



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Estácio Jussie Odisi

Caracterização e potencial de biorremediação de microbiomas de drenagem ácida de minas da Bacia Carbonífera de Santa Catarina (Sul do Brasil)

Florianópolis

2023

Estácio Jussie Odisi

Caracterização e potencial de biorremediação de microbiomas de drenagem ácida de minas da Bacia Carbonífera de Santa Catarina (Sul do Brasil)

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rubi Rorig
Coorientador: Prof. Dr. André Oliveira de Souza Lima

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Odisi, Estácio Jussie

Caracterização e potencial de biorremediação de microbiomas de drenagem ácida de minas da Bacia Carbonífera de Santa Catarina (Sul do Brasil) / Estácio Jussie Odisi ; orientador, Leonardo Rubi Rorig, coorientador, André Olveira de Souza Lima, 2023.

175 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Microbioma. 3. Biorremediação. 4. Drenagem ácida de mina. 5. Extremófilos. I. Rorig, Leonardo Rubi. II. Lima, André Olveira de Souza. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Estácio Jussie Odisi

Caracterização e potencial de biorremediação de microbiomas de drenagem ácida de minas da Bacia Carbonífera de Santa Catarina (Sul do Brasil)

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 25 de setembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Lucas William Mendes, Dr.
Instituição: Universidade de São Paulo

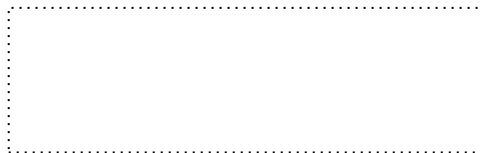
Profa. Gislaine Fongaro, Dra.
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rubens Tadeu Delgado Duarte, Dr.
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. José Bonomi Barufi, Dr.
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Francisco Carlos Deschamps, Dr.
Instituição: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biociências.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Leonardo Rubi Rorig, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023

Dedico este trabalho à minha noiva Barbara e
aos familiares Anastácio, Marilete, Marilins
e nonna Luiza (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço primeiramente a Deus pelo dom da ciência e por guiar os meus caminhos para a condução desse trabalho.

Agradeço a minha noiva Barbara pelo companheirismo, compreensão, paciência, por todo incentivo, amor e carinho durante essa longa jornada de trabalho.

Agradeço também aos meus pais Anastácio e Marilete que sempre acreditaram em mim, e nunca mediram esforços para me ajudar e apoiar nas minhas necessidades. E não posso deixar de estender aqui meu agradecimento a minha irmã Marilins que também sempre tem me apoiado com muito amor e carinho.

Agradeço ao meu orientador e amigo Dr. Leonardo Rorig que sempre me auxiliou e me apoiou em todo projeto do doutorado, compartilhado conhecimento e conselhos. E também por ser um grande amigo me apoiando na minha jornada empreendedora.

Agradeço também ao meu co-orientador e amigo Dr. André Lima pelos mais de 15 anos que trabalhamos juntos em diversas empreitadas diferentes com muita alegria, entusiasmo e principalmente companheirismo. Gratidão pela nossa amizade.

Agradeço ao suporte financeiro fornecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa vigente no Brasil (DS no 88882.438331/2019-01) que foi essencial para que eu pudesse me dedicar e concluir esse trabalho.

Quero agradecer aos membros da banca, Dr. Lucas, Dr. Rubens, Dra. Gislaíne, Dr. José e Dr. Francisco pelas considerações que enriqueceram este trabalho.

Agradeço ao professor e amigo Dr. Adonai que também me apoiou durante toda essa jornada, me direcionando quais caminhos trilhar ao longo do doutorado, através do seu vasto conhecimento compartilhando.

Quero agradecer ao meu sócio Robert de Freitas pelos nossos anos de amizade e principalmente pela ajuda durante parte do processo deste trabalho. Quero aqui estender o agradecimento a toda startup Biome4All da qual sou co-fundador, em especial ao Saulo que participou de parte deste trabalho.

Quero agradecer também o pesquisador William Sant'Ana e estender o agradecimento aos seus colegas da SATC que nos prestaram auxílio no processo de coleta e entendimento das áreas de mineração na Bacia Carbonífera de Santa Catarina.

Agradeço também aos meus amigos que sempre se fizeram presentes em toda essa jornada de trabalho árduo, em especial ao Rogério Junão e a Priscila que sempre me sempre abriram as portas de sua casa quando mais precisei.

Agradeço aos amigos dos laboratórios LGM e LAMA da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), pelo convívio, e aquele café após o almoço e todo apoio durante o processo do trabalho.

Quero agradecer a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), e todas as pessoas do LAFIC que dê alguma forma me auxiliaram durante todo esse momento de doutorado, de um modo especial a amizade desde o primeiro dia de aula da Bruna, Thaís e Geniane. Pela amizade do professor Dr. José entusiasta da marcenaria pelos grandes papos de madeira que tivemos. E pela colaboração do Diego neste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação de Biotecnologia e Biociências que sempre me apoiou e me ajudou em todos os momentos de dificuldade, principalmente durante a pandemia COVID19, onde não tivemos dias muito fáceis, mas sempre tive o apoio do programa e do professor Dr. Glauber.

“Minha ideia do sábio estoico moderno é alguém que transforma medo em prudência, dor em informação, erros em começos e desejos em realizações.”

Nassim Nicholas Taleb

RESUMO

As atividades de mineração exercem uma influência significativa no ambiente, dando origem a fenômenos como a Drenagem Ácida de Mina (DAM), caracterizada pela sua extrema acidez ($\text{pH} < 4$), níveis reduzidos de oxigênio dissolvido e elevadas concentrações de metais e sulfatos. As comunidades microbianas que se desenvolvem nessas áreas impactadas apresentam uma variedade de mecanismos de sobrevivência e adaptação. Conhecer essa diversidade ao nível molecular é estratégico tanto para compreender processos adaptativos e mecanismos com potencial uso em biorremediação e bioprospecção. Neste trabalho foram avaliadas as comunidades procariontes e eucariontes por meta-taxonômica (*amplicons* 16S e 18S) nos sedimentos e corpos d'água de diferentes áreas de mineração na Bacia Carbonífera de Santa Catarina, correlacionando sua composição com variáveis físico-químicas e identificando os potenciais de biorremediação destas comunidades. Foram definidas cinco estações de amostragem, onde três delas são bocas de minas com histórico crítico de geração de DAM (pH 2.7-3.6), outra localizada em boca de mina com características menos ácidas (pH 4.25), e uma última estação na junção de rios que recebem DAM e esgotos domésticos gerados na bacia hidrográfica. Uma das estações apresentou estabelecimento de algas filamentosas prosperando em condições de pH extremamente ácido (2,25). O ambiente da superfície destas algas filamentosas teve a sua comunidade procariótica e eucariótica caracterizada e seu potencial de biorremediação avaliado. Foram encontrados como táxa associados às três estações críticas em geração de DAM os gêneros procariontes, *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Thiomonas*, *Thermogymnomonas* e *Acidobacterium*; e nos eucariontes a alga *Potriospumella* (Chrysophyceae), ciliados *Hypotracha* e fungos LKM11. Para ambientes de transição, com fracas condições de acidez e metais em DAM, os gêneros associados foram *Sediminibacterium*, *Gallionella*, *Geothrix* e *Geobacter*. Portanto, as diferenças na composição das comunidades podem distinguir os locais altamente contaminados com DAM (pH 2.7-3.6) dos locais com níveis intermediários de contaminação (pH 3.8-4.25). A variação do pH foi o fator que melhor determinou a composição da comunidade procarionte, enquanto para a comunidade eucarionte, a concentração de nutrientes (TOC e N) e de metais (Ni, Cu, Mn e Zn) apresentaram a melhor explicabilidade sobre a composição da comunidade. Já a biomassa das algas filamentosas, apresentou uma extraordinária capacidade de acumulação de metais pesados (apresentando 9,8% de Fe na biomassa). A superfície da alga filamentosa em DAM é um microambiente que favorece o crescimento de alguns micro-organismos específicos em maior abundância, gerando uma menor α -diversidade, o que pode ser um mecanismo de atração de determinados grupos que promovem ações simbióticas. O microbioma associado a superfície das algas filamentosas apresentou em sua composição uma grande frequência da microalga *Pumiliosphaera acidofila*, da bactéria *Acidiphilium*, e do fungo *Aspergillus penicillioides* que juntos podem promover os benefícios gerados (fonte de carbono, zonas anóxicas, produção de alcalinidade biogênica e redução de sulfato) para reduzir os impactos da DAM.

Palavras-chave: meta-taxonomia; microbioma; drenagem ácida de mina; biorremediação; extremófilos.

ABSTRACT

Mining activities exert a significant influence on the environment, giving rise to phenomena such as Acid Mine Drainage (AMD), characterized by its extreme acidity (pH<4), low levels of dissolved oxygen, and high concentrations of metals and sulfates. The microbial communities that develop in these impacted areas exhibit a variety of survival and adaptation mechanisms. Understanding this diversity at the molecular level is strategic both for understanding adaptive processes and mechanisms with potential use in bioremediation and bioprospecting. In this study, prokaryotic and eukaryotic communities were evaluated by metataxonomics (16S and 18S amplicons) in sediments and water bodies from different mining areas in the Santa Catarina Coal Basin, correlating their composition with physicochemical variables and identifying the bioremediation potential of these communities. Five sampling stations were defined, with three of them being a mine with a critical history of AMD generation (pH 2.7-3.6), another located in a mine with less acidic characteristics (pH 4.25), and a final station at the confluence of rivers receiving AMD and domestic sewage generated in the watershed. One of the stations featured the thriving establishment of filamentous algae under extremely acidic conditions (pH 2.25). The surface environment of these filamentous algae had its prokaryotic and eukaryotic communities characterized, and their bioremediation potential was assessed. Taxa associated with the three critical AMD generation stations included the prokaryotic genera *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Thiomonas*, *Thermogymnomonas*, and *Acidobacterium*; and in eukaryotes, the alga *Poteroispumella* (Chrysophyceae), ciliates Hypotricha, and fungus LKM11. For transition environments, with weak acidity and AMD metals, associated genera were *Sediminibacterium*, *Gallionella*, *Geothrix*, and *Geobacter*. Therefore, differences in community composition can distinguish highly AMD-contaminated sites (pH 2.7-3.6) from sites with intermediate contamination levels (pH 3.8-4.25). The pH variation was the factor that best determined the composition of the prokaryotic community, while for the eukaryotic community, nutrient (TOC and N) and metal (Ni, Cu, Mn, and Zn) concentrations provided the best explanation for community composition. The filamentous algae's surface in AMD serves as a microenvironment that favors the growth of specific microorganisms in higher abundance, resulting in lower alpha-diversity, which may serve as a mechanism to attract certain groups that promote symbiotic actions. The microbiome associated with the filamentous algae's surface featured a high frequency of the microalga *Pumiliosphaera acidophila*, the bacterium *Acidiphilium*, and the fungus *Aspergillus penicillioides*, which together can promote the generated benefits (carbon source, anoxic zones, biogenic alkalinity production, and sulfate reduction) to mitigate AMD impacts.

