma. No caso de uma abordagem baseada em referência, usando programas como o Cufflinks (TRAPNELL et al., 2010) o qual reconhece alinhamentos de leituras RNA-Seq com uma referência (genoma ou transcriptoma), obtidos a partir de programas como Bowtie2 (LANGMEAD et al., 2009), TopHat (TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009) ou STAR (DOBIN; GINGERAS, 2015). No caso de abordagem que não possua ou utilize referências, utiliza-se normalmente o programa Trinity (HAAS et al., 2013) para a montagem *de novo* do transcriptoma.

Figura 2 - RNA-Seq: Principais etapas.



Fonte: Adaptado de Kukurba e Montgomery (2015).

3.13 METATRANSCRIPTOMA E BACTÉRIAS RESISTENTES A METAIS

Nosso ecossistema sofre grande influência de microrganismos que conseguem, devido ao seu ciclo de vida curto e organização genética, acumular rapidamente alterações genômicas provenientes de processos como mutação, recombinação gênica, elementos transponíveis (transposons) e duplicação gênica. Esses mecanismos garantem, através do desenvolvimento de novas características, que microrganismos possam sobreviver aos mais diversos habitats incluindo aqueles poluídos por metais potencialmente tóxicos (PRABHAKARAN; AQEEL ASHRAF; SYAIDATUL AQMA, 2016). A seleção

natural privilegia capacidades metabólicas que permitem a transformação ou remoção de poluentes, portanto, entender o metatranscriptoma de uma comunidade bacteriana nos permite compreender a expressão gênica específica em resposta aos mais diversos estímulos ambientais, dentre estes, a poluição por metais potencialmente tóxicos (CABRAL et al., 2016).

Em ambientes poluídos por metais potencialmente tóxicos os microrganismos que ali vivem tendem a expressar genes específicos de resistência e detoxificação a determinados metais, por exemplo: os genes *cadB* e *cadD* são encontrados em muitas bactérias que sobrevivem em ambientes contaminados pelo cádmio sendo responsáveis por codificar proteínas de ligação ao cádmio e metalotioneínas (*cadB*) e ligantes de cádmio (*cadD*) (ABBAS et al., 2018; DAS; DASH; CHAKRABORTY, 2016). Muitos outros genes podem ser mencionados, tais como o gene *pbrD*, responsável por codificar proteínas de ligação ao chumbo; os genes *merA* e *merB* relacionados à resistência a mercúrio, onde, o primeiro codifica para enzima denominada de mercúrio-íon redutase e o segundo, para enzima organomercúrio liase; na presença do metal zinco, podem ser expressas pelo gene *niCoT* a enzima níquel-cobalto transferase (DAS; DASH; CHAKRABORTY, 2016).

Este trabalho busca, por meio de análises de metatranscriptoma, compreender melhor genes transcritos por bactérias que conseguem sobreviver a ambientes contaminados por cromo hexavalente e trivalente e cobre bivalente.

3.14 GENES BACTERIANOS EXPRESSOS NA PRESENÇA DE CROMO (Cr)

Segundo a revisão de literatura realizada por Pushkar e colaboradores (2021), muitos genes estão envolvidos no mecanismo de desintoxicação de cromo realizado por bactérias como forma de proteção ao metal sendo os principais *chrA*, *chrB*, *chrR*, *chrB*, *chrC*, *chrT* e *yieF*; além destes genes, outros ainda estão envolvidos no processo de oxido-redução de Cr^{+6} a Cr^{+3} como *nfrA* e *nemA* (PUSHKAR et al., 2021).

O gene *chrA* e *chrB* são geralmente expressos quando as bactérias estão em um ambiente com alta concentração de cromo (Cr) e, quando expressos em conjunto possibilitam uma maior resistência ao metal quando expressos

individualmente (BRANCO; MORAIS, 2013; SHAW; DUSSAN, 2018). O gene *chrA* está envolvido no transporte de Cr pela célula por codificar proteínas pertencentes à família de transportadores de íons cromato (*chr*) (BAAZIZ et al., 2017; GU et al., 2020); já o gene *chrB* pode atuar como um regulador do *operon chr*, tendo forte papel na redução de Cr⁺⁶ a Cr⁺³ que, posteriormente é transportado pela célula via *chrA*. Além disso, o gene *chrB* também atua como um modulador para a codificação da proteína *chrA* e é extremamente importante na conferência de resistência ao Cr; em conjunto, esses dois genes também reduzem a toxicidade ao cromato (BRANCO et al., 2008; DONG et al., 2018a).

O produto gênico oriundo da expressão dos genes *yieF* e *chrR* está relacionado à transferência de elétrons para Cr⁺⁶ gerando, concomitantemente, espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio de dois mecanismos que recebem o nome de classe I (*tight*) e classe II (*semi-tight*) (BALDIRIS et al., 2018); todavia, o dano oxidativo induzido por Cr ao material genético é superado através da ativação dos sistemas Rec e de reparo (THORGERSEN et al., 2017). Cada um desses genes possui um mecanismo distinto na redução de Cr⁺⁶: *yieF* reduz Cr⁺⁶ a Cr⁺³ de maneira direta por transferência de três elétrons; *chrR* promove a redução de Cr combinando etapas de transferência de um ou dois elétrons o que gera mais ROS em comparação com *YieF* que detém apenas uma etapa de redução (BAAZIZ et al., 2017). Outro gene envolvido na redução de cromo hexavalente a trivalente recebe o nome de *chrT* que codifica proteínas pertencentes à família FMN-redutase (ALHEBSHI; EL-BESTAWY, 2018; GU et al., 2020).

Também há genes que promovem a redução catalítica de Cr⁺⁶ para Cr⁺³ como o gene *nfrA* relatado como tendo capacidade elevada de aceitação de elétrons que, posteriormente são empregues em reações de redução codificando proteínas pertencentes à família nitro/flavoredutase; outros genes envolvidos na redução catalítica do cromo são os genes *nfsA*, *nemA* e *lpDh* (AL HASIN et al., 2010; ZHENG et al., 2014). Segundo um estudo realizado por Ma e colaboradores (2019) os genes *nfsA* e *nemA* estão mais expressos em bactérias que acabaram de serem expostas ao metal cromo (MA et al., 2019).

3.15 GENES BACTERIANOS EXPRESSOS NA PRESENÇA DE COBRE (Cu)

Os mecanismos de resistência ao cobre foram muito estudados em *Escherichia coli*, onde um mecanismo regulador duplo de resistência acabou sendo identificado (HIGGINS et al., 2020). O primeiro desses reguladores é controlado pela expressão de dois genes: *cusR* e *cusS* que, em união formam um par de sensores reguladores da expressão gênica do operon *cusCFBA* (CHEN et al., 2020). A partir dos genes *cusCBA* uma proteína é sintetizada funcionando de forma similar ao complexo antiportador presente em membranas celulares onde ocorre o efluxo de íons metálicos em troca do influxo de H^+ (DAS; DASH; CHAKRABORTY, 2016); o gene *cusF*, por sua vez, aumenta o acúmulo de cobre no interior celular através da ligação ao metal na região periplasmática, a proteína produzida a partir deste gene detém aminoácidos aspartato, histidina e metionina que necessitam de ligações com átomos de cobre (CUBILLAS et al., 2017; DAS; DASH; CHAKRABORTY, 2016).

O segundo regulador de resistência é chamado de *cue* ou sistema de efluxo de cobre, neste podemos encontrar o gene *cueR* responsável por regular outros dois genes que também participam deste mecanismo, *copA* e *cueO* (HIGGINS et al., 2020). O gene *copA* produz uma ATPase do tipo P, já o gene *cueO* produz uma oxidase que consegue oxidar o Cu(I) em Cu(II) que é bem menos tóxico (HE et al., 2021). Outros genes relacionados a mecanismos de resistência a cobre são *csor*, um gene regulador que na presença de Cu(II) acaba reprimindo a expressão de genes resistentes ao metal cobre (FAKHOURY et al., 2021); o operon *copYAZ*, identificado em uma cepa de *Streptococcus*, sendo *copY* e *copZ* genes codificadores de proteínas de ligação a metais potencialmente tóxicos (PURVES et al., 2018); operon *copRSCD* identificado em *Pseudomonas fluorescens* (HU et al., 2009; NOVOA-APONTE et al., 2020), operon *hpcopA*, responsável por exportar cobre e operon *hpcolP*, responsável por importar cobre em *Helicobacter pylori* (PRASAD, 2020). Em *Bacillus subtilis*, outro sistema regulador de cobre foi identificado sendo mediado por *yanJ* e regulado por *ycnK* e *csor*, onde estes genes unidos garantem a homeostase de cobre na célula (PRASAD, 2020).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COMUNIDADE BACTERIANA

A comunidade bacteriana (C04) utilizada no presente trabalho faz parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental (DBTAA) da FCAV, coordenado pela Profa. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos e Profa. Lúcia Maria Carareto Alves. Tal amostra foi coletada em março de 2016 a partir de raízes da leguminosa *Arachis pintoi*, popularmente conhecida por amendoim forrageiro, encontrada em um canteiro logo à frente do Departamento de Produção Vegetal (Fitotecnia), da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), localizada na cidade de Jaboticabal (SP) sob as coordenadas geográficas: Latitude 21,243070S e Longitude 48,29939O. Após a coleta, a comunidade foi cultivada em meio NB (*Nutrient Broth*) composto por 3,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura; 15,0 g.L⁻¹ de peptona de soja; e 1,0 g.L⁻¹ de glicose (Sigma Aldrich, St Louis EUA). O trabalho de isolamento também foi realizado pelo grupo de pesquisa do LBMP do DBTAA da FCAV/UNESP (BONALDI, 2021).

4.2 ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

A capacidade de tolerar os metais cromo hexavalente (Cr⁺⁶), cromo trivalente (Cr⁺³) e cobre bivalente (Cu⁺²), foram avaliadas por meio do ensaio de Concentração Mínima Inibitória (CIM), cujo objetivo é determinar a concentração mínima do metal que inibe o crescimento bacteriano.

Foram preparadas soluções estoques dos metais potencialmente tóxicos na concentração de 0,02M dos sais CrCl₃.6H₂O (empregado na dissolução de Cr⁺³), K₂Cr₂O₇ (aplicado na dissolução de Cr⁺⁶) e CuSO₄.5H₂O (usado na dissolução de Cu⁺²), que foram dissolvidos em água deionizada e posteriormente foram filtradas (0,22 µm Satorius Millipore) e armazenadas a 4 °C.

A comunidade bacteriana foi cultivada em meio de cultura NB suplementado com concentrações diferentes de metais potencialmente tóxicos entre a faixa de 0,25 a 405 mM. O meio de cultura foi previamente tamponado com Tris-HCl a um pH de 7,5. A concentração celular inicial foi baseada na absorção de 0,1 de DO_{600nm} que equivale a 10⁸ células mL⁻¹. Os cultivos foram incubados a uma temperatura de 30 °C sob agitação constante de 150 rpm

por 5 dias. Os cultivos nas diferentes concentrações foram realizados em triplicatas. Este trabalho também foi realizado pelo grupo de pesquisa do LBMP (BONALDI, 2021).

4.3 EXTRAÇÃO DE RNA, CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO

O processo de extração de RNA foi realizado, a partir do cultivo da comunidade em meio NB para a condição controle e em NB suplementada com metais nas concentrações 4,0 mM para Cr⁺³, 0,5 mM para Cr⁺⁶ e 2,0 mM para Cu⁺² para as condições de tratamento, durante 24 horas, sob agitação constante a 30 °C. Após o período de incubação, o cultivo foi centrifugado a 4000 xg por 30 min a 4 °C, e em seguida os *pellets*, foram submetidos ao processo de extração de RNA total com o auxílio do kit Illustra RNA spin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare). O material obtido das extrações foi quantificado com Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) empregando-se o kit Qubit™ RNA Assay Kit (Invitrogen®). Em seguida, foi executada a remoção dos RNA ribossomais (rRNA) com RiboMinus™ Transcriptome Isolation Kit for Bacteria (Life Technologies) seguindo, todos os procedimentos mencionados, as devidas recomendações dos fabricantes.

Durante o sequenciamento de RNA-Seq, as bibliotecas de cDNA construídas foram montadas com base no protocolo TruSeq® RNA Sample Preparation v2 (illumina®) e para o sequenciamento destas bibliotecas utilizou-se a plataforma Illumina®, equipamento MiSeq aplicando-se kits Paired-End Cluster Generation Kit v3 (Illumina®) e TruSeq™ SBS Kit v3 - 200 Cycles (Illumina®). Um total de 12 bibliotecas foram obtidas, uma vez que, para o devido estudo, consideramos 3 réplicas para cada uma das quatro condições. Todos os métodos adotados nesta etapa, também seguiram as recomendações dos fabricantes.

4.4 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS DA COMUNIDADE E IDENTIFICAÇÃO

Para o isolamento das bactérias, realizamos diluições seriadas 10^{-4} a 10^{-7} a partir do cultivo da comunidade bacteriana e as diluições foram plaqueadas em meio NA. Após 24 horas de cultivo, as placas foram avaliadas com o auxílio de uma lupa. As colônias que apresentaram características morfológicas distintas foram coletadas e cultivadas isoladamente em meio de cultura NB. Após o cultivo dos isolados uma alíquota de 1 μ L foi centrifugada e os *pellets* foram submetidos ao processo de extração de DNA com o kit QIAmp DNA Mini Kit da Quiagen®. Em seguida, foi realizada a amplificação do gene 16S do rRNA com os *primers* RD1 e FD1. O produto derivado da PCR passou por um processo de purificação, para isso utilizamos o kit da Zymoclean Gel DNA Recovery. Em seguida as amostras da comunidade da comunidade foram ao sequenciamento na plataforma ABI 3130XL. Ao final foram realizados o sequenciamento de nove *amplicons* obtidos com *primers* diferentes (FD1, RD1(WEISBURG et al., 1991), 8F (SUN et al., 2014), 362, 786, 907, 1203 (MENNA et al., 2006), V3-V4F e V4 (MUNYAKA et al., 2015) para cada uma das amostras da comunidade, sendo assim, possível obter o gene 16S quase em sua totalidade.

Com a finalidade de montarmos as sequências do gene 16S, foi empregado o pacote phredPhrap (phred v.0.071220.c, phrap v.1.090518) (EWING et al., 1998). As sequências montadas foram analisadas com o programa RDP Classifier training set 18 (WANG et al., 2007), SILVA ACT (*Alignment, Classification and Tree Service*) com banco de dados v138 SSU (QUAST et al., 2013) e BLASTn, do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), usando o banco de dados padrão com sua coleção de nucleotídeos (*Nucleotide – Nucleotide BLAST v.2.2.29*).