Keywords: metataxonomy; microbiome; acid mine drainage; bioremediation; extremophiles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Conjunto de dados de áreas de mineração ao redor do mundo. (A) Os 15 principais países em área de mineração (km ²), a lista completa possui 121 países com um total de 57.278 km ² . (B) Lista de commodities de minas ativas no mundo	17
Figura 2 - Transformação do enxofre por meio de vias metabólicas mediadas por micro-organismos, considerando diferentes estados de oxidação, ocorrendo entre formas inorgânicas de enxofre, convertidas em enxofre orgânico.....	23
Figura 3 - Cadeias de transporte de elétrons de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , levando em consideração uma sequência de reações de oxidação-redução.....	30
Figura 4 - Cadeias de transporte de elétrons de organismos redutores de ferro.....	31
Figura 5 - Mecanismos gerais de biotransformação de metais pesados por bactérias	47
Figura 6 - Mecanismos envolvidos no transporte do zinco em bactérias.....	55
Figura 7 - Mecanismos envolvidos no transporte do arsênio em bactérias com o óperon <i>arsRDABC</i>	59
Figura 8 - Localização das estações amostrais ao longo da Bacia Carbonífera de Santa Catarina (BCSC), estado de Santa Catarina, Brasil	71
Figura 9 - Alpha-diversidade do microbioma (índice de Shannon e Chao1) para organismos procarióticos (16S) e eucarióticos (18S) em amostras de água e sedimento de áreas de DAM da Bacia Carbonífera de Santa Catarina.....	79
Figura 10 - Composição da comunidade de organismos procarióticos (16S) e eucarióticos (18S) em amostras de água e sedimento em estações de coleta na Bacia Carbonífera de Santa Catarina	80
Figura 11 - Análise de Correspondência Canônica com dados abióticos (verde) e de composição de organismos procarióticos 16S (azul) para amostras (vermelho) de água (A) e sedimento (B) da Bacia Carbonífera de Santa Catarina	83
Figura 12 - Análise de Correspondência Canônica com dados abióticos (verde) e de composição de organismos eucarióticos 18S (azul) para amostras (vermelho) de água (A) e sedimento (B) da Bacia Carbonífera de Santa Catarina	85
Figura 14 - Aspecto das algas filamentosas coletadas.....	101
Figura 15 - Caracterização da biomassa algal	107
Figura 16 - Alpha-diversidade do Microbioma pelo (A) índice de Shannon e (B) índice de Chao1, para organismos procariontes (16S) nas amostras de água, MSA e sedimento de DAM da BCSC	109

Figura 17 - Alpha-diversidade do Microbioma pelo (A) índice de Shannon e (B) índice de Chao1, para organismos eucariontes (18S) nas amostras de água, MSA e sedimento de DAM da BCSC	110
Figura 18 - Beta-diversidade do microbioma de organismos (A) procariontes 16S e (B) eucariontes 18S, em amostras de água, MSA e sedimento. Gráfico de Análises de Coordenadas Principais (PCoA) baseado na matriz de distância de Bray-Curtis	111
Figura 19 - Composição da comunidade de organismos procariontes (16S), considerando os 15 filos mais ocorrentes das amostras de água, MSA e sedimento	113
Figura 20 - Composição da comunidade de organismos procariontes (16S) em amostras de água, MSA e sedimento. Frequência de abundância dos 20 gêneros mais ocorrentes	114
Figura 21 - Composição da comunidade de organismos eucariontes (18S), considerando os 15 filos mais ocorrentes das amostras de água, MSA e sedimento	116
Figura 22 - Composição da comunidade de organismos eucariontes (18S) em amostras de água, MSA e sedimento. Frequência de abundância dos 20 gêneros mais ocorrentes	118
Figura 23 - Diagrama de Venn demonstrando a quantidade de variantes de sequência de amplicon (ASVs) exclusivas e compartilhadas entre os grupos (A) procariontes 16S e (B) eucariontes 18S das amostras de água, MSA e sedimento	119
Figura 24 - Gráfico ternário da distribuição de variante de sequência de amplicon (ASVs) de procariontes (16S) entre os grupos água, MSA e sedimento.....	120
Figura 25 - Gráfico ternário da distribuição de variante de sequência de amplicon (ASVs) de eucariontes (18S) entre os grupos água, MSA e sedimento	121

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais processos e equações químicas ocorrentes em drenagem ácida de minas	19
Quadro 2 - Localização e descrição dos locais de amostragem Bacia Carbonífera de Santa Catarina (BCSC) e designação das amostras de sedimentos	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mecanismos de toxicidade de metais pesados para micro-organismos.....	20
Tabela 2 - Características químicas e físico-químicas da água e do sedimento nas estações de coleta influenciadas por drenagem ácida de mina de carvão na bacia carbonífera de Santa Catarina – Brasil	77
Tabela 3 - Características físico-químicas de água e sedimento das amostras avaliadas.....	106
Tabela 4 - Características da biomassa dos tapetes algais coletados e processados na área de DAM.....	107
Tabela 5 - Taxóns alinhados com a sequência da alga filamentosa através da ferramenta BLAST do banco NCBI.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACL	Citrato liase
Al	Alumínio
Cu	Cobre
APS	5'-adenilsulfato
As	Arsênio
ASV	Variante de sequência de <i>amplicon</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BCSC	Bacia Carbonífera de Santa Catarina
BRS	Bactéria redutora de sulfato
CBB	Calvin-Benson-Bassham
CCA	Análises de Correspondência Canônica
CDF	Facilitador de difusão de cátions
CH ₄	Metano
CO ₂	Dióxido de Carbono
COND	Condutividade elétrica
Cys	Cisteína
DAM	Drenagem ácida de mina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPS	Exopolissacarídeos
Fe	Ferro
Fe(II)	Ferro ferroso
Fe(III)	Ferro férrico
FeS ₂	Dissulfeto de ferro (pirita)
FUR	<i>Ferric uptake regulator</i>
GSH	Glutationa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Met	Metionina
Mn	Manganês
MOE	Micro-organismos oxidantes de enxofre
MPS	Material particulado em suspensão
MQ	Menaquinona
MRE	Micro-organismos redutores de enxofre

MSA	Microbioma de superfície algal
MTs	Metalotioneínas
Pb	Chumbo
PEPS	Fosfoenolpiruvato sintetase
PK	Piruvato quinase
PT	Fósforo total
RND	Resistência-nodulação-divisão
rTCA	Ciclo redutivo do ácido tricarboxílico
SATC	Associação Beneficente da Indústria Carbonífera de Santa Catarina
sRNA	<i>Small RNA</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TN	Nitrogênio total
TOC	Carbono orgânico total
WGS	<i>Whole genome sequence</i>
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	APRESENTAÇÃO	16
1.2	PROBLEMÁTICA DA DAM	16
1.2.1	Formação de DAM	17
1.3	METABOLISMO MICROBIANO EM DRENAGEM ÁCIDA DE MINAS	20
1.3.1	Via metabólica do enxofre.....	22
1.3.1.1	<i>Processos de enxofre dissimilatórios</i>	23
1.3.1.1.1	<i>Oxidação.....</i>	23
1.3.1.1.2	<i>Redução</i>	24
1.3.1.1.3	<i>Desproporção</i>	26
1.3.1.2	<i>Processos assimilatórios de enxofre</i>	26
1.3.2	Ferro	27
1.3.2.1	<i>Oxidação do Ferro</i>	29
1.3.2.2	<i>Redução Dissimilativa do Ferro</i>	30
1.3.2.3	<i>Biomíneralização do Ferro</i>	32
1.3.3	Via metabólica do carbono.....	33
1.3.3.1	<i>Fixação de carbono pelo ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB)</i>	34
1.3.3.2	<i>Fixação de carbono pelo ciclo redutivo do ácido tricarbóxico (rTCA).....</i>	34
1.3.3.3	<i>Mecanismos moleculares envolvidos na concentração de CO₂</i>	35
1.3.3.4	<i>Produção de metano em ambientes de DAM.....</i>	35
1.3.4	Via metabólica do nitrogênio	36
1.3.4.1	<i>Fixação de nitrogênio.....</i>	36
1.3.4.2	<i>Nitrificação</i>	37
1.3.4.3	<i>Desnitrificação</i>	37
1.3.4.4	<i>Amonificação</i>	37
1.4	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A METAIS EM MICRO-ORGANISMOS	38
1.4.1	Mecanismos de transporte ativo ou efluxo	38
1.4.2	Sideróforos.....	39
1.4.3	Ligantes de ácidos orgânicos	41
1.4.4	Ligantes fosfatos e carbonatos	42
1.4.5	Produção de substâncias exopoliméricas	43

1.4.6	Metalotioneínas	44
1.4.7	Biossorção de metais	45
1.4.8	Biotransformação de metais tóxicos	46
1.5	INTERAÇÕES DE MICRO-ORGANISMOS COM METAIS	48
1.5.1	Cromo	48
1.5.2	Cobre	49
1.5.3	Níquel	51
1.5.4	Zinco	53
1.5.5	Chumbo	55
1.5.6	Arsênio	57
1.5.7	Mercúrio	60
1.6	FERRAMENTAS GENÉTICAS PARA ESTUDO EM DAM	63
1.7	HIPÓTESES	65
1.8	OBJETIVOS.....	66
1.8.1	Objetivo geral	66
1.8.2	Objetivos específicos	66
2	CAPÍTULO 1	67
2.1	RESUMO	68
2.2	INTRODUÇÃO.....	69
2.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.3.1	Área de estudo e amostragem	71
2.3.2	Análises geoquímicas	73
2.3.3	Extração de DNA	74
2.3.4	Biblioteca de amplicons e sequenciamento	74
2.3.5	Processamento de dados de DNA	75
2.3.6	Análises de <i>downstream</i>	75
2.4	RESULTADOS.....	77
2.4.1	Variáveis físico-químicas e químicas	77
2.4.2	Biodiversidade do microbioma	78
2.4.3	Composição da comunidade	79
2.4.4	Caracterização físico-químicas vs. Perfis taxonômicos	81
2.5	DISCUSSÃO.....	86
2.6	CONCLUSÕES.....	94
3	CAPÍTULO 2	95

3.1	RESUMO	96
3.2	INTRODUÇÃO.....	97
3.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	100
3.3.1	Área de estudo e amostragem	100
3.3.2	Análises geoquímicas	102
3.3.3	Caracterização da biomassa	102
3.3.4	Identificação molecular taxonômica.....	102
3.3.5	Avaliação do microbioma.....	103
3.3.5.1	<i>Extração de DNA</i>	103
3.3.5.2	<i>Biblioteca de amplicons e sequenciamento.....</i>	104
3.3.5.3	<i>Processamento de dados de DNA</i>	104
3.3.5.4	<i>Análises de downstream</i>	105
3.4	RESULTADOS.....	106
3.4.1	Variáveis físico-químicas	106
3.4.2	Caracterização da biomassa algal	106
3.4.3	Identificação da alga filamentosa	107
3.4.4	Biodiversidade do microbioma	109
3.4.5	Composição da comunidade	112
3.4.6	Interação entre os microbiomas	118
3.5	DISCUSSÃO.....	122
3.5.1	Variáveis físico-químicas e químicas	122
3.5.2	Caracterização da biomassa algal	123
3.5.3	Identificação da alga filamentosa	124
3.5.4	Biodiversidade do microbioma	125
3.5.5	Composição da comunidade do microbioma	126
3.5.6	Interação entre alga filamentosa e o microbioma	129
3.6	CONCLUSÃO	132
4	DISCUSSÃO GERAL	133
5	CONCLUSÃO GERAL	140
	REFERÊNCIAS	142
	APÊNDICE A – FOTOS DAS ESTAÇÕES DE COLETA.....	170
	APÊNDICE B - DADOS DAS ANÁLISES CORRESPONDÊNCIA CANÔNICA	173

APÊNDICE C - ÁRVORE FILOGENÉTICA DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	175
---	------------