4.5 ANÁLISE DOS DADOS DE RNA-SEQ DO METATRANSCRIPTOMA

4.5.1 PRÉ-PROCESSAMENTO DE DADOS

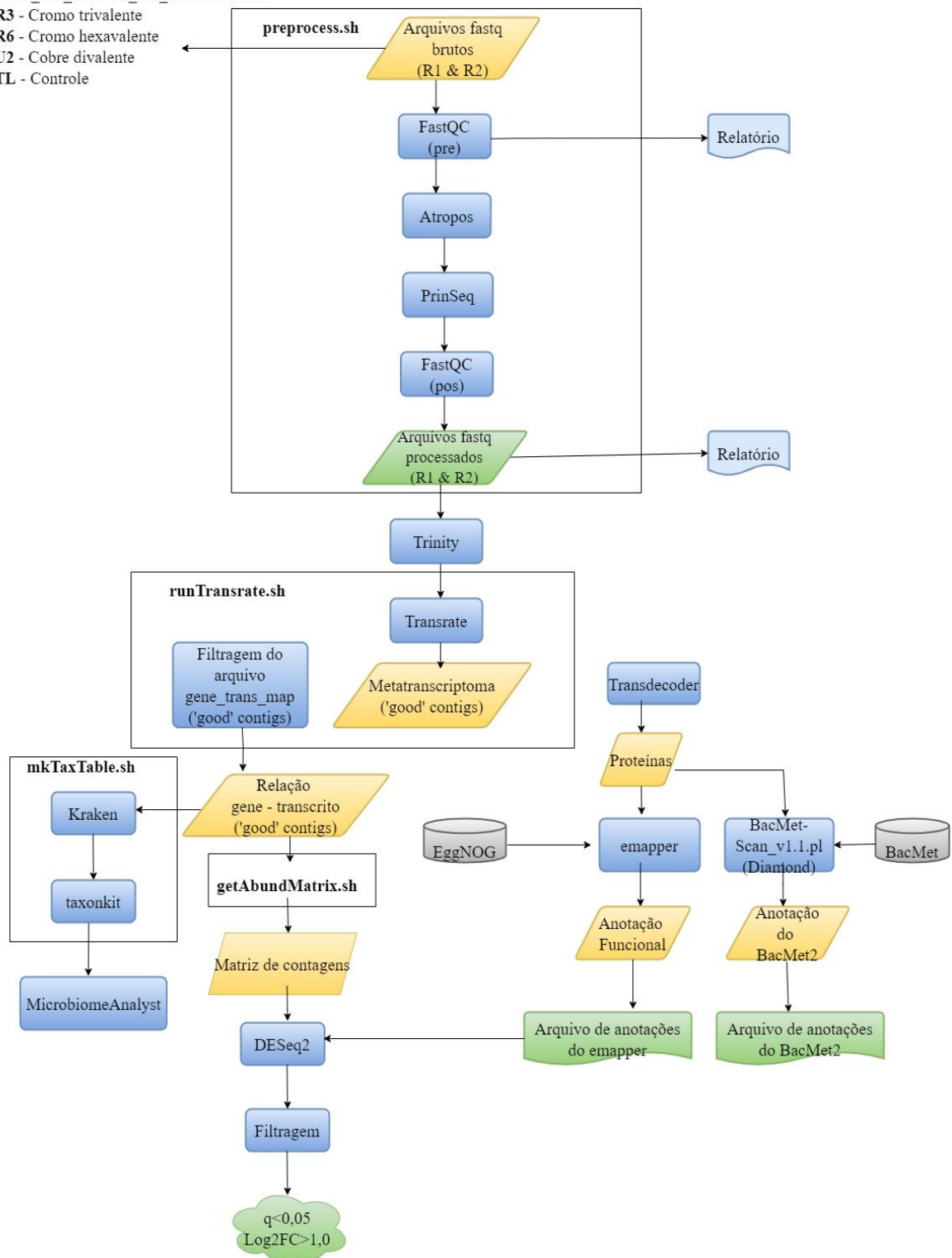
Foram obtidas doze bibliotecas de cDNA contendo, cada qual, um par de sequências fragmentadas denominadas de *read 1* (R1) e *read 2* (R2), cada uma sequenciada a partir de sentidos opostos a fita de cDNA (*forward* e *reverse*). Todas as amostras da comunidade, assim como suas réplicas biológicas, receberam uma denominação de acordo com o tratamento submetido, sendo as amostras da comunidade controle denominadas por CTL_RB1, CTL_RB2 e CTL_RB3, as amostras da comunidade com a adição de cromo trivalente (Cr^{+3}) por CR3_RB1, CR3_RB2 e CR3_RB3, as amostras da comunidade de cromo hexavalente (Cr^{+6}) por CR6_RB1, CR6_RB2 e CR6_RB3, e as amostras da comunidade de cobre bivalente (Cu^{+2}) por CU2_RB1, CU2_RB2 e CU2_RB3.

As sequências de cDNA são constituídas por arquivos brutos (*raw*), ou seja, de sequências que ainda não passaram pela etapa de processamento de dados. As sequências são manipuladas em um formato denominado FASTQ. Em um primeiro momento utilizamos o programa FastQC v0.11.5 (LEGGETT et al., 2013) para verificarmos a qualidade das leituras brutas, gerando relatórios pré-processamento para cada arquivo R1 e R2 referentes às bibliotecas.

Figura 3 - Fluxograma ilustrando as principais etapas utilizadas na metodologia de processamentos de dados.

NOME_DO_GRUPO_DE_AMOSTRAS:

CR3 - Cromo trivalente
CR6 - Cromo hexavalente
CU2 - Cobre divalente
CTL - Controle



Fonte: Autoria própria.

4.5.2 PROCESSAMENTO DOS DADOS

Para a realização da montagem do metatranscriptoma bacteriano, as leituras brutas passaram por uma etapa de processamento de dados para remover sequências de adaptadores e bases de baixa qualidade.

Utilizamos o programa Atropos v1.1.21 (DIDION; MARTIN; COLLINS, 2017) para a remoção/poda dos adaptadores (*adapter trimming*) empregados no preparo das bibliotecas (Tabela 1).

Foi considerado inicialmente o Atropos no modo *insert* (*--aligner insert*) com duas passadas (*--times 2*), tamanho mínimo de 1 par de base (pb) (*--minimum-length 1*), sobreposição entre as sequências da leitura e adaptador de 3 pb (*--overlap 3*), eliminando bases de baixa qualidade (*Phred Score*) abaixo de 10, no modo de correção de bases conservativo (*--correct-mismatches conservative*) e na seguinte ordem de operações (*--op-order GAWCQ*): poda de bases específicas do sequenciador NextSeq [poli(G) na extremidade] (não utilizada); poda de adaptadores; sobreposição de bases de baixa qualidade (correção de bases); poda incondicional (não utilizada); poda por baixa qualidade. Por fim, há a eliminação das leituras aos pares em tal etapa, caso uma delas corresponda aos critérios de filtragem. Posteriormente, consideramos o Atropos no modo *adapter* (*--aligner adapter*) com os mesmos valores dos parâmetros na execução anterior. As leituras que passaram desta etapa seguiram no processo.

O programa Prinseq-lite v0.20.4 (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011) foi utilizado em seguida para a remoção das bases de baixa qualidade das leituras (*low-quality trimming*). Esse processo foi configurado para considerar uma janela de tamanho 3 pb deslizando 1 pb a partir da extremidade 3' em direção à extremidade oposta, caso a média de qualidade da base fosse menor que 30. A cada deslizamento havia a remoção da base fora da janela. Com o mesmo programa, caso a leitura apresentasse menos que 20 pb após as podas ela era eliminada. Além disso, também eliminamos as leituras de baixa complexidade, considerando as leituras com score DUST maior que 50.

Com as sequências processadas, novamente realizamos uma avaliação de qualidade com o programa FastQC gerando desta vez relatórios pós-

processamento. Para esta etapa prévia de processamento de dados (pré-processamento) foi criado um *bash script*¹ a fim de automatizar este processo.

Tabela 1 – Parâmetros para a definição das sequências dos adaptadores usados no programa Atropos.

| Atropos - Adaptadores |
|---|
| -a GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACNNNNNNATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG |
| -g AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT |
| -A AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCATT |
| -G CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATNNNNNNGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT |

4.5.3 MONTAGEM DO METATRANSCRIPTOMA

As leituras processadas foram renomeadas adicionando o sufixo 1 e 2 para todos os arquivos fastq (formato das sequências) para que fosse possível dar início a etapa de montagem *de novo* do metatranscriptoma.

O programa Trinity v2.13.1 (GRABHERR et al., 2011) foi usado para a montagem *de novo* do metatranscriptoma, onde, não apenas diversos transcritos foram montados como também foi fornecido uma relação gene-transcrito. O programa Trinity é subdividido em três outros programas que recebem o nome de *Inchworm* (lagarta), *Chrysalis* (crisálida) e *Butterfly* (borboleta). O programa *Inchworm* realiza o corte de leituras em *K-mers* (leituras de tamanho “k”), realizando uma sobreposição e extensão, com base na cobertura das sequências promovendo a montagem de sequências contíguas (*contigs*) lineares e sem vínculo; o programa *Chrysalis* realiza um agrupamento das *contigs* que compartilhem, pelo menos, *K-1 mers* promovendo a construção de grafos de Bruijn (*Bruijn graphs*) e mapeando as leituras aos componentes; por fim, o programa *Butterfly* constrói grafos de Bruijn independentes para cada componente que corresponderá a um gene.

O programa Trinity realiza a montagem de *contigs* que, neste caso, referem-se a cada um dos transcritos. Os parâmetros do Trinity modificados para esta montagem foram para tornar um pouco mais rigoroso o requisito de extensão

¹ preprocess.sh

de um caminho na etapa do *Butterfly*, considerando um mínimo de 3 leituras se sobrepondo (`--path_reinforcement_distance 3`) e aumentamos o tamanho máximo esperado de 600 pb entre as leituras pareadas do fragment (`--group_pairs_distance 600`). No caso do *Inchworm*, aumentamos para 3 o número mínimo de cobertura de *K-mers* exigido para o processo de montagem (`--min_kmer_cov 3`). Por fim, contigs de tamanho menor que 300 foram desconsiderados (`--min_contig_length 300`).

Para uma maior aproximação da realidade é preciso selecionar *contigs* mais coerentes segundo critérios de aderência a um modelo ideal de amostragem e montagem de um transcriptoma, neste sentido, o programa Transrate v1.0.3 (SMITH-UNNA et al., 2016) foi utilizado. Esse programa permite a seleção dos *contigs* de melhor qualidade, ou seja, aquelas com um valor de pontuação (*score*) positivo foram automaticamente classificadas como *good contigs*, maximizando assim, a pontuação da montagem do metatranscriptoma como um todo. Um *bash script*² também foi desenvolvido para automatizar este processo.

4.5.4 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Utilizando-se o programa Transdecoder v.5.5.0 (HAAS et al., 2013) foi possível realizar a predição de proteínas a partir da tradução teórica dos transcritos onde são reconhecidos *Open Reading Frames* (ORFs) para a condição de proteínas. Para tanto, foi empregado na predição a correspondências das proteínas sequências proteicas do UniRef100 (SUZEK et al., 2007) usando o alinhador DIAMOND v2.0.8 (BUCHFINK; XIE; HUSON, 2015) e com modelos HMM para famílias de proteínas do Pfam-A usando hmmscan (EDDY, 2011).

4.5.5 BUSCAS DE GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A METAIS

As sequências proteicas obtidas posteriormente foram alinhadas contra sequências presentes no banco de dados BacMet v2.0 (PAL et al., 2014) por meio do *script* BacMet-Scan v1.1.pl com modificações. O BacMet-Scan utiliza o

² runTransrate.sh

alinhador Diamond v2.0.8 (BUCHFINK; XIE; HUSON, 2015) e foi modificado para filtrar as correspondências (“hits”) de acordo com o método de Rost (ROST, 1999), que considera uma relação entre tamanho e identidade da correspondência.

O banco de dados BacMet (*Antibacterial Biocida & Metal Resistance Genes Database*) fornece informações de genes que relacionados à resistência a metais pesado e biocidas. Há uma divisão no banco de dados, organizando-os de acordo com o nível de credibilidade na associação, ou seja, há aquelas relações que passaram por uma curadoria manual e a função de resistência associada ao gene já foi confirmada experimentalmente, e outras, onde há essa relação de função de resistência associada ao gene é predita e ainda não possuem comprovação experimental (PAL et al., 2014).

4.5.6 ANOTAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES

As mesmas proteínas obtidas pelo programa Transdecoder foram empregados para a anotação funcional. Neste caso a ferramenta utilizada foi o eggnog-mapper v2.1.2 (que também usa como alinhador o Diamond) e o banco de dados para o alinhamento foi o EggNOG v.5.0 (HUERTA-CEPAS et al., 2017) que fornece a anotação funcional dos genes, bem como suas ontologias gênicas, referentes ao banco de dados Gene Ontology (GO) (ASHBURNER et al., 2000; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2021). Essa anotação baseia-se no reconhecimento de similaridade com os ortólogos do EggNOG e na conjectura a respeito da conservação de função entre genes ortólogos (ALTENHOFF et al., 2012).

Foram consideradas as anotações funcionais dos genes a partir do resultado de anotação das sequências proteicas preditas a partir dos transcritos montados. Nos casos em que haviam mais de uma anotação por gene, as que possuíam a maior pontuação e menor *e-value* foram recuperadas, no caso de empate, apenas a primeira anotação associada ao gene foi recuperada.

4.5.7 ANOTAÇÃO TAXONÔMICA DO METATRANSCRIPTOMA

As sequências dos transcritos (arquivo no formato fasta) foram submetidas à análise com o programa Kraken v2.0.8 (WOOD; SALZBERG, 2014), utilizando-se o próprio *default* (padrão) do programa como parâmetro, para realizar atribuições ou anotações taxonômicas, baseadas no algoritmo LCA (*Lowest Commons Ancestor*). A partir dos “NCBI taxonomy IDs” (identificador de um táxon no banco de dados de taxonomia do NCBI) obtidos pelo Kraken, usamos a ferramenta TaxonKit v0.4.0 (SHEN; REN, 2021) para obter a linhagem taxonômica completa. Um outro *script*³ foi utilizado para a automatização das análises com Kraken e TaxonKit, gerando uma tabela⁴.

4.5.8 IDENTIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS TRANSCRIPTOMAS NO METATRANSCRIPTOMA

Com a relação gene-transcrito fornecida pelo Trinity (e selecionados apenas os *good contigs*) e representada pelo arquivo “gene_trans_map” juntamente com o resultado da anotação taxonômica (resultante da análise com Kraken), foram adicionadas informações de gênero aos genes do metatranscriptoma⁵. O arquivo gerado foi chamado de genus_genes_trans_map. Esse arquivo permitiu a separação dos genes associados aos três principais gêneros identificados e coincidentes com a análise dos marcadores 16S rRNA (*Rhizobium*, *Sinorhizobium (Ensifer)*, e *Brevundimonas*).