1 INTRODUÇÃO

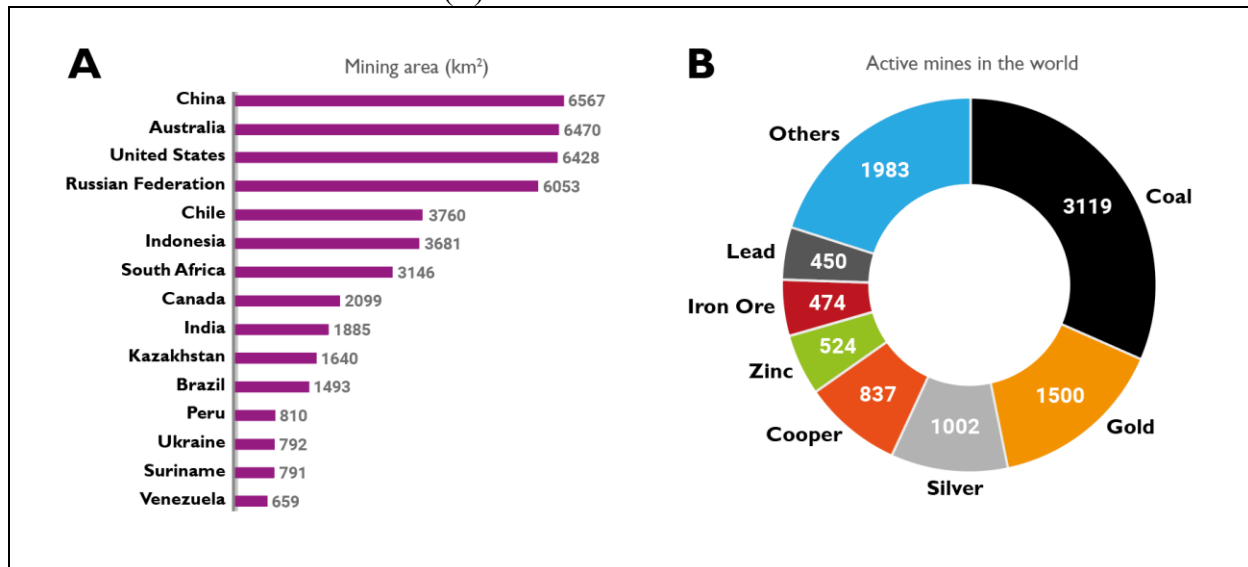
1.1 APRESENTAÇÃO

A proposta desta introdução é trazer uma revisão bibliográfica aprofundada sobre o metabolismo e mecanismos de adaptação de micro-organismos que estão associados a sobrevivência em ambientes de drenagem ácida de mina (DAM). O texto está dividido em cinco seções, a primeira (item 1.2) descreve a problemática da DAM, e a segunda (item 1.3) descreve o metabolismo microbiano e como utilizam as vias metabólicas do enxofre, carbono e nitrogênio. A terceira sessão (item 1.4) descreve mecanismos de resistência a metais, tais como transporte ativo ou efluxo, sideróforos, ligantes de ácidos orgânicos, ligantes fosfatos e carbonatos, produção de substâncias exopoliméricas, metalotioneínas, bioabsorção de metais e biotransformação de metais tóxicos. A quarta (item 1.5) relata a interação dos micro-organismos com os metais ferro, manganês, cromo, cobre, zinco, níquel, cobalto, cádmio, arsênio, chumbo e mercúrio. E por fim, uma abordagem sobre ferramentas genéticas para estudo em DAM (item 1.6).

1.2 PROBLEMÁTICA DA DAM

O aumento populacional e das atividades econômicas no atual sistema industrial implicam em uma crescente demanda por energia e minerais. Apesar das restrições ambientais acordadas nas últimas décadas (DONG et al., 2019), as atividades de mineração seguem sendo amplamente exploradas economicamente em muitos países. De acordo com um levantamento realizado em 2018 (MAUS et al., 2020), a área de mineração ativa no mundo compreende um total de 57.278 km², sendo a China, Austrália, Estados Unidos e Federação Russa os países com maiores áreas (Figura 1A). O mesmo estudo apontou 9.889 minas ativas de diversos tipos de minérios, sendo o carvão, ouro e prata as de maior ocorrência (Figura 1B).

Figura 1 - Conjunto de dados de áreas de mineração ao redor do mundo. (A) Os 15 principais países em área de mineração (km²), a lista completa possui 121 países com um total de 57.278 km². (B) Lista de commodities de minas ativas no mundo



Fonte: Maus et al., (2020).

Nos locais onde não existem atividades de exploração, as rochas que se encontram nas profundezas dos solos estão protegidas da oxidação química. Na ausência de oxigênio, os minerais de sulfeto, por exemplo, possuem baixa solubilidade química e são estáveis. Contudo, o processo de escavação realizado nas atividades de mineração faz com que os minerais fiquem expostos ao oxigênio atmosférico e à água, iniciando uma série de processos biogeoquímicos que podem levar à produção de DAM (AYANGBENRO; OLANREWAJU; BABALOLA, 2018; HALLBERG, 2010; WU et al., 2021). A geração de DAM resulta em um ambiente com baixo pH e altas concentrações de metais pesados. Estas características tornam este ambiente um local de condições extremas para a sobrevivência de seres vivos. Contudo, alguns grupos específicos de micro-organismos desenvolveram mecanismos de adaptação conseguindo sobreviver e se adaptar nestes ambientes de DAM.

1.2.1 Formação de DAM

As atividades de mineração que envolvem escavação, processamento mecânico e químico do material explorado e uso de equipamentos deixam uma grande quantidade de resíduos que são materiais tóxicos, corrosivos ou inflamáveis. Estes resíduos são subprodutos das operações de mineração que não têm valor econômico. Existe uma estimativa geral que pelo menos uma tonelada de resíduos de mineração é gerada para cada tonelada de minério

extraído (AYANGBENRO; OLANREWAJU; BABALOLA, 2018). No passado muitas atividades foram realizadas sem nenhum planejamento de gestão desses resíduos, implicando em um grande passivo ambiental. Nestas últimas décadas, a preocupação com o passivo ambiental tem feito com que as empresas de mineração apresentem um planejamento que informe quais serão as medidas tomadas em relação a redução de resíduos, recuperação de recursos, descarte de resíduos e proteção ambiental (HUDSON-EDWARDS; JAMIESON; LOTTERMOSER, 2011). A liberação desses resíduos no meio ambiente pode ter impacto significativo nos recursos hídricos superficiais, subterrâneos, aéreos e terrestres (RAMBABU et al., 2020).

Os fatores que são responsáveis pela geração de DAM são o grau de saturação da água, oxigênio, pH, temperatura, atividade química do Fe(III), energia de ativação química para iniciar a geração de ácido, minerais de sulfeto, área de superfícies de sulfeto de metal exposto e bactérias oxidantes de ferro (AYANGBENRO; OLANREWAJU; BABALOLA, 2018; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014). A maioria dos metais está relacionado a pirita (FeS_2) e ocorre principalmente como minérios de sulfeto. Sulfetos metálicos são reduzidos a ferrosos na reação com pirita pelo ferro férrico - principal oxidante. Esta reação é independente de oxigênio e é a etapa mais importante na oxidação de minerais de sulfetos. A oxidação do ferro ferroso pode ser mediada biologicamente, ou quimicamente pelo oxigênio molecular em pH acima de 4. Grupos específicos de micro-organismos oxidantes de sulfetos e metais, como por exemplo o *Acidithiobacillus ferrooxidans*, conseguem obter energia necessária para sobreviver a partir da pirita e outros metais sulfetados (WU et al., 2021). A taxa de oxidação química do ferro ferroso é insignificante abaixo de pH 4, portanto, a atividade das bactérias acidófilas oxidantes do ferro desempenham um papel crucial na geração de drenagem ácida da mina (HALLBERG, 2010). Em pH baixo, os metais pesados são estáveis em solução e móveis, e com o aumento do pH, tornam-se adsorvidos e, portanto imóveis (AYANGBENRO; OLANREWAJU; BABALOLA, 2018; DOLD, 2014; SANDY; BUTLER, 2009). A composição da drenagem pode diferir drasticamente de uma região para outra devido à geologia local, microclima, grupo de micro-organismos e fonte de água (RAMBABU et al., 2020; SIMATE; NDLOVU, 2014). O quadro 1 apresenta as principais equações químicas relacionadas aos processos comuns em drenagem ácida de minas.

Quadro 1 - Principais processos e equações químicas ocorrentes em drenagem ácida de minas

Processo	Equação Química
Intemperismo da pirita na presença de oxigênio e água	$2\text{FeS}_2 + 7\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Fe(II)} + 4\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}^+$
Oxidação de Fe(II) a Fe(III) (etapa limitante de taxa)	$4\text{Fe(II)} + \text{O}_2 + 4\text{H}^+ \leftrightarrow 4\text{Fe(III)} + 2\text{H}_2\text{O}$
Hidrólise de Fe(III) e precipitação parcial de Fe(III) se $\text{pH} > 3,5$	$\text{Fe(III)} + 3\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{Fe(OH)}_3 + 3\text{H}^+$
Oxidação de pirita adicional (etapa cíclica e auto-propagante)	$\text{FeS}_2 + 14\text{Fe}^{3+} + 8\text{H}_2\text{O} \rightarrow 15\text{Fe(II)} + 2\text{SO}_4^{2-} + 16\text{H}^+$
Reação global	$4\text{FeS}_2 + 15\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{Fe(III)} + 8\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}^+$

Fonte: Wu et al., (2021).

Uma grande parte dos problemas ambientais encontrados em mineração tem ligação direta com a má gestão dos resíduos. Os erros mais comuns são as falhas de barragens, infiltrações, derramamentos de rejeitos, locais não reabilitados e casos de descarte direto em cursos d'água (FRANKS et al., 2011). Tudo isso pode resultar em consequências ambientais graves e de longo prazo. A grande quantidade de resíduos gerados pelas atividades de mineração destrói a paisagem no local de exploração e perturba os ecossistemas, alterando a flora, fauna e microbiota (AYANGBENRO; OLANREWaju; BABALOLA, 2018). Os resíduos gerados após a lavra do mineral, geralmente são despejados no terreno circundante, sendo uma grande fonte de metais pesados e ácidos. Com isso, não existe um solo superficial com nutrientes e vegetação (TRIPATHI; SINGH; HILLS, 2016). Quando os resíduos contaminam águas subterrâneas, rios e outros corpos d'água que estão nas proximidades, fazem com que estas águas se tornem tóxicas com altas concentrações de ácidos e metais, podendo afetar o abastecimento de água de uso da população muitas vezes em regiões onde a água potável é escassa (AMBIADO et al., 2017; RAMBABU et al., 2020).

As condições de acidez e toxicidade encontradas em ambientes de DAM fazem com que os micro-organismos induzam respostas ao estresse, exibindo alterações na morfologia e montagem das células (CHAKRAVARTY; BANERJEE, 2008). Os efeitos de íons de metais pesados em micro-organismos incluem apoptose, inibição da síntese de adenosina trifosfato (ATP), dano de ácido nucleico, desnaturação de proteínas, deslocamento de um metal essencial,

indução de estresse oxidativo, interrupção da função de proteínas importantes que regulam processos fundamentais, incluindo crescimento, reparo do DNA, inibição da divisão celular e transcrição (Tabela 1) (AYANGBENRO; OLANREWAJU; BABALOLA, 2018; FASHOLA; NGOLE-JEME; BABALOLA, 2016). Ainda nestes ambientes de mineração, devido à toxicidade de metais pesados, a produção de espécies reativas de oxigênio danifica a membrana plasmática da célula. Devido a estas características, apenas organismos que de alguma forma se adaptaram a estas condições conseguem se desenvolver nestes ambientes, resultando em uma menor biodiversidade quando comparado a ambientes não impactados (RAMBABU et al., 2020).