4.5.9 ANÁLISE DE ABUNDÂNCIA NO METATRANSCRIPTOMA

O arquivo gene_trans_map também foi usado para a geração da matriz de expressão de genes do metatranscriptoma e também para os três principais transcriptomas identificados (*Rhizobium*, *Sinorhizobium (Ensifer)* e *Brevundimonas*). A partir de outro *script*⁶ foi possível invocar *scripts* do pacote Trinity para a realização do alinhamento e estimação de abundância de genes e

³ mkTaxTable.sh

⁴ TaxonomyTable.tsv

⁵ addGenus2Gene.sh

⁶ getAbundanceMatrix.sh

transcritos⁷ para cada biblioteca de amostras da comunidade, e, organização dos resultados em uma única matriz de abundância⁸. Para a estimativa de abundância o programa SALMON v0.14.1 (PATRO et al., 2017) foi considerado. O programa SALMON é uma ferramenta que realiza pseudo-alinhamentos através do mapeamento de K-mers no transcrito. Essa matriz gerada pelo SALMON foi usada no programa DESeq2 v1.28.1 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014), para a obtenção de uma matriz de expressão de genes normalizada.

4.5.10 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO E ABUNDÂNCIA NO METATRANSCRIPTOMA

Para a obtenção e visualização do perfil taxonômico do metatranscriptoma associado às amostras da comunidade controle e desafiadas pelos metais Cr⁺³, Cr⁺⁶ e Cu⁺², os dados de associação taxonômica por gene, juntamente com a matriz de contagens de expressão gênica/abundância normalizada, foram submetidos a análise de composição taxonômica na plataforma do MicrobiomeAnalyst (CHONG et al., 2020)⁹. Os dados foram filtrados usando as opções default da plataforma, desabilitando apenas a transformação dos dados.

4.5.11 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Com um script desenvolvido em Perl¹⁰ a partir da matriz de abundância (expressão) de genes do metatranscriptoma e do resultado da identificação e separação dos genes para cada um dos três principais transcriptomas, foi possível a geração de três matrizes distintas. Essas matrizes foram submetidas ao programa DESeq2 v1.28.1 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014, p. 2) para a normalização e identificação dos Genes Diferencialmente Expressos, ou *Differentially Expressed Genes* (DEGs). Para essa etapa de normalização foram utilizados genes com expressão constitutiva (Tabela 2) (ROCHA; SANTOS; PACHECO, 2015). Os genes constitutivos são genes constantemente expressos,

⁷ align_and_estimate_abundance.pl

⁸ abundance_estimates_to_matrix.pl

⁹ <https://www.microbiomeanalyst.ca>

¹⁰ splitMatrixByGenusGenePrefix.pl

afinal possuem promotores reguladores que possibilitam uma expressão constante e sem uma forte dependência da condição (PAPATHEODOROU et al., 2018). Isso foi realizado a fim de considerarmos o fato de poder haver maior abundância de uma determinada espécie na condição controle (CTL) ou nos tratamentos (CU2, CR3 e CR6) e isso poder afetar a expressão do gene.

Tabela 2 - Genes constitutivos empregados para a normalização da contagem dos genes diferencialmente expressos

| Nome do gene | Descrição do gene |
|--------------|---|
| <i>rpoA</i> | Subunidade alfa de RNA polimerase direcionada por DNA |
| <i>rpoB</i> | Subunidade beta de RNA polimerase direcionada por DNA |
| <i>gyrA</i> | DNA girase A |
| <i>gyrB</i> | DNA girase B |
| <i>secA</i> | Subunidade de proteína translocase <i>secA</i> |

Fonte: Adaptado de Rocha e colaboradores (2015).

A composição de expressão gênica diferencial entre as condições biológicas foi realizada utilizando *log2-fold-change* absoluto (Log_2FC) ≥ 2 e o nível descritivo de significância (*p-value*) $\leq 0,05$ ajustado para múltiplos testes de hipóteses via método de Benjamini-Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995) pela estimativa de *False Discovery Rate* (FDR) (*adjusted p-value*).

4.5.12 ANÁLISES DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Uma Análise de Componentes Principais, ou *Principal Component Analysis* (PCA) foi obtida para os gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*) e *Brevundimonas* além do metatranscriptoma, utilizando-se os dados de expressão gênica normalizados e transformados por *rlog* (*regularized logarithm transformation*) (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) com o auxílio da função *plotPCA* do pacote DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) para o ambiente estatístico R.

4.5.13 SCRIPTS

Todos os *scripts* utilizados durante a execução de nossas análises mencionados durante o decorrer da seção “Materiais e Métodos”, podem ser encontrados no repositório GitHub do Laboratório de Bioinformática, o qual é coordenado pelo Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro, e pode ser acessado por meio endereço <https://github.com/bioinfo-fcav/metatransapps>.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA

A partir dos ensaios de concentração mínima inibitória (CMI) foram determinadas quais as concentrações dos metais Cr^{3+} , Cr^{+6} e Cu^{+2} que inibiram o crescimento bacteriano na placa de petri, que foram de 12,0 mM, 9,0 mM e 14,0 mM, respectivamente.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Na comunidade bacteriana estudada foram identificados quatro isolados bacterianos distintos por meio de análises do gene 16S rRNA, sendo nomeados por C04 (1), C04 (2), C04 (3) e C04 (4) possuindo um comprimento total, respectivamente, de 1.353, 1.460, 1.459 e 382 bases nitrogenadas.

Utilizando-se os programas RDP-Classifer e SILVA ACT, que leva em consideração o algoritmo de LCA em suas análises e atribuições taxonômicas de acordo com as sequências do gene 16S, foi possível identificar cada um dos isolados até o nível de gênero, sendo o programa BLASTn usado posteriormente para identificação das prováveis espécies (Tabela 3).

Com RDP-Classifer obtivemos um valor de *confidence score* de 100% para os gêneros *Stenotrophomonas* [C04 (1)], *Sinorhizobium (Ensifer)* [C04 (2)] (YOUNG, 2003), *Rhizobium* [C04 (3)], e *Brevundimonas* [C04 (4)]. Dessa forma, tivemos sucesso em obter uma classificação taxonômica com um mínimo de segurança, ao menos no nível de gênero. O programa SILVA ACT também nos forneceu as mesmas atribuições, com valores de identidade de 100% para o gênero *Stenotrophomonas*, 99,95% para *Sinorhizobium (Ensifer)*, 99,57 para *Rhizobium* e 98,67 para *Brevundimonas*.

Realizando-se o alinhamento das sequências com BLASTn identificamos as prováveis espécies correspondentes a cada isolado: *Stenotrophomonas maltophilia* [C04 (1)], com cobertura e identidade de 100%; *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* [C04 (2)], com cobertura de 99% e identidade de 99,65%;

Rhizobium tropici CIAT 899 [C04 (3)], com cobertura de 98% e identidade de 99,38%; e *Brevundimonas vesiculares* [C04 (4)], com 100% de identidade e 99,65% de cobertura. Na Tabela 3 podem ser visualizadas cada uma das classificações taxonômicas obtidas pelos três programas assim como os valores de confiança (RDP-Classifer *confidence score*), cobertura e identidade.

Tabela 3 - Identificação taxonômica dos isolados bacterianos C04 (1), C04 (2), C04 (3) e C04 (4) utilizando-se os programas RDP-Classifer, SILVA ACT e BLASTn.

| Programas utilizados | | Isolados | | | |
|----------------------|------------------|-------------------------|--------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| | | C04 (1) | C04 (2) | C04 (3) | C04 (4) |
| RDP-Classifer | Confiança CS (%) | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | <i>Rhizobium</i> | <i>Brevundimonas</i> |
| | | 100 | 100 | 100 | 100 |
| SILVA | Identidade (%) | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | <i>Rhizobium</i> | <i>Brevundimonas</i> |
| | | 100 | 99,65 | 99,57 | 98,69 |
| BLASTn | Cobertura (%) | <i>St. maltophilia</i> | <i>Si. melloti</i> | <i>R. tropici</i> CIAT 899 | <i>B. vesiculares</i> |
| | | 100 | 99 | 98 | 100 |
| | Identidade (%) | 100 | 99,65 | 99,38 | 99,95 |

Legenda: CS – *Confidence Score*

Fonte: Autoria própria.

5.3 PROCESSAMENTO DE DADOS DE SEQUENCIAMENTO DO METATRANSCRIPTOMA

Após a etapa de processamento das leituras geradas a partir do sequenciamento de cada uma das bibliotecas (CTL, CR3, CR6 e CU2) e suas réplicas técnicas (RB1, RB2 e RB3) houve uma redução média de 11,99% das

leituras em detrimento da remoção dos adaptadores realizados pelo programa Atropos e a exclusão das leituras com baixa qualidade pelo programa Prinseq. Na Tabela 4 é possível visualizar a quantidade de sequências brutas obtidas pelo sequenciamento de RNA-Seq (Pré-processamento) e o total, em porcentagem, das leituras que foram processadas por cada programa, e usadas posteriormente nas análises de dados.

Foram geradas um total de doze bibliotecas de cDNA onde cada qual encontrava-se aos pares (*read 1* e *read 2*), totalizando vinte e quatro arquivos. Calculando-se uma média geral de leituras removidas obtivemos um total de 17,07% de leituras removidas com o programa Atropos e 0,20% com o programa Prinseq para as amostras da comunidade controles (CTL); 4,61% com Atropos e 0,16% com Prinseq para as amostras da comunidade desafiadas por cromo trivalente (CR3); 16,60% com Atropos e 0,14% com Prinseq para as amostras da comunidade desafiadas por cromo hexavalente (CR6) e 9,34% com Atropos e 0,16% com Prinseq para as amostras da comunidade desafiadas por cobre bivalente (CU2).

Tabela 4 – Resultados das etapas de pré-processamento das leituras de cada biblioteca. Os números presentes nesta tabela correspondem aos pares de *reads* (R1 + R2) de cada clone de fragmentos provenientes do sequenciamento de RNA-Seq.

| Amostras | Pré (input) | Processamento | | | |
|-----------|-------------|---------------|-----------|------------|-----------|
| | | Atropos | | Prinseq | |
| | | % de bases | | % de bases | |
| | | Leituras | filtradas | Leituras | filtradas |
| 1 CTL_RB1 | 16.129.423 | 12.755.527 | 79,08 | 12.730.273 | 78,93 |
| 2 CTL_RB2 | 15.746.905 | 12.282.051 | 78,00 | 12.229.906 | 77,67 |
| 3 CTL_RB3 | 19.203.734 | 17.610.903 | 91,71 | 17.587.822 | 91,59 |
| 4 CR3_RB1 | 15.678.549 | 14.493.748 | 92,44 | 14.467.991 | 92,28 |
| 5 CR3_RB2 | 17.442.094 | 17.081.012 | 97,93 | 17.048.537 | 97,74 |
| 6 CR3_RB3 | 14.525.828 | 13.917.846 | 95,81 | 13.895.860 | 95,66 |
| 7 CR6_RB1 | 16.074.532 | 14.567.152 | 90,62 | 14.550.437 | 90,52 |
| 8 CR6_RB2 | 14.960.855 | 11.272.944 | 75,35 | 11.254.284 | 75,22 |

| | | | | | | |
|----|---------|------------|------------|-------|------------|-------|
| 9 | CR6_RB3 | 13.996.144 | 11.787.008 | 84,22 | 11.760.768 | 84,03 |
| 10 | CU2_RB1 | 24.310.681 | 23.606.747 | 97,10 | 23.581.557 | 97,00 |
| 11 | CU2_RB2 | 10.748.948 | 8.469.237 | 78,79 | 8.450.896 | 78,62 |
| 12 | CU2_RB3 | 18.692.160 | 17.958.674 | 96,08 | 17.921.158 | 95,88 |

Fonte: Autoria própria.

5.4 MONTAGEM DO METATRANSCRIPTOMA E ANOTAÇÃO FUNCIONAL

Ao realizar a montagem do metatranscriptoma obtivemos um total de 6.760 transcritos onde, após a filtragem com Transrate, 5.980 transcritos foram considerados como bons (*good contigs*), os demais foram desconsiderados.

A predição de sequências proteicas obtidas a partir de transcritos com ORFs a partir dos transcritos considerados como bons com o programa Transdecoder revelou um total de 5.853 proteínas para o metatranscriptoma.

Dessas proteínas preditas, um total de 5.306 foram anotadas com ortólogos do banco de dados EggNOG por meio do programa eggno-mapper.

5.5 ANÁLISES DE REPRESENTATIVIDADE DE TAXA NO METATRANSCRIPTOMA

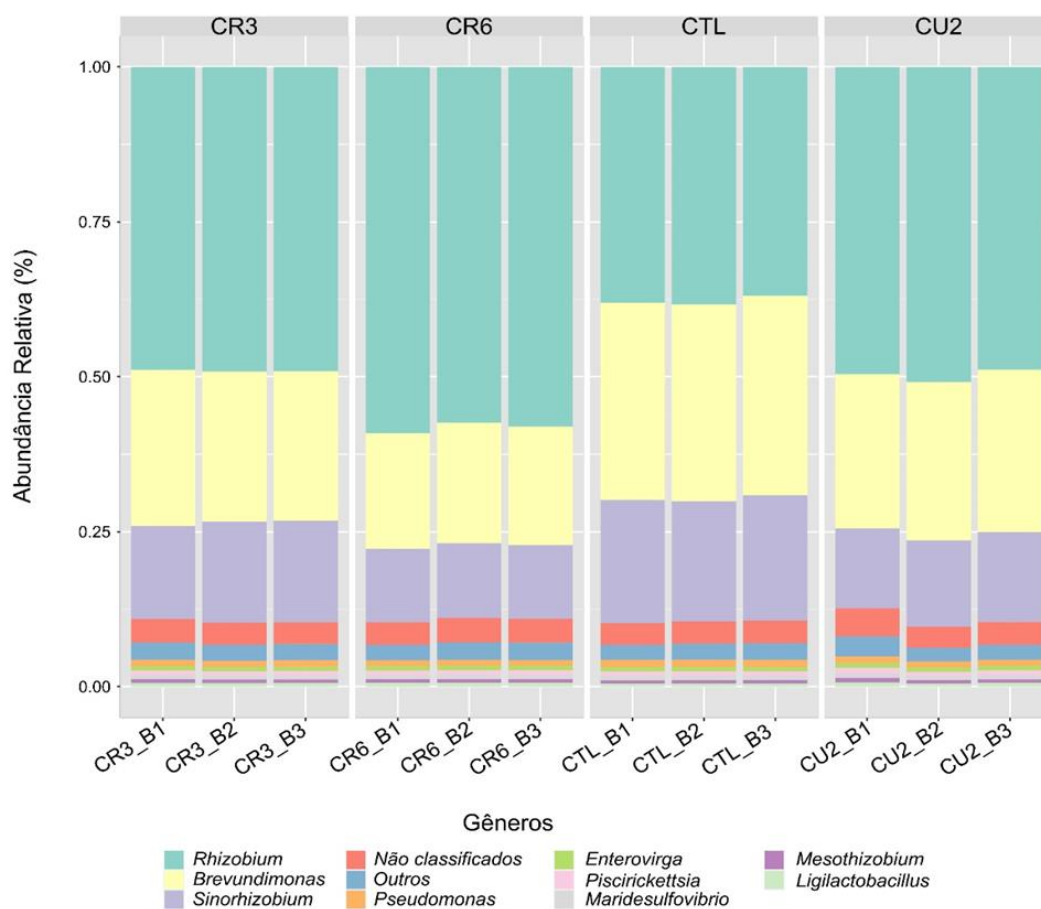
Na plataforma MicrobiomeAnalyst foi possível identificar todos os possíveis gêneros microbianos presentes em nossas amostras da comunidade (Figura 4), inclusive os mesmos já identificados na análise dos isolados. Reconhecemos nesta análise os gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium (Ensifer)* e *Brevundimonas* como os mais representativos. Como se trata de um metatranscriptoma essa representatividade se dá pela contagem da abundância de transcritos associados a um determinado táxon, e isso pode ser resultado tanto da expressão dos genes como também da abundância do táxon.

O gênero *Rhizobium* foi o mais representativo em todas as condições com metais. Enquanto que na condição controle essa representatividade foi muito similar à de *Brevundimonas*. No entanto, o gênero *Brevundimonas* apresenta um perfil oposto em comparação com o de *Rhizobium*, apresentando uma representatividade menor nas bibliotecas associadas a metais, o que reflete sua capacidade de tolerar os metais considerados no experimento de desafio.

Dessa forma, é possível que o gênero *Rhizobium* detenha alguma espécie de mecanismo de resistência aos metais Cr^{+3} , Cr^{+6} e Cu^{+2} o que reflete a sua maior representatividade nas amostras da comunidade desafiadas pelos metais, em contrapartida, devido ao decaimento da representatividade de *Brevundimonas*, é provável que o gênero não possua mecanismos eficientes de resistência aos metais ou não possua a mesma adaptabilidade às condições em que foi submetida.

O gênero *Stenotrofomonas* não foi identificado nestas análises muito provavelmente por estar em menor abundância ou estar sendo comprometido pelos demais gêneros bacterianos, portanto, não utilizamos este gênero em nossos estudos posteriores devido à falta de dados.

Figura 4 - Resultados obtidos com MicrobiomeAnalyst.



Fonte: Autoria própria.

O gênero *Rhizobium* corresponde a bactérias gram-negativas pertencentes ao grupo das Alfarproteobactérias sendo extremamente conhecidas por sua habilidade em promover o crescimento de plantas, principalmente àquelas pertencentes à família Fabaceae (leguminosas), devido à atividade de fixação de nitrogênio (LINDSTRÖM; MOUSAVI, 2020).

A fixação de nitrogênio pode ser considerada como um ponto chave para o crescimento e desenvolvimento vegetal podendo ocorrer no solo por microrganismos rizosféricos ou no interior das raízes de plantas através da formação de nódulos radiculares (IGIEHON; BABALOLA, 2018).

Plantas leguminosas são capazes de estabelecer relações de simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, principalmente com rizóbios. Esse

processo de simbiose resulta na formação de nódulos radiculares nas raízes das plantas, sendo considerado um processo infeccioso a partir da adesão dos rizóbios nos pêlos radiculares, os quais em seu interior podem promover a fixação de nitrogênio. A grande vantagem em tal simbiose consiste na capacidade que bactérias fixadoras de nitrogênio detêm em capturar o nitrogênio atmosférico (N_2) e convertê-lo em amônia (NH_3) que pode ser utilizada pelas plantas. Apesar de o nitrogênio ser um elemento químico essencial, são poucos os seres vivos que conseguem utilizá-lo diretamente como N_2 (dinitrogênio) como é encontrado presente na atmosfera (WANG; LIU; ZHU, 2018).

Os nódulos radiculares passam por diversas etapas de desenvolvimento tais como formação, manutenção e senescência onde alguns metais são de extrema importância. Por exemplo, os metais manganês e cálcio podem facilitar a colonização por bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes das plantas enquanto que o cobre pode promover um maior crescimento radicular, aumentando assim, a quantidade de nitrogênio fixado (GONZÁLEZ-GUERRERO et al., 2014).

A principal enzima responsável pela conversão de dinitrogênio em amônia é chamada de nitrogenase. Segundo Fagorzi e colaboradores (2018) a enzima nitrogenase necessita de alguns metais como cofatores, tais como o ferro, molibdênio, vanádio e até mesmo o níquel (FAGORZI et al., 2018). Além disso, a proteína leg-hemoglobina, principal responsável por proteger a enzima nitrogenase do excesso de oxigênio ao mesmo tempo em que promove uma quantidade ideal dessas bactérias formadoras de nódulos radiculares (SINGH; VARMA, 2017), necessita de ferro hemínico para proteger a enzima nitrogenase contra o contato com moléculas de oxigênio (FAGORZI et al., 2018).

De acordo com Atieno e Lesueur (2019) espécies de *Rhizobium* produzem polímeros denominados de exopolissacarídeos (EPSs) importantes na formação de nódulos de fixação de nitrogênio em leguminosas detendo como estratégias a imobilização e ligação de metais a fim de promover a neutralização de efeitos tóxicos ocasionados por metais potencialmente tóxicos além de mecanismos de precipitação extracelular e acúmulo intracelular, o que pode aumentar a capacidade de resistência a metais por parte destas bactérias (ATIENO; LESUEUR, 2019).

5.6 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS COM O BANCO DE DADOS BacMet

No total o metatranscriptoma teve 120 genes identificados como sendo relacionados a resistência a metais e biocidas provenientes do banco de dados do BacMet. Destes, 65 genes correspondem ao conjunto de genes experimentalmente confirmados e 55 correspondem a genes com funções preditas. Dentre os 120 genes anotados 51 correspondem a genes presentes no transcriptoma de *Rhizobium*, 46 para *Sinorhizobium (Ensifer)* e 16 para *Brevundimonas*.

Dentre os DEGs identificados para *Rhizobium*, um total de 9 genes encontravam-se induzidos: 3 na presença de Cr⁺³, 2 na presença de Cr⁺⁶ e 5 na presença de Cu⁺²; para o gênero *Sinorhizobium (Ensifer)* um total de 2 genes foram identificados como induzidos na presença de Cu⁺² e um único gene reprimido relacionado à Cr⁺⁶; e para o gênero *Brevundimonas*, apenas um único gene estava diferencialmente expresso induzido na presença do metal Cu⁺² (Tabela 5).

Tabela 5 – Genes diferencialmente expressos identificados pelo programa BacMet perante as comunidades desafiadas pelos metais Cr⁺³, Cr⁺⁶ e Cu⁺².

| Tratamento | Gêneros | Trinity ID | Log2FC | FDR | Gene-name |
|------------------|--------------------------------|----------------------|--------|--------|-------------|
| Cu ⁺² | <i>Brevundimonas</i> | TRINITY_DN576_c0_g2 | 2,05 | 0,0339 | <i>nccA</i> |
| Cr ⁺³ | <i>Rhizobium</i> | TRINITY_DN1362_c0_g2 | 3,27 | 0,0032 | <i>fbpC</i> |
| | | TRINITY_DN357_c0_g3 | 2,69 | 0,0181 | <i>actP</i> |
| | | TRINITY_DN440_c0_g1 | 2,29 | 0,0466 | <i>adeG</i> |
| Cr ⁺⁶ | <i>Rhizobium</i> | TRINITY_DN357_c0_g3 | 2,69 | 0,0000 | <i>actP</i> |
| | | TRINITY_DN440_c0_g1 | 4,90 | 0,0000 | <i>adeG</i> |
| Cu ⁺² | <i>Rhizobium</i> | TRINITY_DN1362_c0_g2 | 3,31 | 0,0025 | <i>fbpC</i> |
| | | TRINITY_DN357_c0_g3 | 3,30 | 0,0030 | <i>actP</i> |
| | | TRINITY_DN3704_c0_g1 | 3,80 | 0,0036 | <i>fecE</i> |
| | | TRINITY_DN440_c0_g1 | 3,54 | 0,0016 | <i>adeG</i> |
| | | TRINITY_DN800_c0_g1 | 3,12 | 0,0019 | <i>actA</i> |
| Cu ⁺² | <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | TRINITY_DN2518_c0_g2 | 4,32 | 0,0001 | <i>czcC</i> |
| | | TRINITY_DN1238_c0_g2 | -2.13 | 0,0134 | <i>sdeB</i> |

| | | | | | |
|------------------|--|----------------------|-------|--------|-------------|
| Cr ⁺⁶ | <i>Sinorhizobium</i> (<i>Ensifer</i>) | TRINITY_DN3913_c0_g1 | -2.12 | 0,0099 | <i>bepC</i> |
|------------------|--|----------------------|-------|--------|-------------|

Fonte: Própria autoria.

5.7 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES INDUZIDOS EXPRESSOS COM O PROGRAMA DESeq2

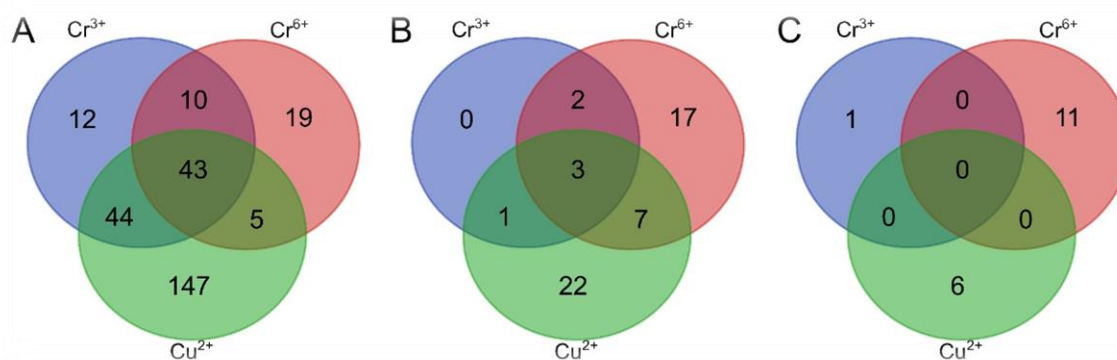
Para determinar e identificar os genes diferencialmente expressos frente à exposição aos metais realizamos a avaliação do perfil de expressão focando nos três principais gêneros presentes no metatranscriptoma da comunidade bacteriana.

Para tanto, o programa DESeq2 e BacMet foram utilizados onde, para a identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs) induzidos foi realizado uma filtragem dos valores de FDR e posteriormente de Log2FC. Para FDR o filtro utilizado foram valores $\leq 0,05$, enquanto que para Log2FC foram selecionados genes que detinham valores ≥ 2 .

Logo, foram obtidos um total de 2.220, 2.328 e 751 DEGs para os gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium (Ensifer)* e *Brevundimonas*, respectivamente (independente das condições de controle ou desafiada pelos metais), antes de serem empregados os filtros de FDR e Log2FC. Após a filtragem um total de 425 DEGs induzidas para *Rhizobium*, 68 DEGs induzidas para *Sinorhizobium (Ensifer)* e 18 DEGs induzidas para *Brevundimonas* foram selecionadas.

Do total de DEGs induzidas filtradas por gênero, ainda foram identificadas a quais metais pertenciam, ou seja, no caso do gênero *Rhizobium*, 109, 77 e 239 DEGs estavam presentes, respectivamente, nas amostras da comunidade desafiadas pelos metais Cr⁺³, Cr⁺⁶ e Cu⁺². Em *Sinorhizobium (Ensifer)* um total de 6, 29 e 33 DEGs foram identificadas para as amostras da comunidade desafiadas por Cr⁺³, Cr⁺⁶ e Cu⁺². Para *Brevundimonas* das 18 DEGs filtradas apenas 1 encontrava-se mais diferencialmente expressa nas amostras da comunidade desafiadas por Cr⁺³, 11 nas desafiadas por Cr⁺⁶ e 6 nas desafiadas por Cu⁺². Na Figura 5 encontramos a quantidade de DEGs induzidas frente a cada metal conforme o gênero bacteriano, tanto aquelas exclusivas quanto as compartilhadas.

Figura 5 - Gráficos de diagrama de Venn da distribuição de DEGs induzidos, comuns e exclusivos entre as diferentes condições de metais. (A) Transcriptoma *Rhizobium*. (B) Transcriptoma *Sinorhizobium (Ensifer)* e (C) Transcriptoma *Brevundimonas*.

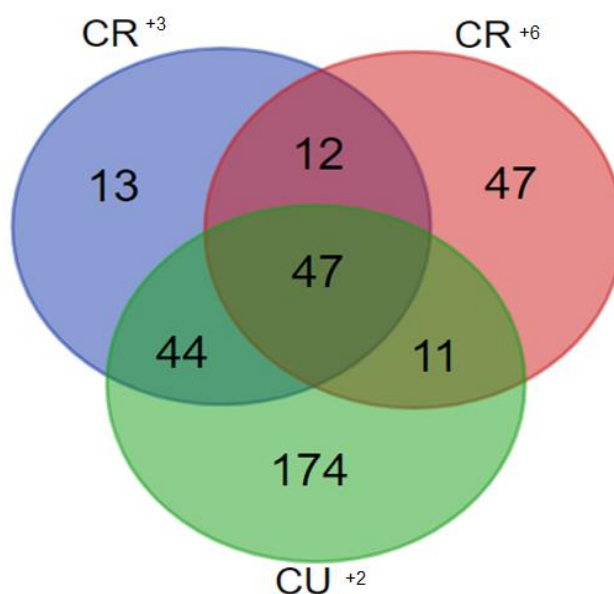


Fonte: Autoria própria.

Com os resultados obtidos foi possível verificar que entre os três gêneros estudados, *Rhizobium* foi aquele que apresentou a maior quantidade de DEGs induzidas frente às amostras da comunidade desafiadas pelos três metais, enquanto que *Brevundimonas* apresentou uma maior quantidade de DEGs reprimidas nas amostras da comunidade desafiadas. O gênero *Sinorhizobium (Ensifer)* representou um meio termo, ou seja, apresentou uma maior quantidade de DEGs induzidas apenas por Cr⁶⁺, enquanto que, para os demais metais as maiorias das DEGs identificadas estavam reprimidas.

Uma união de todas as DEGs identificadas como mais diferencialmente expressas induzidas na presença dos metais por gênero também foi realizada podendo-se obter DEGs compartilhadas e exclusivas para cada metal conforme ilustra a Figura 6. Um total de 234 DEGs exclusivas para todos os metais foram identificadas onde 13 eram exclusivas para Cr³⁺, 47 para Cr⁶⁺ e 174 para Cu²⁺; já 114 DEGs encontravam-se compartilhadas: 12 entre Cr³⁺ e Cr⁶⁺, 44 entre Cr³⁺ e Cu²⁺, 11 entre Cr⁶⁺ e Cu²⁺ e 47 entre os três metais (Cr³⁺, Cr⁶⁺ e Cu²⁺) (Figura 6).

Figura 6 - Diagrama de Venn constituído por DEGs compartilhadas e exclusivas para cada um dos metais.