Tabela 1. Mecanismos de toxicidade de metais pesados para micro-organismos

Tipo de Dano	Metais pesados
Inibição da divisão celular	Cd, Hg, Ni e Pb
ruptura da membrana celular	Cd, Cu, Hg, Ni, Pb e Zn
Dano no DNA	As, Cd, Hg, Pb
Desnaturação de Proteínas	Cd, Hg, Pb
Inibição da transcrição	Cd, Hg, Pb
Inibição da atividade enzimática	Cd, Cu, Hg, Ni, Pb e Zn

Adaptado de Rajendran et al., (2003) e Choudhury et al., (2017)

1.3 METABOLISMO MICROBIANO EM DRENAGEM ÁCIDA DE MINAS

Os micro-organismos precisam produzir energia para crescer e se reproduzir. Existem duas maneiras principais de produzir energia, através da “fototrofia” ou da “quimiotrofia” (PEPPER; GENTRY, 2015). Na maioria dos casos de fototrofia e quimiotrofia, ocorre o movimento de elétrons através da cadeia de transporte de elétrons que gera a força motriz do próton e ATP, a unidade bioquímica de energia.

Os micro-organismos fototróficos como microalgas e algumas bactérias contêm pigmentos sensíveis à luz que absorvem energia da luz solar e geram elétrons a partir da água na presença de oxigênio, ou geram elétrons a partir de H_2S , $S(0)$, $S_2O_3^{2-}$, H_2 , ou $Fe(II)$ em ambientes anaeróbicos (KONHAUSER, 2007).

Os quimiotróficos produzem energia durante uma série de reações redox nas quais os elétrons são transferidos de um doador de elétrons primário para um receptor de elétrons terminal através de uma série de etapas intermediárias catalisadas por enzimas. O oxigênio é o receptor de elétrons energeticamente mais favorável e é usado na respiração aeróbica por fungos, protozoários, bactérias e archaea. Se o oxigênio estiver disponível, os micro-organismos que são capazes de respirar oxigênio provavelmente crescerão rapidamente e superam os que não podem. Em um ambiente de difusão limitada, como solos encharcados, o oxigênio será consumido e a respiração anaeróbica assumirá o controle, fazendo com que predominem micro-organismos que podem reduzir aceptores alternativos de elétrons, como archaea e bactérias (NEWSOME; FALAGÁN, 2021). Em ordem de maior energia disponível, esses aceptores terminais de elétrons incluem nitrato, Mn(IV), Fe(III) e sulfato. Certos metais e metalóides em resíduos de minas também podem atuar como aceptores de elétrons e ser transformados através da redução de metal. Além da redução do sulfato, a metanogênese é frequentemente a última etapa do metabolismo anaeróbico. Arqueias estritamente anaeróbicas podem ganhar energia a partir da desproporção de compostos contendo acetato ou metil para produzir metano, ou pela produção de metano a partir da redução de bicarbonato acoplada à oxidação de H_2 (KONHAUSER, 2007). É bastante comum que as bactérias sejam capazes de usar múltiplas vias metabólicas para trabalhar sob diferentes condições ambientais, como mudar da respiração aeróbica para redução de nitrato na zona subóxica (anaeróbias facultativas). Similarmente, bactérias oxidantes de H_2 podem mudar para um metabolismo heterotrófico quando compostos orgânicos estão disponíveis (quimiolitoautotróficos facultativos), e ainda, fermentação de matéria orgânica quando os aceptores terminais de elétrons são limitados (KONHAUSER, 2007; ROANE; PEPPER; GENTRY, 2015). Essa flexibilidade permite que essas bactérias se beneficiem dos metabolismos energeticamente mais favoráveis sob condições ambientais variáveis.

Os quimioheterotróficos ganham energia usando compostos orgânicos como doadores de elétrons, oxidando-os a CO_2 ou CH_4 acoplados à redução de um receptor de elétrons terminal (ou luz para fotoheterotróficos). A disponibilidade de matéria orgânica pode, portanto, ser um fator limitante para a respiração aeróbica e anaeróbica. Algumas bactérias não necessitam de matéria orgânica em seu metabolismo; os quimiolitoautotróficos ganham energia a partir da oxidação de compostos inorgânicos como H_2 , enxofre ou Fe(II). Em resíduos de minas, as bactérias oxidantes de enxofre e Fe(II), degradam os minerais sulfetos, gerando acidez e, conseqüentemente, controlando o comportamento do metal nesses ambientes. Enquanto os

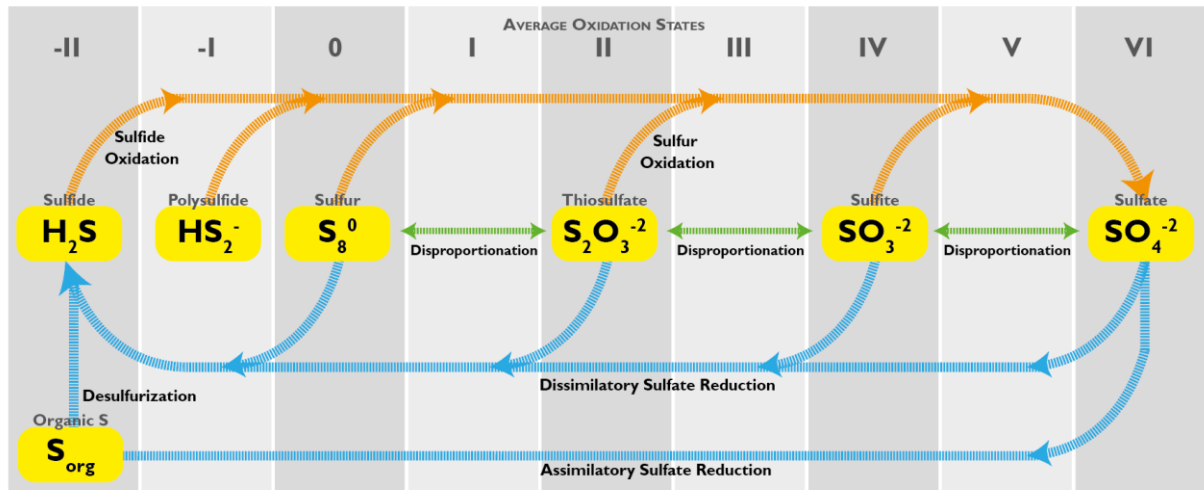
heterótrofos obtêm seu carbono e energia da matéria orgânica, os quimiolitotróficos e fotoautotróficos usam energia para fixar o carbono de fontes inorgânicas, como por exemplo, CO_2 (NEWSOME; FALAGÁN, 2021). Embora a redução e a oxidação de metais microbianos possam afetar claramente o comportamento do metal nos resíduos da mina, mesmo o simples metabolismo do carbono orgânico por heterótrofos aeróbicos pode afetar a mobilidade do metal. Por exemplo, a mineralização do carbono orgânico gera ácidos orgânicos que são eventualmente decompostos em CO_2 , processo que aumenta a acidez, podendo fazer com que os metais se dissolvam dos minerais. Os minerais de carbonato de cálcio são particularmente suscetíveis ao ataque ácido. Acoplada ao metabolismo do carbono orgânico está a respiração do O_2 , que sob condições de difusão limitada faz com que o potencial redox diminua, levando a condições subóxicas ou anóxicas e potencialmente alterando a solubilidade dos minerais óxidos metálicos (LEVICÁN et al., 2008).

Além de exigir energia e carbono para crescer, os micro-organismos precisam de nutrientes essenciais como nitrogênio, fósforo, enxofre. Os ciclos biogeoquímicos desses elementos são cruciais para toda a vida na Terra. A atividade microbiana em resíduos de minas pode ser limitada pela disponibilidade desses nutrientes essenciais (CRAW; RUFAUT, 2017; RASHID et al., 2016). Os mecanismos usados pelos micro-organismos para obter nutrientes essenciais também podem afetar o comportamento do metal nos resíduos da mina, por exemplo, a secreção de agentes quelantes. Embora os micro-organismos tenham uma série de mecanismos para lidar com a toxicidade do metal, a contaminação do metal pode afetar o funcionamento do solo, afetando negativamente a atividade microbiana. A evidência disso é obtida medindo-se as atividades enzimáticas do solo, juntamente com biomassa microbiana diversidade basal e taxas de respiração do substrato (ALKORTA et al., 2003).

1.3.1 Via metabólica do enxofre

O enxofre é um dos elementos mais abundantes na Terra, e apresenta uma enorme relevância nos ambientes de mineração que envolvem metais sulfetados. Praticamente todo processo de formação de DAM está envolvido com as mudanças químicas do enxofre, que apresenta diferentes estados de oxidação (de -II a +VI) e formas químicas (aminoácido, sulfeto, sulfato, etc.) no meio ambiente (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014). Nesta revisão serão descritos os processos biológicos dissimilatórios (oxidação, redução e desproporção) e assimilatórios do enxofre (Figura 2).

Figura 2 - Transformação do enxofre por meio de vias metabólicas mediadas por micro-organismos, considerando diferentes estados de oxidação, ocorrendo entre formas inorgânicas de enxofre, convertidas em enxofre orgânico



As setas laranjas indicam reações de oxidação, as azuis indicam redução, e as verdes representam processos de desproporção. Adaptado de Sánchez-Andrea et al., (2014).

1.3.1.1 Processos de enxofre dissimilatórios

O processo dissimilatório do enxofre é um dos primeiros metabolismos energéticos ocorridos na Terra (SHEN; BUICK; CANFIELD, 2001), que altera o estado de valência do enxofre para captação de energia e desempenha um papel crítico no seu ciclo biogeoquímico. Com base nas mudanças nos estados de oxidação, os processos dissimilatórios de enxofre podem ser agrupados em oxidação de enxofre, redução de enxofre e desproporção de enxofre (FIKE; BRADLEY; ROSE, 2015; WU et al., 2021).

1.3.1.1.1 Oxidação

Os micro-organismos oxidantes de enxofre empregam uma ampla gama de genes para mediar a oxidação de sulfeto, enxofre, sulfeto e tiosulfato conservando energia para o crescimento celular (WU et al., 2021). O agrupamento de genes oxidantes de enxofre (*sox*) é o mais estudado, e compreende um cluster de genes *sox* composto por 15 genes. Destes, sete genes estruturais (*soxXYZABCD*) codificam quatro proteínas e complexos (*SoxXA*, *SoxYZ*, *SoxB* e *SoxCD*) que realizam a redução do citocromo c dependente de tiosulfato, sulfeto, enxofre e sulfeto (FRIEDRICH et al., 2001). A desidrogenase de enxofre *SoxCD* como uma subunidade chave do complexo *Sox* é um heterotetrâmero $\alpha_2\beta_2$ e medeia um processo único de transferência

oxidativa de seis elétrons (FRIEDRICH et al., 2005). Consequentemente, a conversão catalisada pelo complexo *Sox* de tiosulfato em sulfato libera oito elétrons, e os elétrons liberados diminuem para dois ao balancear com o *SoxCD*. *SoxB* é essencial para a oxidação de sulfeto e tiosulfato, dos quais o gene codificador *soxB* tem sido amplamente utilizado como um gene marcador filogenético para micro-organismos oxidantes de enxofre (MOE) (TOURNA et al., 2014). No entanto, cada um dos *SoxXA*, *SoxYZ*, *SoxB* e *SoxCD* sozinho é cataliticamente inativo (WU et al., 2021). Alguns MOEs da classe gammaproteobacteriana possuem um sistema *Sox* incompleto, e realizam a oxidação do enxofre de valência zero usando a via *dsr* reversa, comum em MOEs anaeróbios (TSALLAGOV et al., 2019). Além do cluster de genes *sox*, MOEs podem empregar outros genes para mediar a oxidação de sulfeto a sulfato, uma vez que é um processo energeticamente favorável. Por exemplo, a sulfeto desidrogenase *sorAB* (KAPPLER, 2011), a sulfeto desidrogenase solúvel *SorT* (HSIAO et al., 2018) e a sulfeto desidrogenase *soe* (BOUGHANEMI et al., 2020), bem como a oxidação indireta de sulfeto a sulfato sob a mediação de adenilsulfato (APS) redutase e ATP sulfurilase (KAPPLER, 2011).

Além das oxidases sulfúricas, outros mecanismos catalisam a oxidação de sulfeto a enxofre em MOEs fototróficos e quimiotróficos, a citar o flavocitocromo *c* sulfeto desidrogenase e sulfeto-quinona oxidoreductase (*sqr*) (CHAN; MORGAN-KISS; HANSON, 2009; DUZS et al., 2018; FRIEDRICH et al., 2001). Outra via de oxidação de enxofre dissimilatória é o complexo enzimático do tipo *hdr* (heterodissulfeto redutase) que pode catalisar a oxidação de enxofre a sulfeto (KOCH; DAHL, 2018). O genes do grupo *dsr* também participam da oxidação dissimilatória do enxofre, onde *dsrS* é essencial para a oxidação do enxofre armazenado intracelularmente como intermediário obrigatório durante a oxidação de sulfeto e tiosulfato (GRIMM; FRANZ; DAHL, 2011). Além disso, *dsrAB* reversos também foram detectados em MOEs de vida livre do filo Proteobacteria (MÜLLER et al., 2015). A assinatura dos genes oxidantes de enxofre e os genes *soxB*, *dsr* e *sqr* são usados como marcadores genéticos para identificar MOEs em amostras ambientais (LUO; LIN; GUO, 2011).

1.3.1.1.2 Redução

A redução de sulfato geralmente ocorre em ambientes com baixo potencial redox, onde oxigênio, nitrato e metais oxidados são menos concentrados. No processo de redução do sulfato, micro-organismos redutores de enxofre (MREs) utilizam moléculas de sulfato como aceptores de elétrons. Estes elétrons são provenientes de diversos doadores como por exemplo,

hidrogênio, metanol, etanol, ácidos graxos voláteis, açúcares e até metano (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007).

O primeiro passo na redução de sulfato é transporte para o interior da célula, que é também considerado um passo limitante para o processo (WU et al., 2021). O sulfato é transportado através da membrana citoplasmática por meio de transportadores do tipo cassete de ligação de ATP (ABC) (família *Sult*) ou transportadores do tipo superfamília facilitadora principal (*SulP*) (KERTESZ, 2001). Outros transportadores do tipo *CysP*, *DASS* e *CysZ* também foram identificados como envolvidos na captação de sulfato em MREs (MARIETOU et al., 2018). Dentro das células dos MREs, o sulfato precisa primeiro ser ativado pela ATP sulfurilase (codificado por *sat*) para APS, então, a APS redutase codificada por *apsAB* catalisa a redução de APS a sulfito (DEPLANCKE et al., 2000).

Os genes que codificam a redutase de sulfito dissimilatória (*Dsr*) são genes de "assinatura" em MREs (MÜLLER et al., 2015; SANTOS et al., 2015; WU et al., 2021), os quais são composto por *dsrA*, *dsrB* e *dsrC*. O sulfito é ligado ao sítio ativo de *DsrAB* e reduzido ao intermediário de enxofre de valência zero S(0) ligado a *DsrC* por meio de transferências de quatro elétrons. Então, o trissulfeto ligado a *DsrC* se desprende de *DsrAB*, e o intermediário S(0) é ainda reduzido a sulfeto pelo complexo de membrana *DsrMKJOP*. Ao mesmo tempo, *DsrC* é liberado do processo de redução de sulfito e reciclado (SANTOS et al., 2015).

Além dos genes canônicos de redução dissimilatória de sulfato (genes *dsr*), há uma variedade de outros genes envolvidos na redução do enxofre. O cluster de genes *psrABC* (polissulfeto redutase codificada) regulado por um regulador global *Crp*, foi relatado em *Shewanella oneidensis* como um mediador na redução de tiosulfato em polissulfeto (WU et al., 2015). As enzimas do citocromo sulfito redutases *Mcc/Sir* permitem que várias linhagens bacterianas de Proteobacteria realizem respiração anaeróbica de sulfito (KERN; KLOTZ; SIMON, 2011). O gene tiosulfato redutase (*phsABC*) em *Salmonella enterica* foi relatado para reduzir o tiosulfato em sulfeto (BANG; CLARK; KEASLING, 2000). Também foram relatados genes de redução de oxissulfeto, como a tetrionato redutase e a tetrionato redutase bifuncional/tiosulfato desidrogenase *TsdA* (JENNER et al., 2019). Foi descoberto em uma archaea o gene *Sre* que codifica uma redutase de enxofre que pode usar H₂ para reduzir o enxofre (LIU; BEER; WHITMAN, 2012). Em outra archaea, foram relatados dois genes (*ShyCBDA/SuDH*) que codificam duas hidrogenases produtoras de H₂ com capacidade de reduzir enxofre a sulfeto usando NADPH como um doador de elétrons (MA; WEISS; ADAMS, 2000).

1.3.1.1.3 Desproporção

A desproporção é um processo no qual o enxofre, tiosulfato e sulfito atuam como doadores e aceptores de elétrons e geram sulfeto e sulfato como produtos finais. Várias enzimas de redução de sulfato foram identificadas como envolvidas na desproporção de enxofre, enquanto genes que codificam enzimas de oxidação de enxofre também são encontrados em genomas de bactérias desproporcionadoras de enxofre (FINSTER et al., 2013). Em *Shewanella oneidensis* foi identificado o papel de *PsrA* na desproporção de tiosulfato (BURNS; DICHRISTINA, 2009). Em contraste, a desproporção de enxofre elementar é endergônica sob condições padrão, e o sulfeto produzido deve ser eliminado por óxidos metálicos para mantê-lo em baixa concentração e tornar esse processo de desproporção termodinamicamente favorável (WU et al., 2021). Em *Desulfurivibrio alkaliphilus*, a oxidação de sulfeto apresenta alto nível de expressão de genes que codificam um *dsr* do tipo redutivo e *DsrC* em condição desproporcional, sugerindo seu papel fundamental na desproporção de enxofre (THORUP et al., 2017). Todos esses achados são obtidos a partir de cepas cultivadas de dissimilação de enxofre, mas nenhum gene funcional específico está disponível como biomarcador filogenético de micro-organismos desproporcionais de enxofre.

1.3.1.2 Processos assimilatórios de enxofre

O metabolismo assimilatório do enxofre é uma parte anabólica essencial das células microbianas, uma vez que o enxofre é necessário para ser assimilado em compostos orgânicos como blocos de construção celular, por exemplo, aminoácidos (Cys e Met), oligopeptídeos (glutathiona/GSH), vitaminas (biotina e tiamina) e cofatores (CoA) (SAITO, 2004; WU et al., 2021). Cys é o composto central para a assimilação de enxofre e a consequente geração de uma variedade de metabólitos a jusante, como Met e GSH. A maioria dos micro-organismos convertem compostos de enxofre ambientais (por exemplo, sulfato e tiosulfato) em HS^- através da via de adenosina 3'-fosfato-5'-fosfosulfato (COOPER, 1983) e, em seguida, sintetizar Cys com enzimas chave O-acetil-l-serina sulfidrilase (*CysK*) ou O-acetil-l-serina sulfidrilase B (*CysM*) (KAWANO et al., 2017).

1.3.2 Ferro

O ferro é encontrado em dois estados de valência como ferro férrico oxidado Fe(III) e ferro ferroso reduzido Fe(II). Além disso, pode adotar diferentes estados de spin (alto ou baixo) tanto na forma férrica quanto na ferrosa, dependendo do ambiente do ligante. O ferro participa de muitos processos biológicos importantes, como fotossíntese, fixação de N₂, metanogênese, produção e consumo de H₂, respiração, ciclo do ácido tricloroacético (TCA), transporte de oxigênio, regulação gênica e biossíntese de DNA (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003). Sua funcionalidade biológica é quase inteiramente dependente de sua incorporação em proteínas, seja como uma espécie mono ou binuclear, ou em uma forma mais complexa como parte de aglomerados de ferro-enxofre ou grupos heme. A inserção de ferro em proteínas permite que seu ambiente local seja “controlado” de modo que o ferro possa adotar o potencial redox necessário (variando de -300 a +700 mV), geometria e estado de spin necessários para cumprir sua função biológica designada (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003). O ferro é essencial para a maioria dos seres vivos, mas pode ser tóxico em algumas condições de aerobiose e em altas concentrações. Assim, para alcançar a homeostase eficaz do ferro, os organismos devem equilibrar sua necessidade de eliminar eficientemente o ferro do ambiente para garantir que os suprimentos adequados sejam mantidos, com o gerenciamento cuidadoso dos níveis de ferro livre celular para se proteger contra a toxicidade induzida pelo ferro (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003; TOUATI, 2000). Além das reações bióticas, várias reações abióticas ocorrem dependendo das condições termodinâmicas e cinéticas. Devido a reações redox, pode ocorrer dissolução e precipitação de minerais contendo ferro, o que tem grande influência no comportamento de sorção/dessorção e co-precipitação/liberação de vários componentes, como fosfato e traços de metais (HAESE, 2006).

A regulação da assimilação do ferro é complexa e envolve mecanismos que atuam paralelamente ou hierarquicamente. O controlador principal em bactérias gram-negativas e gram-positivas é a proteína FUR (*ferric uptake regulator*) que regula a expressão de genes em resposta à suficiência ou insuficiência de ferro (SANDY; BUTLER, 2009). Quando o ferro se encontra em situação de suficiência, ele se liga à FUR, reprimindo a transcrição destes genes. Mais de 90 genes são controlados por FUR. Em geral, os produtos destes genes atuam em processos relacionados com a aquisição de ferro como a biossíntese e o transporte do heme, e a produção de proteínas armazenadoras. O gene *fur* forma um operon com *fldA*, cujo produto é

uma flavoproteína que tem a função de manter o ferro reduzido, para a ação regulatória de FUR (FILLAT, 2014). O gene *fur* é autorregulado através de uma caixa *fur* que se situa entre ele e *fldA*; também pode ser induzido, em stress oxidativo pelo H_2O_2 , por *OxyR*, através de um promotor próprio (FILLAT, 2014). Além disso, o operon inteiro pode ser induzido, em stress oxidativo devido ao superóxido, por *SoxRS*. Estas respostas ao stress oxidativo resultam na ligação de FUR ao ferro, reduzindo a concentração deste elemento e, conseqüentemente, a sua toxicidade (TOUATI, 2000).

Muitos genes são regulados indiretamente por FUR, através do sRNA (*small RNA*) de 90 nucleotídeos chamado *RyhB*. A produção deste sRNA ocorre na ausência de ferro; em suficiência, Fe(II)-FUR inibe a expressão do gene *ryhB* que o codifica (CHAREYRE; MANDIN, 2018). *RyhB* regula, em nível de tradução, a expressão de mais de 50 genes envolvidos com a aquisição e uso do ferro. Isto tem o efeito de poupar este nutriente na sua falta, se manifestando de três maneiras: 1) na limitação da produção de proteínas que requerem o ferro, como enzimas do ciclo de Krebs e componentes da cadeia respiratória; 2) na coordenação entre os sistemas responsáveis pela gênese de grupos de Fe-S, sendo *Isc* substituído por *Suf*; 3) no aumento da produção de sideróforos (CHAREYRE; MANDIN, 2018).