Fonte: Aatoria própria

5.8 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES REPRIMIDOS EXPRESSOS COM O PROGRAMA DESeq2

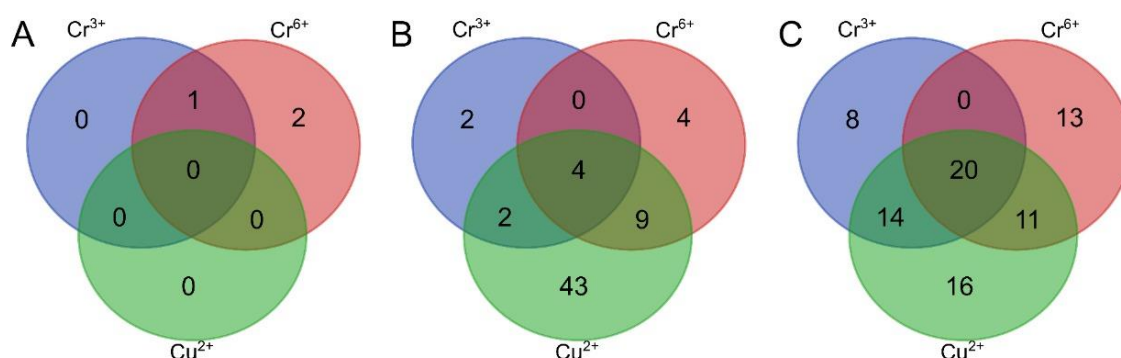
Também foram realizadas análises para a possível identificação de genes diferencialmente expressos que estavam sendo reprimidos perante às amostras da comunidade desafiadas pelos metais Cr⁺³, Cr⁺⁶ e Cu⁺² levando-se em consideração os três principais gêneros identificados presentes no metatranscriptoma da comunidade bacteriana: *Rhizobium*, *Sinorhizobium (Ensifer)* e *Brevundimonas*.

Logo, o programa DESeq2 e BacMet também foram empregados para a determinação de genes diferencialmente expressos (DEGs) reprimidos, aplicando-se uma filtragem por $FDR \leq 0,05$, em um primeiro momento, e, valores ≤ -2 para Log₂FG, posteriormente.

Foram identificados um total de 4 genes diferencialmente expressos reprimidos para o gênero *Rhizobium*, sendo que, 1 encontrava-se reprimido na presença de Cr⁺³, 3 na presença de Cr⁺⁶ e nenhum perante a Cu⁺². Para o gênero *Sinorhizobium (Ensifer)*, um total de 83 genes foram identificados como diferencialmente expressos reprimidos, sendo 8 relacionados à Cr⁺³, 17 a Cr⁺⁶ e 58 a Cu⁺². Já para o gênero *Brevundimonas*, 42 genes diferencialmente expressos reprimidos foram identificados na presença de Cr⁺³, 44 para Cr⁺⁶ e 61

para Cu^{2+} . Na Figura 7 podemos visualizar a quantidade de DEGs identificadas como reprimidas exclusivas e compartilhadas em cada um dos três gêneros perante o desafio dos metais.

Figura 7 - Gráficos de diagrama de Venn da distribuição de DEGs reprimidos, comuns e exclusivos entre as diferentes condições de metais. (A) Transcriptoma *Rhizobium*. (B) Transcriptoma *Sinorhizobium (Ensifer)* e (C) Transcriptoma *Brevundimonas*.



Fonte: Autoria própria.

Com estes achados notamos certa oposição aos genes diferencialmente expressos induzidos e reprimidos encontrados, ou seja, *Brevundimonas* apresentou uma maior quantidade de DEGs reprimidas perante as três condições enquanto que *Rhizobium* foi o contrário, detendo muito mais DEGs induzidas na presença dos metais e muito poucas reprimidas.

5.9 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (INDUZIDOS) ANOTADOS

Os genes montados pelo Trinity possuem apenas identificadores numéricos (Trinity ID), e, portanto, para terem uma identidade de fato, é necessário um processo de anotação funcional, a qual foi obtida por similaridade no banco de grupos de genes ortólogos do EggNOG. Considerando essa anotação obtivemos um total de DEGs induzidas anotadas exclusivas por metal de 12, 31 e 83 para Cr^{3+} , Cr^{6+} e Cu^{2+} , respectivamente. Em relação às amostras da comunidade desafiadas por Cr^{3+} , das 12 DEGs identificadas todas pertenciam ao gênero

Rhizobium; já em relação às amostras da comunidade desafiadas por Cr^{+6} , das 31 DEGs achadas 10 pertenciam ao gênero *Rhizobium*, 17 a *Sinorhizobium (Ensifer)* e 4 a *Brevundimonas*; por fim, das 83 DEGs encontradas para as amostras da comunidade desafiadas por Cu^{+2} , 73 pertenciam ao gênero *Rhizobium*, 7 a *Sinorhizobium (Ensifer)* e 3 a *Brevundimonas*.

Neste trabalho buscamos dar ênfase maior a anotação funcional dos genes diferencialmente expressos induzidos na presença dos metais em vez daqueles diferencialmente expressos reprimidos. Para um melhor entendimento das possíveis funções relacionadas às DEGs anotadas induzidas, foram selecionadas aquelas cujo valor de Log2FC era superior a 3, facilitando assim nossa investigação de quais DEGs eram mais expressas no meio com as concentrações dos metais Cr^{+3} , Cr^{+6} e Cu^{+2} (Tabela 7). Sendo assim, um total de 2 DEGs foram encontradas como tendo um valor de Log2FC superior a três para Cr^{+3} das 12 DEGs totais identificadas onde ambas pertenciam ao gênero *Rhizobium*; nas amostras da comunidade desafiadas por Cr^{+6} um total de 13 DEGs com Log2FC acima de três foram achadas das 31 DEGs totais onde 5 pertenciam ao gênero *Rhizobium*, 7 a *Sinorhizobium (Ensifer)* e apenas 1 pertencia ao gênero *Brevundimonas*; em relação a Cu^{+2} das 83 DEGs identificadas apenas 23 detinham valores de Log2FC superior a três, 18 pertencentes ao gênero *Rhizobium*, 4 a *Sinorhizobium (Ensifer)* e 1 a *Brevundimonas* (Tabela 6).

Tabela 6 - Genes diferencialmente expressos com valores de Log2FC > 3 identificados com o banco de dados EGGNog para Cr^{+3} , Cr^{+6} e Cu^{+2} .

| Amostras | Gêneros | Gene name - Identificação com EGGNog | Log2FC > 3 |
|------------------|----------------------|--|-------------|
| CR^{+3} | <i>Rhizobium</i> | <i>prr</i> | 3,221959011 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>gabD</i> | 3,583759484 |
| CR^{+6} | <i>Brevundimonas</i> | <i>traK</i> | 3,182179318 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>coaBC</i> | 3,644570121 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>metN</i> | 3,753452065 |

| | | | |
|------------------|--------------------------------|-------------------|-------------|
| | <i>Rhizobium</i> | <i>rmuC</i> | 3,408981063 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>carA</i> | 4,204706578 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>cysN</i> | 3,860002936 |
| | <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | <i>nagB</i> | 4,261622143 |
| | <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | <i>nanK</i> | 4,651595572 |
| | <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | <i>smoK</i> | 4,843308503 |
| | <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | <i>clpX</i> | 3,824648621 |
| | <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | <i>glyQ</i> | 3,574186168 |
| | <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | <i>sitD</i> | 3,006815168 |
| | <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | <i>ureC</i> | 3,872914857 |
| CU ⁺² | <i>Brevundimonas</i> | <i>copA2</i> | 4,244863662 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>yhjE</i> | 3,611414146 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>abgB</i> | 4,733663786 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>virB4</i> | 3,210409854 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>hemA</i> | 3,645678044 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>folC</i> | 3,082101085 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>yfkF</i> | 3,168972425 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>visN</i> | 4,091819322 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>dgoK</i> | 3,047900713 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>cbtA</i> | 3,002198265 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>degP</i> | 4,230415512 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>recG</i> | 3,215953829 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>cwlJ</i> | 4,810652271 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>proA</i> | 3,651011556 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>omp2a</i> | 3,228087525 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>ptsP</i> | 3,210725587 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>Int</i> | 3,115734208 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>MA20_28870</i> | 4,195294956 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>rhIE</i> | 3,427031371 |
| | <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | <i>grxC</i> | 4,878338588 |
| | <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | <i>copB</i> | 4,318153635 |
| | <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | <i>copZ</i> | 4,861973863 |

Sinorhizobium (Ensifer) *speB2* 3,105973364

Fonte: Autoria própria.

Durante nossas análises, a maior parte das DEGs identificadas nas amostras da comunidade desafiadas por Cr^{+3} , Cr^{+6} e Cu^{+2} , tanto exclusivas quanto compartilhadas, pertenciam aos gêneros *Sinorhizobium (Ensifer)* e principalmente a *Rhizobium*, estando relacionados a transportadores ABC, ATPases, genes codificadores de proteínas de membranas e relacionados à formação de bombas de efluxo.

Segundo Nanda e colaboradores (2019) os principais mecanismos de resistência apresentados por bactérias em resposta a concentrações elevadas de metais potencialmente tóxicos podem ser o sequestro extra e intracelular, formação de complexos com outros componentes, bombas de efluxo extracelular, reações de óxido-redução e o uso de alguns tipos de íons metálicos como receptores terminais de elétrons durante a respiração anaeróbica (NANDA; KUMAR; SHARMA, 2019).

5.9.1 TRANSPORTADORES ABC

Em nossas análises de identificação de genes diferencialmente expressos induzidos foram encontrados 18 genes relacionados, diretamente, aos transportadores ABC, onde 7 foram identificados nas amostras da comunidade desafiadas por Cr^{+3} pertencentes apenas ao gênero *Rhizobium*, 5 nas amostras da comunidade desafiadas por Cr^{+6} onde 3 dessas DEGs detinham uma maior expressão no gênero *Rhizobium* e 2 para *Sinorhizobium (Ensifer)*, e 6 nas amostras da comunidade desafiadas por Cu^{+2} sendo todos encontrados nas amostras da comunidade que continham *Rhizobium*. Nenhuma DEG relacionada a transportadores ABC foi identificada para o gênero *Brevundimonas*.

Na Tabela 7 são apresentados todos os genes diferencialmente expressos encontrados nas três condições amostrais estudadas: Cr^{+3} , Cr^{+6} e Cu^{+2} , sendo possível identificar a quais gêneros cada gene pertence.

Tabela 7 – Genes induzidos relacionados ao conjunto de transportadores ABC em amostras da comunidade desafiadas por Cr⁺³, Cr⁺⁶ e Cu⁺².

| Metal | Gênero | Gene_name | Log2FC |
|------------------|--|-------------------|---------------|
| Cr ⁺³ | <i>Rhizobium</i> | <i>glpS</i> | 3,265583114 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>MA20_43810</i> | 2,852775223 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>araG</i> | 2,244680827 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>yejA</i> | 2,441114604 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>Z012_01820</i> | 4,214521751 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>malk</i> | 2,248979776 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>yehY</i> | 2,385827066 |
| Cr ⁺⁶ | <i>Rhizobium</i> | <i>yejA</i> | 2,135537224 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>metN</i> | 3,753452065 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>Z012_01820</i> | 3,524741829 |
| | <i>Sinorhizobium</i> (<i>Ensifer</i>) | <i>smoK</i> | 4,843308503 |
| | <i>Sinorhizobium</i> (<i>Ensifer</i>) | <i>sitD</i> | 3,006815168 |
| Cu ⁺² | <i>Rhizobium</i> | <i>gluA</i> | 2,811272724 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>glpS</i> | 3,308408806 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>MA20_43810</i> | 2,708935448 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>rbsB</i> | 2,991527365 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>Z012_01820</i> | 3,077738137 |
| <i>Rhizobium</i> | <i>yehY</i> | 3,297063809 | |

Fonte: A autoria própria.

Dentre as DEGs encontradas relacionadas aos transportadores ABC muitas apresentaram um valor de Log2FC > a 3. Das 7 DEGs encontradas relacionadas ao metal Cr⁺³ duas apresentaram um valor de Log2FC > 3; para Cr⁺⁶, das 5 DEGs identificadas, 4 detinham um valor de Log2FC > 3 sendo duas

pertencentes ao gênero *Rhizobium* e duas a *Sinorhizobium* (*Ensifer*); já em relação às amostras da comunidade desafiadas por Cu^{+2} , a metade possuía um valor de $\text{Log}_2\text{FC} > 3$ de um total de 6 DEGs.

Os transportadores ABC são facilmente encontrados em diversas espécies de organismos vivos sejam eucariotos ou procariotos podendo estar relacionados a uma série de mecanismos importantes na construção de macromoléculas e efluxo de íons metálicos (FAN; KAISER; REES, 2020). Além disso, os transportadores ABC apresentam mecanismos que são altamente conservados entre os seres vivos estando principalmente presentes em plantas e leveduras, podem ser tanto exportadores quanto importadores de substâncias (THEODOULOU; KERR, 2015).

Os primeiros estudos envolvendo as funções de transportadores ABC foram realizados nos anos de 1970 a partir de pesquisas relacionadas a mecanismos de absorção de nutrientes em bactérias onde sistemas de transporte dependentes de proteínas de ligação ao substrato energizados através da hidrólise de ATP foram caracterizados bioquimicamente (BERGER; HEPPEL, 1974). Entretanto, apenas na década de 1990 ficou clara a importância dos transportadores ABC em diversas funções metabólicas além de sua onipresença entre os organismos vivos (HYDE et al., 1990).

A hidrólise de ATP ocorre na região citoplasmática de células proporcionando a ativação de alguns grupos de transportadores de membrana interna dentre eles os transportadores de cassete de ligação de ATP, comumente conhecidos por transportadores ABC, e ATPases do tipo P, como também podem acoplar-se a proteínas promovendo a difusão de cátions (PRABHAKARAN; AQEEL ASHRAF; SYAIDATUL AQMA, 2016).

De acordo com Lin e colaboradores (2019) os transportadores ABC podem proporcionar o transporte de metais potencialmente tóxicos para o exterior celular em bactérias, também estando envolvidos na resistência a antibióticos (LIN et al., 2019).

5.9.2 PROTEÍNAS ATPases

Genes codificadores de proteínas ATPase também foram identificados como sendo diferencialmente expressos para os metais Cr^{+3} , Cr^{+6} e Cu^{+2} correspondendo a um total de 10 DEGs pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium (Ensifer)*.

Na Tabela 8 encontramos representadas todas os DEGs relacionados a cada uma das três condições amostrais desafiadas pelos metais, assim como a qual gênero cada um pertence. Nas amostras da comunidade desafiadas por Cr^{+3} foram identificados um total de 5 DEGs relacionadas a proteínas ATPases, sendo 4 pertencentes ao gênero *Rhizobium* e apenas um ao gênero *Sinorhizobium (Ensifer)*; já nas amostras da comunidade desafiadas por Cr^{+6} um total de 3 DEGs foram achados, ambos pertencentes ao gênero *Rhizobium*; em relação às amostras da comunidade desafiadas por Cu^{+2} , também foram encontradas 3 DEGs: 2 pertencentes à *Rhizobium* e uma a *Sinorhizobium (Ensifer)*.