Além do controle global por FUR, outros mecanismos regulam processos específicos do metabolismo do ferro. O sistema *Feo* de transporte do Fe(II), por exemplo, é ativado em anaerobiose (ONG; WALKER; MCEWAN, 2015). Isto reflete uma maior disponibilidade da forma reduzida do ferro na ausência do oxigênio. As proteínas que realizam o transporte de citrato férrico são codificadas pelos genes *fecIR-fecABCDE*. Além de ser reprimido por Fe(II)-FUR, este conjunto de genes é ativado pelo sistema regulatório *FecIR*, em resposta à presença de citrato férrico (KREWULAK; VOGEL, 2008).

A gênese de grupos Fe-S também é regulada por um sistema mais específico, que está sujeito aos controles globais descritos. Neste sistema específico atua o regulador transcricional *IscR*, uma proteína de ferro e enxofre codificada pelo operon *iscRSUA*. Na sua forma madura contendo o seu cofator de Fe-S, *FscR* atua inibindo a expressão do operon *iscRSUA*. Por outro lado, na forma imatura sem o seu cofator, *IscR* regula positivamente o operon *sufABCDSE*.

1.3.2.1 Oxidação do Ferro

O íon ferroso pode ser oxidado por vários tipos de micro-organismos. Bactérias e arqueas litotróficas podem utilizar o Fe(II) como fonte de energia e de poder redutor. Estes procariotos podem ser separados em dois grupos. O primeiro contém espécies acidófilas pertencentes a gêneros como *Acidithiobacillus* (Proteobacteria), *Leptospirillum* (Nitrospirae) e *Ferroglobus* (Euryarchaeota) que vivem em ambientes ácidos como a DAM (EMERSON; FLEMING; MCBETH, 2010). O segundo grupo compreende bactérias neutrófilas que oxidam o Fe(II) em pH neutro. Estas bactérias pertencem às classes Betaproteobacteria e Zetaproteobacteria, e incluem os gêneros *Gallionella* e *Mariprofundis*; vivem em ambientes de água doce, como córregos e aquíferos, e marinhos, especialmente em fontes termais submarinas (EMERSON; FLEMING; MCBETH, 2010).

Micro-organismos oxidantes de ferro ganham energia oxidando Fe(II) em Fe(III), mesmo sob condições onde a oxidação química de Fe(II) é muito rápida, por exemplo, em águas oxigenadas com pH próximo de neutro (HEDRICH; SCHLÖMANN; BARRIE JOHNSON, 2011; ILBERT; BONNEFOY, 2013; NEUBAUER; EMERSON; MEGONIGAL, 2002). Em pH próximo a 7, com vários aceptores potenciais de elétrons como oxigênio, alguns procariontes acoplam a oxidação de Fe(II) à redução de nitrato e são capazes de oxidar Fe(II) sob condições microaerofílicas ou anóxicas (HEDRICH; SCHLÖMANN; BARRIE JOHNSON, 2011). A oxidação dissimilatória do Fe(II) é realizada por bactérias e archaea; alguns são capazes de fixar CO₂ através da enzima *RuBP*, outros precisam da presença de carbono orgânico para crescer (HEDRICH; SCHLÖMANN; BARRIE JOHNSON, 2011; ILBERT; BONNEFOY, 2013).

Em pH baixo (<4) comumente encontrados em resíduos de DAM, a oxidação química do Fe(II) pelo oxigênio ocorre muito lentamente. No entanto, em ambientes de pH tão baixo, a taxa de oxidação do Fe(II) realmente aumenta com a diminuição do pH, demonstrando a contribuição significativa da oxidação microbiana do Fe(II) para a formação de DAM (LARSON et al., 2014). O potencial redox do par O₂ e H₂O torna o oxigênio o aceptor de elétrons mais favorável para oxidar Fe(II) em pH baixo (HEDRICH; SCHLÖMANN; BARRIE JOHNSON, 2011). As vias de oxidação do ferro são bem estudadas e resumidas em (ILBERT; BONNEFOY, 2013). Em bactérias acidófilas como por exemplo, em *Acidithiobacillus ferrooxidans*, os sistemas de oxidação do ferro envolvem: vários citocromos que conduzem elétrons do Fe(II) localizado fora da célula para o aceptor de elétrons localizado no interior,

uma citocromo oxidase que reduz o aceptor de elétrons (ou seja, oxigênio), um ferro de alto potencial, proteína de enxofre (HiPIP) e uma rusticianina (Figura 3). Em archaea acidofílica, as vias diferem daquelas encontradas em bactérias acidofílicas e incluem diferentes citocromos, HiPIP, proteínas de cobre e oxidases (ILBERT; BONNEFOY, 2013).

Figura 3 - Cadeias de transporte de elétrons de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, levando em consideração uma sequência de reações de oxidação-redução.

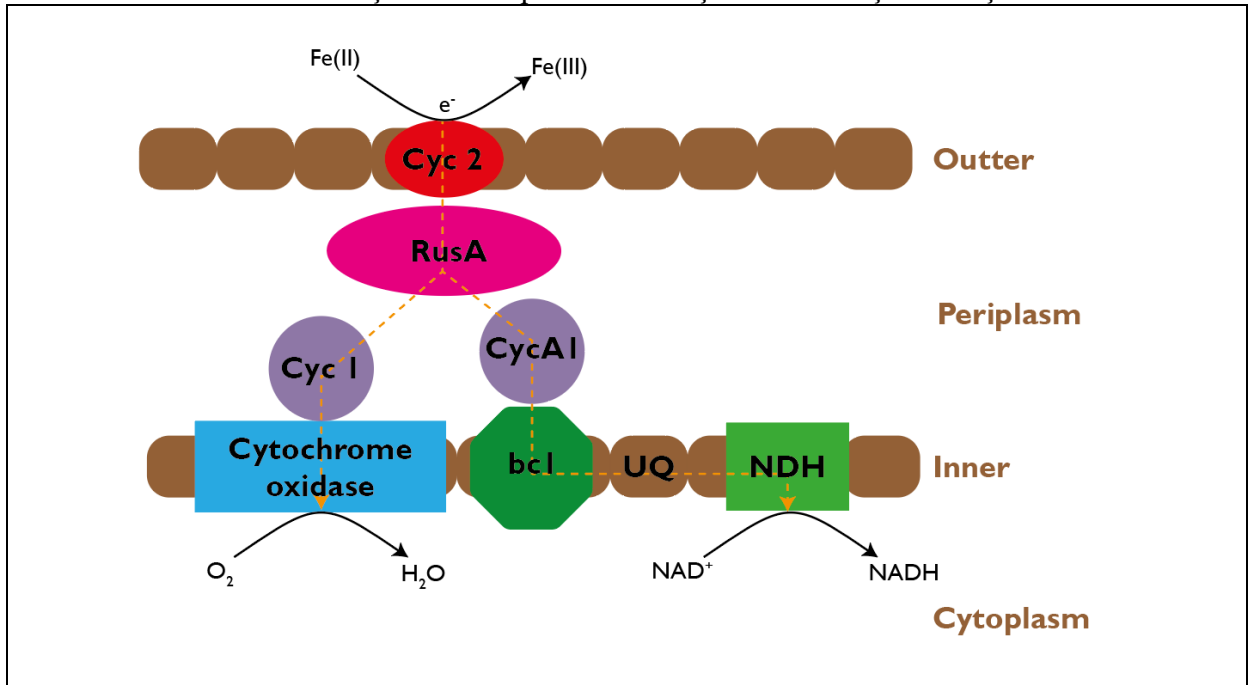


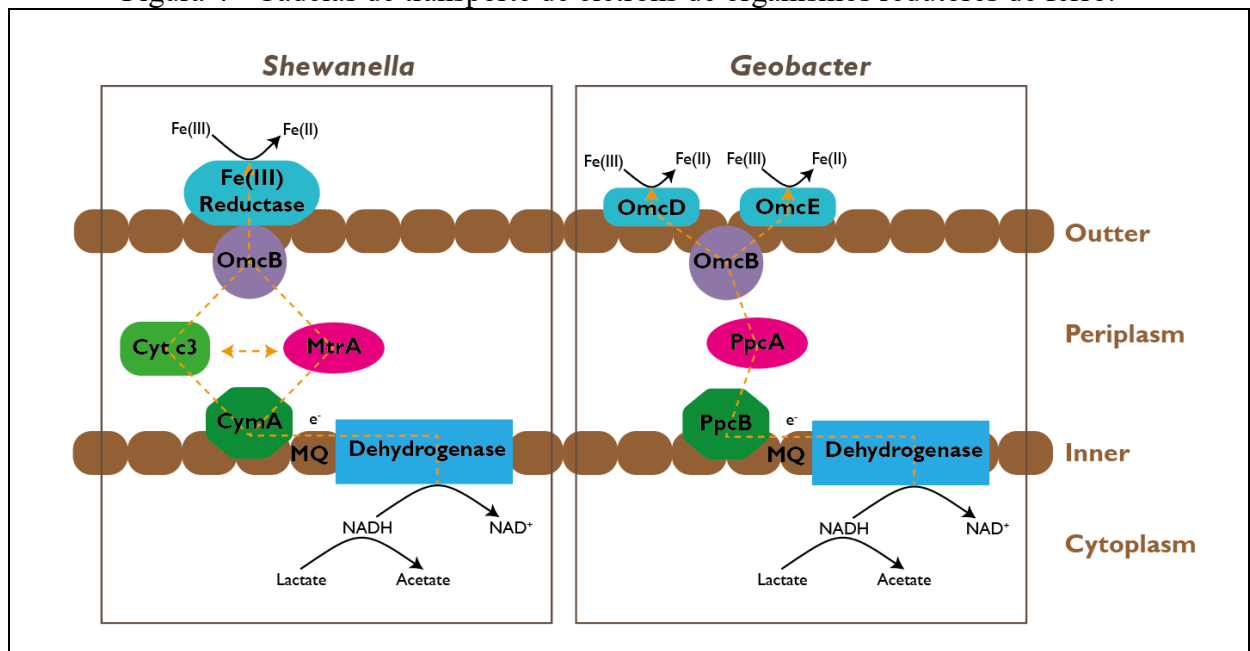
Figura adaptada de Ilbert e Bonnefoy (2013). Cyc2: outer membrane embedded cytochrome c Cyc2; CycA1: membrane-bound cytochrome c CycA1; Cyc1: membrane-bound cytochrome c Cyc1; RusA: protein rusticyanin; bc1: cytoplasmic membrane bc1; and UQ: ubiquinone.

1.3.2.2 Redução Dissimilativa do Ferro

O íon férrico, assim como as formas oxidadas do enxofre e do nitrogênio, pode ser utilizado como aceptor final de elétrons em processos respiratórios anaeróbios. A redução microbiana dissimilatória de Fe(III) é uma via respiratória ubíqua no ambiente e é realizada por uma gama filogeneticamente diversa de bactérias e arqueas (LOVLEY, 2006), chamados de micro-organismos redutores de metais. Requer um doador de elétrons que pode ser H₂, ou produtos de fermentação de matéria orgânica sedimentar, por exemplo, ácidos orgânicos simples como acetato (LOVLEY; HOLMES; NEVIN, 2004). O produto Fe(II) pode ser solúvel, sorver em superfícies ou formar minerais como a magnetita (Fe₃O₄) (LOVLEY et al., 1987). Micro-organismos redutores de metal podem ser anaeróbios facultativos (por exemplo, *Shewanella* spp.) que também podem crescer com aceptores alternativos de elétrons, como oxigênio ou nitrato, ou ser anaeróbios obrigatórios (como *Geobacter* spp.).