As proteínas ATPases são enzimas transportadoras de membrana que auxiliam na absorção de metais de transição estando envolvidas em processos de hiperacumulação e resistência a metais potencialmente tóxicos (CHAUDHARY; JAN; KHAN, 2016).

Tabela 8 - Genes induzidos relacionados a proteínas ATPases identificados nas amostras da comunidade desafiadas pelos metais Cr^{+3} , Cr^{+6} e Cu^{+2} .

| Metal | Gênero | Gene_name | Log2FC |
|------------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| Cr^{+3} | <i>Rhizobium</i> | <i>comM</i> | 2,036990843 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>pacS</i> | 2,686071946 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>zntA</i> | 2,249570441 |
| | <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | <i>zntA</i> | 2,701611485 |
| Cr^{+6} | <i>Rhizobium</i> | <i>comM</i> | 2,723646121 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>pacS</i> | 2,685461202 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>zntA</i> | 2,289551614 |
| Cu^{+2} | <i>Rhizobium</i> | <i>pacS</i> | 3,304333484 |
| | <i>Rhizobium</i> | <i>zntA</i> | 2,372926837 |

Sinorhizobium (Ensifer) *zntA* 2,409167295

Fonte: Autoria própria.

5.9.3 GENES DE RESISTÊNCIA ESPECÍFICOS

Alguns DEGs diretamente relacionados aos mecanismos de resistência a metais potencialmente tóxicos também foram encontrados. Apesar de em pouquíssima abundância detinham um alto valor de Log2FC sendo estes genes relacionados ao operon *cop* (*copA* e *copZ*) para cobre e *chrB* para cromo (Cr^{+3} e Cr^{+6}).

Nas amostras da comunidade desafiadas por Cr^{+3} e Cr^{+6} , o gene *chrB* foi identificado apenas para o gênero *Sinorhizobium (Ensifer)* com um valor de Log2FC > 3; nas amostras da comunidade desafiadas por Cu^{+2} os genes *copA* e *copZ* foram encontrados sendo pertencentes, respectivamente, aos gêneros *Brevundiomonas* e *Sinorhizobium (Ensifer)*.

O gene *chrB*, encontrado nas amostras da comunidade desafiadas por Cr^{+3} e Cr^{+6} atua como uma espécie de modulador para proteína *chrA* codificada por um gene de mesmo nome, sendo de extrema importância em mecanismos de resistência aos metais mencionados (BRANCO; MORAIS, 2013; SHAW; DUSSAN, 2018). Também é considerado um regulador do operon *chr* agindo como regulador de transcrição ligando-se ao metal para promover a liberação de cromo (PUSHKAR et al., 2021). Algumas evidências também indicam a participação do gene na redução de Cr^{+6} a Cr^{+3} antes que ocorra o transporte de cromo por proteínas codificadas pelo gene *chrA* (proteínas pertencentes à família de transportadores de íon cromato).

Um experimento realizado por Dong e colaboradores (2018) com a bactéria *Serratia sp.* demonstrou um aumento na expressão dos genes *chrA* e *chrB* quando cultivadas em elevadas concentrações de Cr^{+6} , sendo responsáveis pelo efluxo de Cr^{+6} em excesso para o meio extracelular (DONG et al., 2018b).

Os genes *copA* e *copZ* encontrados como diferencialmente expressos nas amostras da comunidade com Cu^{+2} , são responsáveis pela codificação de uma enzima chamada de ATPase tipo P principal responsável por colocar para fora

excesso de cobre presente em bactérias (LU et al., 2017). O gene *copZ* encontrado diferencialmente expresso em *Sinorhizobium (Ensifer)* é responsável por garantir o efluxo de cobre citóxico sem que íons livres se movam novamente ao citoplasma (LE, 2013).

No estudo realizado por Elizalde-Díaz e colaboradores (2019), foi reportado que o gene *copA* foi identificado em *Rhizobium tropici* CIAT 899, está diretamente relacionado à resistência a cobre exibindo o efeito da deleção do gene na taxa de crescimento presença de cobre. Todavia, em nossas análises tal gene foi encontrado como diferencialmente expresso para *Brevundiomonas* e nenhum gene pertencente ao operon *cop* foi identificado para *Rhizobium*.

Em um estudo desenvolvido por Rathi e Nandabalan (2017) com amostras de rizosfera coletadas da cidade de Moradabad, na Índia, popularmente conhecida por “Cidade de latão”, foi identificadas bactérias *Brevundiomonas diminuta* MYS6 no local muito poluído pelo metal cobre (RATHI; NANDABALAN, 2017).

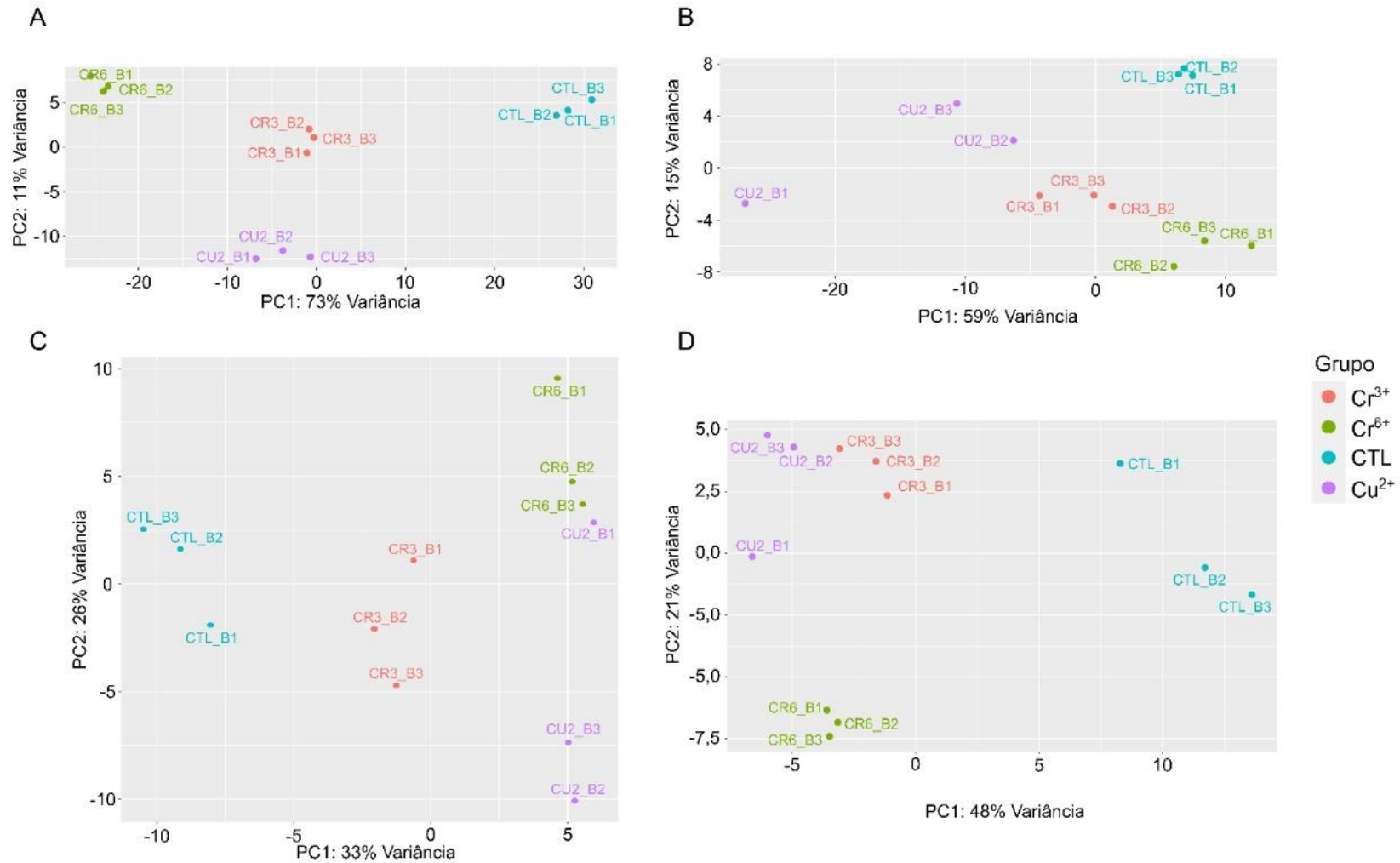
Em um posterior estudo com a mesma bactéria, realizado por Rathi e Yogalakshmi (2020), mostrou que *Brevundimonas diminuta* em associação com a planta girassol é capaz de promover a biorremediação em solos contaminados por cobre através da produção de exopolissacarídeos. Os autores ainda alegam que, do ponto de vista genético, genes que codificam transportadores de cobre para o meio extracelular podem ser expressos por *Brevundiomonas* o que condiz com nossos achados uma vez que, o gene *copA* é considerado um transportador de cobre (RATHI; K N, 2021).

5.9.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DE DADOS DE RNA-Seq.

A análise de componentes principais (PCA) revelou que os perfis de expressão gênica a partir dos dados de RNA-Seq possuem informação suficiente para discriminar os tratamentos, formando agrupamentos de pontos correspondentes as amostras da comunidade específicas para Cr^{+3} , Cr^{+6} , Cu^{+2} e CTL. Para o gênero *Rhizobium*, a soma das variâncias foi de 74% (PC1 = 59% e PC2 = 15%) a maior entre os transcriptomas (Figura 8 B), enquanto que para

Sinorhizobium (Ensifer), a soma das variâncias totalizou 59% (PC1 = 26% e PC2 = 33%) (Figura 8 C). Para o gênero *Brevundimonas* a soma das variâncias (PC1 = 48% e PC2 = 21%), foi equivalente a 69% (Figura 8 D). Ao realizar um PCA para o metatranscriptoma, um total de 84% (PC1 = 11% e PC2 = 73%) de variância foi obtido (Figura 8 A).

Figura 8 – Análise de componentes principais (PCA) a partir dos dados de expressão gênica obtidos para: (A) Metatranscriptoma; (B) *Rhizobium*; (C) *Sinorhizobium (Ensifer)*; (D) *Brevundimonas*.



Fonte: Autoria própria.

6. CONCLUSÃO

A maioria das pesquisas onde se busca compreender melhor mecanismos bacterianos capazes de promover resistência a metais potencialmente tóxicos não é plausível de execução devido ao pouco conhecimento existente sobre o mundo microbiano, tornando-se difícil seu cultivo em laboratório através de meios de cultura. Todavia as análises “ômicas”, principalmente genômica, transcriptômica e proteômica são uma grande alternativa para superar tais obstáculos, principalmente nos dias atuais com o crescente desenvolvimento de sequenciadores em larga escala.

Com este estudo fomos capazes de obter uma montagem do metatranscriptoma de uma comunidade de uma pequena população bacteriana recuperada a partir de amostras da comunidade de raízes da leguminosa *Arachis pintoii*. A partir dos transcritos de maior qualidade selecionados dessa montagem e do mapeamento das leituras RNA-Seq fomos capazes de obter os genes diferencialmente expressos de bactérias dos três principais gêneros mais representativos dessa comunidade, ou seja, *Brevundimonas*, *Rhizobium*, e *Sinorhizobium* (*Ensifer*), em condições amostrais de desafio com os metais Cr^{+3} , Cr^{+6} e Cu^{+2} . Para corroborar a presença dessas bactérias na comunidade, temos o resultado da análise do gene 16S de três isolados bacterianos, a qual revelou a identidade dessas mesmas bactérias com uma provável identidade de espécie: *Brevundimonas vesicularis*, *Rhizobium tropici*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *meliloti*. Há também um quarto isolado dessa comunidade, identificado como sendo da espécie *Stenotrophomonas maltophilia*, na análise do gene 16S, cujo gênero foi reconhecido no metatranscriptoma, porém apresentou baixíssima representatividade.

A grande maioria dos genes diferencialmente expressos induzidos na presença dos metais estavam relacionados a mecanismos de transporte tais como os genes codificadores de transportadores ABC e genes diretamente conectados a mecanismos de transporte de metais para a região extracelular, como os genes *copA* e *copZ* relacionados ao transporte de cobre e *chrB* relacionado ao transporte de cromo (trivalente e hexavalente).

Uma grande quantidade de transportadores ABC foram encontrados relacionados a mecanismos de resistência aos metais, assim como, porém, em menor quantidade, também foram achados genes relacionados a proteínas de membrana, bombas de efluxo, fatores de nodulação e ATPases.

Além disso, observamos que os gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (*Ensifer*) apresentaram uma maior quantidade de genes de resistência e tolerância a metais que foram identificados como diferencialmente expressos considerando o experimento de desafio com os metais cromo e cobre. Esses dois gêneros abrangem bactérias promotoras de crescimento em plantas, em especial, associadas à fixação de nitrogênio.

Apesar de *Brevundiomonas* ter tido uma maior representatividade nas amostras da comunidade controles não podemos descartar a provável existência de mecanismos de resistência principalmente relacionados ao metal cobre, uma vez que apresentou como gene diferencialmente expresso induzido um transportador de cobre: o gene *copA* detendo um alto valor de Log₂FC.

O gênero *Rhizobium* foi aquele que apresentou uma maior capacidade de resistências para as amostras da comunidade desafiadas por Cr⁺³, Cr⁺⁶ e Cu⁺², entretanto, quando teve seus genes diferencialmente expressos analisados, percebemos que sua resistência não estava diretamente relacionada aos metais, mas sim a outros mecanismos, como, por exemplo, a fixação de nitrogênio, que possibilitava sua resistência em ambientes poluídos por metais potencialmente tóxicos.

Muito provavelmente há uma forte relação entre os gêneros bacterianos encontrados em nossa comunidade com o tipo de planta da onde foram coletados. Vários são os estudos que relacionam mecanismos de fixação de nitrogênio a resistência a metais uma vez que, principalmente em plantas pertencentes à família Fabaceae, necessitam de metais como cofatores e responsáveis por garantirem a proteção da enzima nitrogenase ao oxigênio.

Através deste trabalho esperamos contribuir com mais evidências que levem a uma compreensão mais aprofundada em relação aos mecanismos bacterianos envolvidos na resistência ou tolerância aos metais Cr⁺³, Cr⁺⁶ e Cu⁺² que, dependendo de suas concentrações presentes no meio ambiente, podem tornar-se tóxicos. Dessa forma, os resultados apresentados poderão auxiliar no

estudo e desenvolvimento de futuras técnicas de remediação biológica e, até mesmo na construção de microrganismos geneticamente modificados que possam atuar em processos de recuperação de ambientes que sofrem com a poluição por altas concentrações de metais potencialmente tóxicos.

7. REFERÊNCIAS

ABATENH, E. et al. The Role of Microorganisms in Bioremediation- A Review. **Open Journal of Environmental Biology**, v. 2, n. 1, p. 038–046, 10 nov. 2017.

ABBAS, S. Z. et al. A review on mechanism and future perspectives of cadmium-resistant bacteria. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 243–262, 1 jan. 2018.

AFROZE, S.; SEN, T. K. A Review on Heavy Metal Ions and Dye Adsorption from Water by Agricultural Solid Waste Adsorbents. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 7, p. 225, 20 jun. 2018.

AL HASIN, A. et al. Remediation of chromium(VI) by a methane-oxidizing bacterium. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 1, p. 400–405, 1 jan. 2010.

ALHEBSHI, A. M.; EL-BESTAWY, E. Genetic Characterization of *Pseudomonas stutzeri* Strain M15-10-3, the Highly Efficient Cr Accumulator Isolated from Leather Tanning Industrial Wastewater. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 67–72, 4 dez. 2018.

ALI, H.; KHAN, E. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 25, n. 6, p. 1353–1376, 18 ago. 2019.

ALTENHOFF, A. M. et al. Resolving the Ortholog Conjecture: Orthologs Tend to Be Weakly, but Significantly, More Similar in Function than Paralogs. **PLOS Computational Biology**, v. 8, n. 5, p. e1002514, 17 maio 2012.

AMATO, P. et al. Metatranscriptomic exploration of microbial functioning in clouds. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4383, 13 mar. 2019.

ANASTASIADOU, E.; JACOB, L. S.; SLACK, F. J. Non-coding RNA networks in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 1, p. 5–18, jan. 2018.

ASAD, S. A. et al. Integrated phytobial heavy metal remediation strategies for a sustainable clean environment - A review. **Chemosphere**, v. 217, p. 925–941, 1 fev. 2019.

ASHBURNER, M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–29, maio 2000.

ATIENO, M.; LESUEUR, D. Opportunities for improved legume inoculants: enhanced stress tolerance of rhizobia and benefits to agroecosystems. **Symbiosis**, v. 77, n. 3, p. 191–205, 1 mar. 2019.

AYANGBENRO, A. S.; BABALOLA, O. O. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 1, p. 94, jan. 2017.

BAAZIZ, H. et al. ChrASO, the chromate efflux pump of *Shewanella oneidensis*, improves chromate survival and reduction. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0188516, 22 nov. 2017.

BAFARO, E. et al. The emerging role of zinc transporters in cellular homeostasis and cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 28 jul. 2017.

BALDIRIS, R. et al. Reduction of Hexavalent Chromium and Detection of Chromate Reductase (ChrR) in *Stenotrophomonas maltophilia*. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 406, fev. 2018.

BAUEROVÁ, P. et al. Associations of urban environmental pollution with health-related physiological traits in a free-living bird species. **Science of The Total Environment**, v. 601–602, p. 1556–1565, 1 dez. 2017.

BAUM, D. A. et al. **The Princeton Guide to Evolution**. [s.l.] Princeton University Press, 2017.

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, n. 1, p. 289–300, 1995.

BERG, C. et al. Dissection of Microbial Community Functions during a Cyanobacterial Bloom in the Baltic Sea via Metatranscriptomics. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, 2018.

BERGER, E. A.; HEPPEL, L. A. Different Mechanisms of Energy Coupling for the Shock-sensitive and Shock-resistant Amino Acid Permeases of *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 24, p. 7747–7755, 25 dez. 1974.

BERINI, F. et al. Metagenomics: novel enzymes from non-culturable microbes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 21, p. fnx211, 15 nov. 2017.

BESSER, J. et al. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 4, p. 335–341, 1 abr. 2018.

BONALDI, D.S. Genômica aplicada à predição dos mecanismos moleculares de resistência a metais potencialmente tóxicos e promoção de crescimento vegetal em *Rhizobium* sp. LBMP-C04. 2021. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo.

BRANCO, R. et al. The chromate-inducible chrBACF operon from the transposable element TnOtChr confers resistance to chromium(VI) and superoxide. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 21, p. 6996–7003, nov. 2008.

BRANCO, R.; MORAIS, P. V. Identification and Characterization of the Transcriptional Regulator ChrB in the Chromate Resistance Determinant of *Ochrobactrum tritici* 5bv11. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, p. e77987, 4 nov. 2013.

BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 59–60, jan. 2015.

CABRAL, L. et al. Anthropogenic impact on mangrove sediments triggers differential responses in the heavy metals and antibiotic resistomes of microbial communities. **Environmental Pollution**, v. 216, p. 460–469, 1 set. 2016.

CAO, Y. et al. A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

CHAUDHARY, K.; JAN, S.; KHAN, S. Chapter 23 - Heavy Metal ATPase (HMA2, HMA3, and HMA4) Genes in Hyperaccumulation Mechanism of Heavy Metals. In: AHMAD, P. (Ed.). **Plant Metal Interaction**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 545–556.

CHEN, D. et al. CusS-CusR Two-Component System Mediates Tigecycline Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2020.

CHONG, J. et al. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. **Nature Protocols**, v. 15, n. 3, p. 799–821, mar. 2020.

CORRETTO, E. et al. Draft Genome Sequences of 10 Microbacterium spp., with Emphasis on Heavy Metal-Contaminated Environments. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, p. e00432-15, 14 maio 2015.

CRAMER, P. Organization and regulation of gene transcription. **Nature**, v. 573, n. 7772, p. 45–54, set. 2019.

CRICK, F. Central Dogma of Molecular Biology. **Nature**, v. 227, n. 5258, p. 561–563, ago. 1970.

CRISTALDI, A. et al. Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and PAHs. A brief review. **Environmental Technology & Innovation**, v. 8, p. 309–326, 1 nov. 2017.

CUBILLAS, C. et al. A comprehensive phylogenetic analysis of copper transporting P1B ATPases from bacteria of the Rhizobiales order uncovers multiplicity, diversity and novel taxonomic subtypes. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 4, p. e00452, 2017.

DAS, S.; DASH, H. R.; CHAKRABORTY, J. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 2967–2984, 1 abr. 2016.

DIDION, J. P.; MARTIN, M.; COLLINS, F. S. Atropos: specific, sensitive, and speedy trimming of sequencing reads. **PeerJ**, v. 5, 30 ago. 2017.

DIERCKXSENS, N.; MARDULYN, P.; SMITS, G. NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 4, p. e18, 28 fev. 2017.

DOBIN, A.; GINGERAS, T. R. Mapping RNA-seq Reads with STAR. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 51, p. 11.14.1-11.14.19, 3 set. 2015.

DONG, L. et al. Analysis of the Genome and Chromium Metabolism-Related Genes of *Serratia* sp. S2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 1, p. 140–152, 1 maio 2018a.

DONG, L. et al. Analysis of the Genome and Chromium Metabolism-Related Genes of *Serratia* sp. S2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 1, p. 140–152, 1 maio 2018b.

DROST, H.-G. et al. myTAI: evolutionary transcriptomics with R. **Bioinformatics**, v. 34, n. 9, p. 1589–1590, 1 maio 2018.

DUFFUS, J. H. “Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793–807, 31 maio 2002.

EDDY, S. R. Accelerated Profile HMM Searches. **PLOS Computational Biology**, v. 7, n. 10, p. e1002195, 20 out. 2011.

EWING, B. et al. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175–185, 3 jan. 1998.

FAGORZI, C. et al. Harnessing Rhizobia to Improve Heavy-Metal Phytoremediation by Legumes. **Genes**, v. 9, n. 11, p. 542, nov. 2018.

FAKHOURY, J. N. et al. Functional asymmetry and chemical reactivity of CsoR family persulfide sensors. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 21, p. 12556–12576, 2 dez. 2021.

FAN, C.; KAISER, J. T.; REES, D. C. A structural framework for unidirectional transport by a bacterial ABC exporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 32, p. 19228–19236, 11 ago. 2020.

GANZ, T. Erythropoietic regulators of iron metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, Iron as Soul of Life on Earth Revisited: From Chemical Reaction, Ferroptosis to Therapeutics. v. 133, p. 69–74, 1 mar. 2019.

GAUTHIER, J. et al. A brief history of bioinformatics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 6, p. 1981–1996, 27 nov. 2019.

GENCHI, G. et al. The Effects of Cadmium Toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 11, p. 3782, jan. 2020a.

GENCHI, G. et al. Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 3, p. 679, jan. 2020b.

Global assessment of soil pollution. [s.l.] FAO and UNEP, 2021.

GONZALEZ, E. et al. Trees, fungi and bacteria: tripartite metatranscriptomics of a root microbiome responding to soil contamination. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 53, 21 mar. 2018.

GONZÁLEZ-GUERRERO, M. et al. Fixating on metals: new insights into the role of metals in nodulation and symbiotic nitrogen fixation. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 45, 13 fev. 2014.

GRABHERR, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644–652, 15 maio 2011.

GU, R. et al. Chromium metabolism characteristics of coexpression of ChrA and ChrT gene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 204, p. 111060, 1 nov. 2020.

HAAS, B. J. et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. **Nature protocols**, v. 8, n. 8, ago. 2013.

HATTON, J. J. et al. Diet affects arctic ground squirrel gut microbial metatranscriptome independent of community structure. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 1518–1535, 2017.

HE, R. et al. Copper stress by nutritional immunity activates the CusS-CusR two-component system that contributes to *Vibrio alginolyticus* anti-host response but affects virulence-related properties. **Aquaculture**, v. 532, p. 736012, 15 fev. 2021.

HIGGINS, S. et al. Copper resistance genes of *Burkholderia cenocepacia* H111 identified by transposon sequencing. **Environmental Microbiology Reports**, v. 12, n. 2, p. 241–249, 2020.

HOLMES, D. E. et al. Metatranscriptomic Evidence for Direct Interspecies Electron Transfer between *Geobacter* and *Methanotherix* Species in Methanogenic Rice Paddy Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, 3 mar. 2017.

HOU, D. et al. Metal contamination and bioremediation of agricultural soils for food safety and sustainability. **Nature Reviews Earth & Environment**, v. 1, n. 7, p. 366–381, jul. 2020.

HRDLICKOVÁ, R.; TOLOUE, M.; TIAN, B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis: RNA-Seq. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 8, 1 maio 2016.

HU, Y. et al. Molecular analysis of the copper-responsive CopRSCD of a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain. **The Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 277–286, 1 jun. 2009.

HÜBNER, R.; ASTIN, K. B.; HERBERT, R. J. H. 'Heavy metal'—time to move on from semantics to pragmatics? **Journal of Environmental Monitoring**, v. 12, n. 8, p. 1511–1514, 5 ago. 2010.

HUERTA-CEPAS, J. et al. Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by eggNOG-Mapper. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 8, p. 2115–2122, 1 ago. 2017.

HWANG, C. et al. Complete Genome Sequence of *Alkaliphilus metalliredigens* Strain QYMF, an Alkaliphilic and Metal-Reducing Bacterium Isolated from Borax-Contaminated Leachate Ponds. **Genome Announcements**, v. 4, n. 6, p. e01226-16, 3 nov. 2016.

HYDE, S. C. et al. Structural model of ATP-binding proteing associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. **Nature**, v. 346, n. 6282, p. 362–365, jul. 1990.

IGIEHON, N. O.; BABALOLA, O. O. Rhizosphere Microbiome Modulators: Contributions of Nitrogen Fixing Bacteria towards Sustainable Agriculture. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 4, p. 574, abr. 2018.

IGIRI, B. E. et al. Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review. **Journal of Toxicology**, v. 2018, p. e2568038, 27 set. 2018.

IRAVANI, S.; VARMA, R. S. Bacteria in Heavy Metal Remediation and Nanoparticle Biosynthesis. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 8, n. 14, p. 5395–5409, 13 abr. 2020.

JANSSON, J. K.; HOFMOCKEL, K. S. The soil microbiome—from metagenomics to metaphenomics. **Current Opinion in Microbiology**, Environmental Microbiology * The New Microscopy. v. 43, p. 162–168, 1 jun. 2018.

JIANG, B. et al. Impacts of heavy metals and soil properties at a Nigerian e-waste site on soil microbial community. **Journal of Hazardous Materials**, v. 362, p. 187–195, 15 jan. 2019.

KAPAH, M.; SACHDEVA, S. Bioremediation Options for Heavy Metal Pollution. **Journal of Health & Pollution**, v. 9, n. 24, 27 nov. 2019.

KHALID, S. et al. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. **Journal of Geochemical Exploration**, Remediation of Polluted Soils - Part 2. v. 182, p. 247–268, 1 nov. 2017.

KHAN, A. R. et al. Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171534, 10 fev. 2017.

KORSTIAN, J. M. et al. Mercury contamination in bats from the central United States. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 160–165, jan. 2018.

KUKURBA, K. R.; MONTGOMERY, S. B. RNA Sequencing and Analysis. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2015, n. 11, p. 951–969, 13 abr. 2015.

KUPPUSAMY, S. et al. Ex-Situ Remediation Technologies for Environmental Pollutants: A Critical Perspective. In: DE VOOGT, P. (Ed.). . **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 236**. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 117–192.

LAHENS, N. F. et al. A comparison of Illumina and Ion Torrent sequencing platforms in the context of differential gene expression. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 602, 10 ago. 2017.

LANGMEAD, B. et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v. 10, n. 3, p. R25, 4 mar. 2009.

LE, R. V. **A Method of Determining the Relationship Between Copper ATPases and Nitrite Reductase.**

LEGGETT, R. M. et al. Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics. **Frontiers in Genetics**, v. 4, p. 288, 17 dez. 2013.

LELLIS, B. et al. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 2, p. 275–290, 1 jul. 2019.

LEONG, Y. K.; CHANG, J.-S. Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. **Bioresource Technology**, v. 303, p. 122886, 1 maio 2020.

LI, C. et al. A Review on Heavy Metals Contamination in Soil: Effects, Sources, and Remediation Techniques. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 28, n. 4, p. 380–394, 19 maio 2019a.

LI, F. et al. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal the breed effect on the rumen microbiome and its associations with feed efficiency in beef cattle. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 6, 14 jan. 2019b.

LI, F.; GUAN, L. L. Metatranscriptomic Profiling Reveals Linkages between the Active Rumen Microbiome and Feed Efficiency in Beef Cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, 24 fev. 2017.

LI, L.; YANG, X. The Essential Element Manganese, Oxidative Stress, and Metabolic Diseases: Links and Interactions. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. e7580707, 5 abr. 2018.

LIN, H. et al. Screening and evaluation of heavy metals facilitating antibiotic resistance gene transfer in a sludge bacterial community. **Science of The Total Environment**, v. 695, p. 133862, 10 dez. 2019.

LINDSTRÖM, K.; MOUSAVI, S. A. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 1314–1335, 2020.

LISCHER, H. E. L.; SHIMIZU, K. K. Reference-guided de novo assembly approach improves genome reconstruction for related species. **BMC Bioinformatics**, v. 18, n. 1, p. 474, 10 nov. 2017.