Em *Shewanella*, os elétrons entram na cadeia respiratória pela menaquinona (MQ) ou NADH desidrogenase (NDH). Destas moléculas, os elétrons são passados ao citocromo c tetraheme CymA, localizado na membrana citoplasmática (SCHWALB; CHAPMAN; REID, 2003). De CymA, os elétrons passam para os carreadores periplasmáticos Citocromo C₃ e *MtrA* (GORDON et al., 2000). Este último pode reduzir formas solúveis de ferro presentes no próprio periplasma. Alternativamente, ambos os carreadores, Citocromo C₃ e *MtrA*, podem transferir os elétrons para duas proteínas da membrana externa, *OmcB* e uma ferro redutase; ambas irão possivelmente atuar reduzindo minerais de Fe(III) (Figura 4) (LIES et al., 2005).

Figura 4 - Cadeias de transporte de elétrons de organismos redutores de ferro.



OmcB: outer membrane complex protein *OmcB*; Cyt c3: Cytochrome-C3; Mtr A: decaheme c-type cytochrome *MtrA*; Cym A: cytochrome-c tetraheme *CymA*; *OmcD*: outer membrane complex protein *OmcD*; *OmcE*: outer membrane complex protein *OmcE*; *PpcA*: cytochrome c 3 heme-binding sites *PpcA*; *PpcB*: cytochrome c 3 heme-binding sites *PpcB*; And MQ: menaquinone.

Em *Geobacter*, os elétrons são transferidos de uma NDH via MQ, ambos na membrana citoplasmática, para um citocromo periplasmático *MacA* (DANTAS et al., 2017). Deste carreador, ou a partir da MQ, os elétrons passam através de *PpcA*, outro carreador periplasmático, para proteínas de membrana externa como *OmcB*, *OmcE* e *OmcS*, que reduzem diferentes formas de ferro, queladas ou insolúveis (Figura 4) (DANTAS et al., 2017; HERNÁNDEZ-ELIGIO et al., 2020; LIU et al., 2015). Estas reduções podem envolver pili como condutores de elétrons, especialmente no caso da utilização de óxidos de ferro como

aceptores finais. Destaca-se que estes modelos de cadeias respiratórias são propostos e não ainda estabelecidos de maneira definitiva.

Nas condições de pH quase neutras comumente encontradas na maioria dos ambientes, os minerais óxidos de Fe(III) são insolúveis, portanto, os micro-organismos redutores de metais devem ser capazes de transferir elétrons para fases sólidas por meio de mecanismos extracelulares de transporte de elétrons. Estes incluem contato físico direto entre o mineral e citocromos do tipo *c* na membrana celular ou nanofios (MALVANKAR; TUOMINEN; LOVLEY, 2012; PIRBADIAN et al., 2014; YALCIN; MALVANKAR, 2020), ou secreção de transporte de elétrons extracelular (VON CANSTEIN et al., 2008). Sob condições ácidas encontradas em muitos resíduos de DAM, altas concentrações de Fe(III) estão presentes em solução, e micro-organismos acidófilos como *A. ferrooxidans* podem crescer reduzindo Fe(III) aquoso a Fe(II) acoplado à oxidação de H₂ ou S(0), novamente com citocromos tipo *c* implicados (DAS; MISHRA; ROY, 1992; OHMURA et al., 2002).

1.3.2.3 Biomineralização do Ferro

Como resultado da atividade microbiana, uma grande variedade de minerais de ferro pode ser formada (KONHAUSER, 1998). Existem dois mecanismos de mineralização associados com os micro-organismos, a mineralização biologicamente induzida e a biologicamente controlada. No processo de biomineralização induzida, a produção está associado com a liberação de metabólitos, íons ou com a formação de estruturas carregadas que atuam induzindo a formação do mineral. Este parece ser o mecanismo dominante e ocorre em duas etapas. Na primeira, o metal em solução reage com um grupo químico da célula. Em seguida, a energia de ativação necessária à nucleação é reduzida pelo metal, na superfície celular, e mais compostos solúveis são produzidos. Minerais formados desta maneira incluem óxidos e hidróxidos de ferro, silicatos e sulfatos.

No mecanismo de mineralização microbiana biologicamente controlado, o micro-organismo dita todo o processo de formação dos minerais, que ocorre no interior da célula. Um exemplo deste processo é a formação de magnetita em magnetossomas, estruturas utilizadas por certas bactérias para a sua orientação através do campo geomagnético da Terra. As magnetossomas são inclusões que permitem às bactérias se alinharem com o campo geomagnético terrestre e, por aerotaxia e/ou quimiotaxia, procurem locais mais favoráveis ao crescimento, em um processo chamado de magnetotaxia (SCHEFFEL; SCHÜLER, 2006). Para estas bactérias, que são microaerófilas ou anaeróbias obrigatórias, estes locais se encontram

logo abaixo da zona de transição entre os ambientes óxicos e anóxicos. Entretanto, apesar da teoria de magnetotaxia ser a mais aceita, outras funções foram propostas para as magnetossomas, como, por exemplo, a prevenção da toxicidade do ferro. De acordo com isto e com o ambiente de crescimento das bactérias magnetotáticas, a expressão dos genes que codificam as proteínas envolvidas na produção de magnetossomas é aumentada na presença de ferro e em condições microaerófilas (SCHEFFEL; SCHÜLER, 2006). Algumas proteínas, como *MamE* e *MamO*, podem atuar no processamento e endereçamento de outras proteínas necessárias à formação das inclusões (MATSUNAGA et al., 2005).

1.3.3 Via metabólica do carbono

Os micro-organismos autotróficos utilizam a energia e o poder redutor derivados da oxidação do enxofre e/ou ferro para diversos processos metabólicos, incluindo fixação de CO₂ e aquisição de diversas fontes de nitrogênio (LEVICÁN et al., 2008). Em ambientes ácidos de biolixiviação, o carbono inorgânico dissolvido pode atingir níveis abaixo da média das concentrações atmosféricas. Portanto, alguns organismos que habitam estes locais possuem mecanismos para armazenar o CO₂ existente (DOBRINSKI; LONGO; SCOTT, 2005). As vias mais comuns de fixação de CO₂ utilizadas por micro-organismos que habitam ambientes de DAM são, o ciclo de Calvin-benson-Bassham (CBB), ciclo redutivo do ácido tricarbóxico (rTCA), ciclo 3-hidroxi-propionato/4-hidroxi-butirato (3HP/4HB) e a via Wood-Ljungdahl (WL).

O ciclo CBB é o mais comumente encontrado, e o micro-organismo modelo de estudo é o *Acidithiobacillus ferrooxidans* que cresce na presença de enxofre utilizando ferro férrico como oxidante (CÁRDENAS et al., 2010). Já o micro-organismo *Leptospirillum ferrooxidans*, que é um quimiolitotrófico autotrófico obrigatório, oxidante de sulfeto, utiliza a via rTCA (GOLTSMAN et al., 2009). Muitos micro-organismos encontrados em ambientes de drenagem ácida de mina pertencem ao grupo Archaea, o qual foi relatado o termofílico *Sulfolobales* que utiliza o ciclo 3HP/4HB para fixar carbono (HÜGLER; SIEVERT, 2011; LEVICÁN et al., 2008). No ciclo 3-hidroxi-propionato/4-hidroxi-butirato (3HP/4HB), a enzima chave é a acetil CoA carboxilase (*accC*), a qual está presente em *Sulfolobales* (MONTROYA et al., 2012). A bactéria *Desulfotomaculum acetoxidans*, utiliza a via redutiva WL para fixar CO₂ (LEVICÁN et al., 2008). Na via Acetil-CoA também conhecida por via Wood-Ljungdahl, a enzima chave é CO desidrogenase/acetil-CoA sintase (*cdh/acs*) (MONTROYA et al., 2012).

1.3.3.1 Fixação de carbono pelo ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB)

O ciclo de CBB é composto por 13 reações enzimáticas, das quais 12 estão envolvidas na regeneração da ribulose 1,5-bifosfato (RuBP) e uma é responsável pela fixação de CO₂ catalisada pela ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) (LEVICÁN et al., 2008). As principais enzimas de fixação de CO₂ no ciclo CBB são Rubisco, Fosforibuloquinase (PRK) e Sedoheptulose 1,7-bisfosfatase (SBP)(SHIVELY; VAN KEULEN; MEIJER, 1998), sendo que a Rubisco codificada por *cbb* é a enzima chave (MONTROYA et al., 2012). Foi relatado formas canônicas de Rubisco codificadas no genoma da espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans*, onde foram identificadas duas cópias do gene que codifica a forma Rubisco I (*cbbSL1* e *cbbSL2*) e uma cópia que codifica a forma II da Rubisco (*cbbM*) (LEVICÁN et al., 2008). *CbbR* é um regulador positivo do operon *cbb* que coordena a expressão de três genes da Rubisco (TOYODA et al., 2005). É provável que a presença de múltiplas formas e cópias de genes de Rubisco e um sistema de expressão controlado de Rubisco permita que essa bactéria responda rapidamente a mudanças ambientais nas concentrações de CO₂/O₂ (LEVICÁN et al., 2008).

1.3.3.2 Fixação de carbono pelo ciclo redutivo do ácido tricarboxílico (rTCA)

O ciclo rTCA ou também conhecido como Ciclo Arnon-Buchanan, é essencialmente o ciclo do ácido tricarboxílico em sentido inverso, que leva a fixação de duas moléculas de CO₂ à produção de uma molécula de acetil-CoA. O acetil-CoA formado é então reduzido por carboxilação a piruvato, a partir do qual todos os outros metabólitos centrais podem ser formados. As quatro principais enzimas que possibilitam a reversão do ciclo do TCA e a formação de piruvato são ATP citrato liase (ACL), fumarato redutase, 2-oxoglutarato ferredoxina oxidorredutase e piruvato ferredoxina oxidorredutase (CAMPBELL; GARY, 2004). Sendo que a enzima chave para o processo é a ATP citrato liase (MONTROYA et al., 2012).

Uma reação importante no metabolismo do carbono é a condensação de acetil-CoA e oxaloacetato em citrato através do ciclo TCA. Esta reação é catalisada pela citrato sintase; entretanto, no caso do ciclo rTCA, a reação inversa é catalisada pela ACL. ACL é uma enzima chave do ciclo rTCA e é exclusiva dos organismos que utilizam o ciclo rTCA. O piruvato produzido a partir do ciclo RTCA é direcionado para a gliconeogênese para a biossíntese de várias moléculas intermediárias carbonatadas exigidas pela célula. A conversão anabólica de

piruvato em fosfoenolpiruvato (PEP) é tipicamente catalisada pela fosfoenolpiruvato sintetase (PEPS), enquanto a conversão catabólica de PEP em piruvato é catalisada pela piruvato quinase (PK). A ação combinada e coordenada de PEPS e PK permite que a célula controle a interconversão de piruvato e fosfoenolpiruvato de acordo com suas necessidades metabólicas (LEVICÁN et al., 2008). Além disso, em vários organismos, incluindo bactérias e archaea, a fosfoenolpiruvato diquinase foi relatada para interconversão desses metabólitos (LEVICÁN et al., 2008; TJADEN et al., 2006).