LISON, D. Chapter 9 - Cobalt. In: NORDBERG, G. F.; COSTA, M. (Eds.). . **Handbook on the Toxicology of Metals (Fifth Edition)**. [s.l.] Academic Press, 2022. p. 221–242.

LIU, L. et al. Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability. **The Science of the Total Environment**, v. 633, p. 206–219, 15 ago. 2018.

LLOYD, K. G. et al. Phylogenetically Novel Uncultured Microbial Cells Dominate Earth Microbiomes. **mSystems**, 25 set. 2018.

LOOMIS, D. et al. Identifying occupational carcinogens: an update from the IARC Monographs. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 75, n. 8, p. 593–603, ago. 2018.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014.

LOWE, R. et al. Transcriptomics technologies. **PLOS Computational Biology**, v. 13, n. 5, p. e1005457, 18 maio 2017.

LÜ, J. et al. Origin and spatial distribution of heavy metals and carcinogenic risk assessment in mining areas at You'xi County southeast China. **Geoderma**, v. 310, p. 99–106, 15 jan. 2018.

LU, M. et al. Transcriptome Response to Heavy Metals in Sinorhizobium (Ensifer) meliloti CCNWSX0020 Reveals New Metal Resistance Determinants That Also Promote Bioremediation by Medicago lupulina in Metal-Contaminated Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 20, 15 out. 2017.

MA, L. et al. Microbial reduction fate of chromium (Cr) in aqueous solution by mixed bacterial consortium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, p. 763–770, 15 abr. 2019.

MACCANNELL, D. Next Generation Sequencing in Clinical and Public Health Microbiology. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 38, n. 21, p. 169–176, 1 nov. 2016.

MAHMOOD, T. et al. Metal concentrations in common skittering frog (*Euphlyctis cyanophlyctis*) inhabiting Korang River, Islamabad, Pakistan. **Basic and Applied Herpetology**, v. 30, p. 25–38, 23 out. 2016.

MALLA, M. A. et al. Understanding and Designing the Strategies for the Microbe-Mediated Remediation of Environmental Contaminants Using Omics Approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 4 jun. 2018.

MANZONI, C. et al. Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. **Briefings in Bioinformatics**, v. 19, n. 2, p. 286–302, 22 nov. 2016.

MARCELINO, V. R. et al. Meta-transcriptomics reveals a diverse antibiotic resistance gene pool in avian microbiomes. **BMC Biology**, v. 17, n. 1, p. 31, 8 abr. 2019.

MARET, W. Zinc in Pancreatic Islet Biology, Insulin Sensitivity, and Diabetes. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 22, n. 1, p. 1–8, mar. 2017.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, 2 ago. 2011.

MATOS, A. T. DE. **Poluição Ambiental: Impactos no Meio Físico**. [s.l.] Editora UFV, 2020.

MATSUDA, T.; OKUYAMA, A. Cancer incidence rates in the world from the Cancer Incidence in Five Continents XI. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 48, n. 2, p. 202–203, 1 fev. 2018.

MAURYA, P. K. et al. Bioaccumulation and potential sources of heavy metal contamination in fish species in River Ganga basin: Possible human health risks evaluation. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 472–481, 1 jan. 2019.

MCDERMAID, A. et al. Interpretation of differential gene expression results of RNA-seq data: review and integration. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 6, p. 2044–2054, 27 nov. 2019.

MEHTA, R. S. et al. Stability of the human faecal microbiome in a cohort of adult men. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 347–355, mar. 2018.

MENNA, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315–332, jun. 2006.

MIEDICO, O. et al. Hazardous and essential trace elements profile in the different soft tissues of *Lithophaga lithophaga* (Linnaeus, 1758) from Southern Adriatic Sea

(Italy). **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 98, n. 8, p. 877–885, 13 set. 2016.

MISHRA, S. et al. Heavy Metal Contamination: An Alarming Threat to Environment and Human Health. In: SOBTI, R. C.; ARORA, N. K.; KOTHARI, R. (Eds.). **Environmental Biotechnology: For Sustainable Future**. Singapore: Springer, 2019. p. 103–125.

MOLL, R.; DAVIS, B. Iron, vitamin B12 and folate. **Medicine**, Haematology (Part 1 of 2). v. 45, n. 4, p. 198–203, 1 abr. 2017.

MUNYAKA, P. M. et al. Antepartum Antibiotic Treatment Increases Offspring Susceptibility to Experimental Colitis: A Role of the Gut Microbiota. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0142536, 25 nov. 2015.

MYINT, Z. W. et al. Copper deficiency anemia: review article. **Annals of Hematology**, v. 97, n. 9, p. 1527–1534, 1 set. 2018.

NANDA, M.; KUMAR, V.; SHARMA, D. K. Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to 'clean-up' heavy metal contaminants from water. **Aquatic Toxicology**, v. 212, p. 1–10, 1 jul. 2019.

NAYAK, A. K. et al. Enhancement of toxic Cr (VI), Fe, and other heavy metals phytoremediation by the synergistic combination of native *Bacillus cereus* strain and *Vetiveria zizanioides* L. **International Journal of Phytoremediation**, v. 20, n. 7, p. 682–691, 7 jun. 2018.

NILSEN, F. M. et al. Trace element biodistribution in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Chemosphere**, v. 181, p. 343–351, 1 ago. 2017.

NIU, S.-Y. et al. Bioinformatics tools for quantitative and functional metagenome and metatranscriptome data analysis in microbes. **Briefings in Bioinformatics**, v. 19, n. 6, p. 1415–1429, 27 nov. 2018.

NOVOA-APONTE, L. et al. The Two-Component System CopRS Maintains Subfemtomolar Levels of Free Copper in the Periplasm of *Pseudomonas aeruginosa* Using a Phosphatase-Based Mechanism. **mSphere**, 23 dez. 2020.

PAL, C. et al. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. Database issue, p. D737-743, jan. 2014.

PAPATHEODOROU, I. et al. Expression Atlas: gene and protein expression across multiple studies and organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D246–D251, 4 jan. 2018.

PASQUINI, N. C. Revoluções Industriais: uma abordagem conceitual. **Revista Tecnológica da Fatec Americana**, v. 8, n. 01, p. 29–44, 8 ago. 2020.

PATRO, R. et al. Salmon: fast and bias-aware quantification of transcript expression using dual-phase inference. **Nature methods**, v. 14, n. 4, p. 417–419, abr. 2017.

PAUL, D. Research on heavy metal pollution of river Ganga: A review. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 2, p. 278–286, 1 jun. 2017.

PEREIRA, A. R. B. USO DE MICRO-ORGANISMOS PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES IMPACTADOS. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 995–1006, 13 mar. 2012.

PÉREZ-LÓPEZ, M. et al. Bioaccumulation of cadmium, lead and zinc in liver and kidney of red fox (*Vulpes vulpes*) from NW Spain: influence of gender and age. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 109–117, 2 jan. 2016.

POURRET, O.; HURSTHOUSE, A. It's Time to Replace the Term "Heavy Metals" with "Potentially Toxic Elements" When Reporting Environmental Research. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 22, p. 4446, nov. 2019.

PRABHAKARAN, P.; AQEEL ASHRAF, M.; SYAIDATUL AQMA, W. Microbial stress response to heavy metals in the environment. **RSC Advances**, v. 6, n. 111, p. 109862–109877, 2016.

PRASAD, R. **Environmental Pollution and Remediation**. [s.l.] Springer Nature, 2020.

PURVES, J. et al. A horizontally gene transferred copper resistance locus confers hyper-resistance to antibacterial copper toxicity and enables survival of community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 in macrophages. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 1576–1589, 2018.

PUSHKAR, B. et al. Chromium pollution and its bioremediation mechanisms in bacteria: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 287, p. 112279, 1 jun. 2021.

QIAN, X. et al. Characterization of fungal-mediated carbonate precipitation in the biomineralization of chromate and lead from an aqueous solution and soil. **Journal of Cleaner Production**, v. 164, p. 198–208, 15 out. 2017.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Database issue, p. D590–D596, jan. 2013.

QUINTELLA, C. M.; MATA, A. M. T.; LIMA, L. C. P. Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils. **Journal of Environmental Management**, v. 241, p. 156–166, 1 jul. 2019.

RAHA, S. et al. Is copper beneficial for COVID-19 patients? **Medical Hypotheses**, v. 142, p. 109814, 1 set. 2020.

RAI, P. K. et al. Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. **Environment International**, v. 125, p. 365–385, 1 abr. 2019.

RATHI, M.; K N, Y. Brevundimonas diminuta MYS6 associated Helianthus annuus L. for enhanced copper phytoremediation. **Chemosphere**, v. 263, p. 128195, 1 jan. 2021.

RATHI, M.; NANDABALAN, Y. K. Copper-tolerant rhizosphere bacteria—characterization and assessment of plant growth promoting factors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 10, p. 9723–9733, 1 abr. 2017.

REHMAN, K. et al. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 157–184, 2018.

ROCHA, D. J. P.; SANTOS, C. S.; PACHECO, L. G. C. Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 3, p. 685–693, 1 set. 2015.

RODRÍGUEZ EUGENIO, N. et al. **Soil pollution: a hidden reality**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018.

ROST, B. Twilight zone of protein sequence alignments. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 12, n. 2, p. 85–94, 1 fev. 1999.

SARWAR, N. et al. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. **Chemosphere**, v. 171, p. 710–721, 1 mar. 2017.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 27, n. 6, p. 863–864, 15 mar. 2011.

SCHNEEBERGER, K. et al. Reference-guided assembly of four diverse Arabidopsis thaliana genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 25, p. 10249–10254, 21 jun. 2011.

SHAKYA, M.; LO, C.-C.; CHAIN, P. S. G. Advances and Challenges in Metatranscriptomic Analysis. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 2019.

SHARPTON, T. J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 2014.

SHAW, D. R.; DUSSAN, J. Transcriptional analysis and molecular dynamics simulations reveal the mechanism of toxic metals removal and efflux pumps in Lysinibacillus sphaericus OT4b.31. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 127, p. 46–61, 1 fev. 2018.

SHEN, W.; REN, H. TaxonKit: A practical and efficient NCBI taxonomy toolkit. **Journal of Genetics and Genomics**, Special issue on Microbiome. v. 48, n. 9, p. 844–850, 20 set. 2021.

SHI, M.; ZHANG, Y.-Z.; HOLMES, E. C. Meta-transcriptomics and the evolutionary biology of RNA viruses. **Virus Research**, v. 243, p. 83–90, 2 jan. 2018.

SINGH, S.; VARMA, A. Structure, Function, and Estimation of Leghemoglobin. In: HANSEN, A. P. et al. (Eds.). . **Rhizobium Biology and Biotechnology**. Soil Biology. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 309–330.

SMEDLEY, P. L.; KINNIBURGH, D. G. Molybdenum in natural waters: A review of occurrence, distributions and controls. **Applied Geochemistry**, v. 84, p. 387–432, 1 set. 2017.

SMITH-UNNA, R. et al. TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. **Genome Research**, v. 26, n. 8, p. 1134–1144, ago. 2016.

SOLBIATI, J.; FRIAS-LOPEZ, J. Metatranscriptoma do Microbioma Oral na Saúde e na Doença. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 5, p. 492–500, 1 maio 2018.

SONG, B. et al. Evaluation methods for assessing effectiveness of in situ remediation of soil and sediment contaminated with organic pollutants and heavy metals. **Environment International**, v. 105, p. 43–55, 1 ago. 2017.

SRISWASDI, S.; YANG, C.; IWASAKI, W. Generalist species drive microbial dispersion and evolution. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1162, 27 out. 2017.

STARK, R.; GRZELAK, M.; HADFIELD, J. RNA sequencing: the teenage years. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 11, p. 631–656, nov. 2019.

SUN, Z. et al. Community dynamics of prokaryotic and eukaryotic microbes in an estuary reservoir. **Scientific Reports**, v. 4, p. 6966, 10 nov. 2014.

SUZEK, B. E. et al. UniRef: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters. **Bioinformatics**, v. 23, n. 10, p. 1282–1288, 15 maio 2007.

TALABI, A. O.; KAYODE, T. J. Groundwater Pollution and Remediation. **Journal of Water Resource and Protection**, v. 11, n. 01, p. 1, 14 jan. 2019.

TCHOUNWOU, P. B. et al. Heavy Metals Toxicity and the Environment. **EXS**, v. 101, p. 133–164, 2012.

THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D325–D334, 8 jan. 2021.

THEODOULOU, F. L.; KERR, I. D. ABC transporter research: going strong 40 years on. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, n. 5, p. 1033–1040, 9 out. 2015.

THORGERSEN, M. et al. Mechanisms of Chromium and Uranium Toxicity in *Pseudomonas stutzeri* RCH2 Grown under Anaerobic Nitrate-Reducing Conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1529, 1 ago. 2017.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105–1111, 1 maio 2009.

VAN DIJK, E. L. et al. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 9, p. 418–426, 1 set. 2014.

VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 309, n. 1, p. 1–7, 1 ago. 2010.

VINCENT, A. T. et al. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. **Journal of Microbiological Methods**, What's next in microbiology methods? Emerging methods. v. 138, p. 60–71, 1 jul. 2017.

WANG, B. et al. Reviving the Transcriptome Studies: An Insight Into the Emergence of Single-Molecule Transcriptome Sequencing. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 2019.

WANG, D.; FARHANA, A. Biochemistry, RNA Structure. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

WANG, G. et al. Simultaneous microbial reduction of vanadium (V) and chromium (VI) by *Shewanella loihica* PV-4. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 353–358, 1 mar. 2017.

WANG, Q. et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, ago. 2007.

WANG, Q.; LIU, J.; ZHU, H. Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-Rhizobium Interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, jan. 1991.

WOOD, D. E.; SALZBERG, S. L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. **Genome Biology**, v. 15, n. 3, p. R46, 3 mar. 2014.

WU, W. et al. Assessment of heavy metal pollution and human health risks in urban soils around an electronics manufacturing facility. **Science of The Total Environment**, v. 630, p. 53–61, 15 jul. 2018.

XU, M.; DAVID, J. M.; KIM, S. H. The Fourth Industrial Revolution: Opportunities and Challenges. **International Journal of Financial Research**, v. 9, n. 2, p. 90, 5 fev. 2018.

YOUNG, J. M. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination “*Sinorhizobium adhaerens*” (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. Pt 6, p. 2107–2110, nov. 2003.

ZHENG, Z. et al. A *Bacillus subtilis* strain can reduce hexavalent chromium to trivalent and an *nfrA* gene is involved. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 97, 27 nov. 2014.

ZIYAADINI, M. et al. Biota-sediment accumulation factor and concentration of heavy metals (Hg, Cd, As, Ni, Pb and Cu) in sediments and tissues of *Chiton lamyi* (Mollusca: Polyplacophora: Chitonidae) in Chabahar Bay, Iran. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 17, n. 4, p. 1123–1134, 1 out. 2017.

ZORODDU, M. A. et al. The essential metals for humans: a brief overview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 195, p. 120–129, 1 jun. 2019.