1.3.3.3 Mecanismos moleculares envolvidos na concentração de CO₂

Mecanismos de concentração de carbono estão presentes em muitas espécies de bactérias quimiolitotróficas, permitindo que elas cresçam na presença de baixas concentrações de CO₂. Eles utilizam principalmente transportadores de bicarbonato e mecanismos de retenção de CO₂ para gerar altas concentrações intracelulares de carbono inorgânico dissolvido (LEVICÁN et al., 2008). Os transportadores de carbono inorgânico que fornecem HCO₃⁻-intracelular representam um importante mecanismo de concentração de carbono nas cianobactérias (BADGER; PRICE, 2003). O carboxissomo é um microcompartimento poliédrico localizado no citoplasma da maioria das bactérias autotróficas e é cercado por uma monocamada proteica que supostamente contém Rubisco e anidrase carbônica (BADGER; PRICE, 2003). A anidrase carbônica converte o HCO₃⁻-citosólico acumulado em CO₂ dentro do carboxissomo, elevando a concentração de CO₂ nas proximidades da Rubisco (PRICE et al., 2004). Da mesma forma, sete genes candidatos potencialmente envolvidos na formação de carboxissomos foram identificados a jusante dos genes *cbbLS1* em *Acidithiobacillus*, o qual é seguido pelo genes *cbbQO*, que estão envolvidos na regulação pós-traducional da Rubisco (CANNON et al., 2003).

1.3.3.4 Produção de metano em ambientes de DAM

Em ambientes de drenagem ácida de mina é comum encontrar micro-organismos capazes de realizar a produção biológica de metano, também chamada de metanogênese. Essa produção é realizada exclusivamente por um grupo de archeas metanogênicas estritamente anaeróbicas. As etapas que levam a transformação de CO₂ para CH₄ formam um conjunto de reações em cascata, que é usado em parte ou em sua totalidade com outros substratos

(DEPPENMEIER; MÜLLER, 2008; LIU; WHITMAN, 2008; THAUER et al., 2008). Essas vias utilizam várias coenzimas incomuns, das quais metanofurano (MF), tetraidrometanopterin, tetraidrosarcinapterin e coenzima M carregam a fração de carbono destinada a gerar metano, enquanto a coenzima F420 (um derivado da deazaflavina), coenzima B (HS-CoB ou HS-HTP), metanofenazina e coenzima F430 (um tetrapirrol) transferem elétrons que são usados na redução de carbono (DEPPENMEIER; MÜLLER, 2008; THAUER et al., 2008). Os substratos diretos para a metanogênese são H₂ mais CO₂, acetato, formiato, metilaminas, metanol, sulfetos de metila e etanol ou um álcool secundário mais CO₂ (PURWANTINI et al., 2014). Em inúmeros nichos anaeróbios na natureza, a metanogênese facilita a mineralização de biopolímeros complexos como carboidratos, lipídios e proteínas gerados por produtores primários. Assim, os metanogênicos são atores críticos no ciclo global do carbono (PURWANTINI et al., 2014).

1.3.4 Via metabólica do nitrogênio

As principais transformações de nitrogênio que ocorrem em locais de DAM incluem a fixação de nitrogênio, amonificação, nitrificação e desnitrificação.

1.3.4.1 Fixação de nitrogênio

Os ambientes de DAM normalmente recebem uma quantidade limitada de carbono e nitrogênio de fontes externas, e portanto, a fixação de CO₂ e N₂ atmosféricos pelos micro-organismos torna-se crucial para manutenção destes nutrientes (MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015; TYSON et al., 2005). A fixação do nitrogênio é, com poucas exceções, mediada pelo complexo enzimático *Mo-Fe* nitrogenase, cuja atividade é sensível à presença de oxigênio. Os componentes estruturais enzimáticos são codificados pelo operon *nif* (genes *nifHDKENX*) (MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015). Os genes que flanqueiam este operon (reguladores, transportadores, sensores de oxigênio/redox) também podem estar envolvidos na fixação de nitrogênio (PARRO; MORENO-PAZ, 2003; TYSON et al., 2005).

Em ambientes de DAM já foram identificadas algumas espécies capazes de fixar N₂ atmosférico: *Acidithiobacillus ferrooxidans* (VALDÉS et al., 2008), *Leptospirillum ferrooxidans* (PARRO; MORENO-PAZ, 2003), *Leptospirillum ferrodiazotrophum* (TYSON et al., 2005) e *Ferrovum myxofaciens* (JOHNSON; HALLBERG; HEDRICH, 2014).

1.3.4.2 Nitrificação

O nitrogênio na forma de amônio pode ser oxidado no processo por nitrificação ou diretamente assimilado na biomassa. Os micro-organismos nitrificadores utilizam oxigênio molecular como acceptor de elétrons terminal, e são conhecidos por serem sensíveis a pH baixo (JIANG; BAKKEN, 1999) devido à falta e/ou toxicidade de substratos nesses valores de pH. Portanto, a ocorrência de nitrificantes em locais de DAM depende estritamente da disponibilidade de O₂. As duas principais enzimas envolvidas na oxidação de amônio são a monooxigenase de amônio codificadas pelo operon *amoCAB* (*AmoA* contém o sítio ativo putativo da enzima) e a hidroxilamina oxidorreductase codificada pelo gene *hao* (MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015).

1.3.4.3 Desnitrificação

Os íons nitrato ou nitrito podem ser usados como aceptores terminais de elétrons em condições anóxicas ou de baixo oxigênio (desnitrificação). Um estudo em sedimentos de riachos ácidos com metais pesados sugeriu que a desnitrificação ocorre e pode reduzir a acidez (BAESEMAN; SMITH; SILVERSTEIN, 2006). A desnitrificação é uma parte ativa e integral do metabolismo geral em sistemas de DAM (XIE et al., 2011).

1.3.4.4 Amonificação

A amonificação ocorre via redução de nitrato seguida de amonificação de nitrito, e as enzimas envolvidas incluem *Nas*, *Nar* e *Nap* (nitrato redutases) e *Nir* e *Nrf* (nitrito redutases). Em ambientes de DAM, a atividade de amonificação foi relacionada com a bactéria *Leptospirillum ferriphilum* “grupo II” com base na observação de uma proteína da família citocromo c *NapC/NirT* envolvida na amonificação respiratória de nitrito (MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015). *Leptospirillum* spp. “grupo II” e “grupo III” possuem genes para uma redutase de nitrito/sulfito, que é necessária para a amonificação assimilatória do nitrito como produto final o amônio, sendo diretamente canalizado para a biossíntese de aminoácidos (GOLTSMAN et al., 2009). Uma vez que o amônio entra nas células, ele é assimilado pela via glutamina sintase/glutamato sintase, que parece estar ausente em *Leptospirillum*, onde a assimilação de

amônio pode ocorrer por via glutamina sintase semelhante à proposta para *A. Ferrooxidans* (TYSON et al., 2005; VALDÉS et al., 2008). A maioria dos membros da comunidade DAM não fixa nitrogênio e deve obtê-lo através da absorção de amônio.

1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A METAIS EM MICRO-ORGANISMOS

Alguns metais são essenciais para o metabolismo dos micro-organismos, mas quando excedem uma certa quantidade podem se tornar tóxicos. Os micro-organismos adquirem os metais por absorção ativa através dos sistemas de transporte de metais ou por difusão passiva através das porinas (MA; JACOBSEN; GIEDROC, 2009). Para elementos essenciais, os micro-organismos equilibram os mecanismos de absorção e efluxo para garantir a homeostase, embora concentrações excessivas possam sobrecarregar a capacidade de efluxo e causar toxicidade. Para metais sem função biológica, os micro-organismos não possuem mecanismos de efluxo específicos para lidar com eles, embora alguns são semelhantes aos metais essenciais para serem transportados para dentro ou fora das células. Os mecanismos de resistência aos metais envolvem a prevenção da absorção de metais do ambiente, ligando metais intracelularmente para diminuir sua toxicidade ou removendo metais indesejados bombeando-os de volta para o ambiente.

A seguir serão abordadas algumas estratégias que os micro-organismos desenvolveram para se adaptarem e sobreviverem em ambientes com altas concentrações de metais. Estas estratégias são os mecanismos de transporte ativo ou efluxo, sideróforos, ligantes de ácidos orgânicos, ligantes fosfatos e carbonatos, produção de substâncias exopoliméricas, metalotioneínas, biossorção de metais e biotransformação de metais tóxicos.

1.4.1 Mecanismos de transporte ativo ou efluxo

O transporte ativo ou sistema de efluxo é responsável pelo mecanismo de resistência e adaptação mais comum e predominante em bactérias na aquisição e homeostase de metais pesados (MAYNAUD et al., 2014). O mecanismo de efluxo corresponde à defesa fundamental contra a toxicidade de metais pesados causando uma diminuição dos potenciais de acumulação e concentração para a desintoxicação celular (LIU et al., 2021b). O sistema de bomba de efluxo são determinantes para a fisiologia da célula bacteriana, patogenicidade e perfis de virulência. A expulsão de metal intracelular estão envolvidas com a imunidade bacteriana, processos de

biorremediação e tolerância e/ou resistência das bactérias (DAVIDSON et al., 2008; MATHIVANAN et al., 2021). Essa expulsão é comumente realizada pelo transportador de efluxo ABC junto com CDF (facilitador de difusão de cátions) e ATPases do tipo P (MATHIVANAN et al., 2021). Em particular, o sistema de efluxo ABC é controlado pela família de proteínas da família de resistência-nodulação-divisão (RND). O sistema de efluxo CDF e ATPases do tipo P estão tipicamente envolvidos na exportação de íons metálicos do citoplasma para o periplasma, enquanto as proteínas transportadoras ABC estão envolvidas no efluxo de íons metálicos do periplasma para a membrana externa (REHAN; S. ALSOHIM, 2019). Além disso, os transportadores ABC em bactérias podem atuar na importação e exportação de substratos, como açúcares, íons e moléculas orgânicas complexas, enfatizando a translocação efetiva. O transportador ABC também pode estar envolvido na expulsão de substâncias tóxicas (antibióticos) das células e também na secreção de várias moléculas, como peptídeos, lipídios, drogas hidrofóbicas, polissacarídeos e proteínas (DAVIDSON et al., 2008).

A ocorrência de mais de um sistema de bomba de efluxo foi relatada em várias cepas de bactérias resistentes a íons metálicos tóxicos (LEGATZKI et al., 2003; VALENCIA et al., 2013). A presença de mais de um mecanismo de efluxo torna a resistência a metais pesados e a tolerância ao estresse mais efetiva no processo de biotransformação bacteriana (MATHIVANAN et al., 2021). Assim, mais de duas bombas de efluxo em bactérias podem conferir resistência a múltiplos metais pesados, que podem ser regulados por uma família de proteínas codificada por genes específicos de cromossomos e plasmídeos. Os sistemas de efluxo de bactérias não são específicos da espécie e dependem do tipo de íons metálicos a serem removidos. A associação de famílias de proteínas na regulação dos mecanismos de efluxo é necessária para uma avaliação aprofundada e corroboração para a desintoxicação estratégica de metais pesados (MATHIVANAN et al., 2021). Assim, qualquer alteração no sistema de efluxo causa impedimentos no transporte ativo de íons metálicos por interação biomolecular afetando a morfologia celular, viabilidade, iniciação do biofilme e mecanismos de virulência (DAVIDSON et al., 2008; MATHIVANAN et al., 2021).

1.4.2 Sideróforos

Os micro-organismos secretam uma grande variedade de compostos quelantes de ferro denominados sideróforos, os quais possuem alta afinidade pelo ferro e outros íons metálicos fora da célula (CHOUDHARY et al., 2017; SAHA et al., 2013; SCHALK; HANNAUER;

BRAUD, 2011). Nas condições aeróbicas quase neutras presentes na maioria dos ambientes de superfície, o ferro está presente como óxidos de Fe(III) altamente insolúveis, que quando se encontram em condições ácidas (<pH 5), se tornam solúveis e potencialmente disponíveis para absorção (AYANGBENRO; OLANREWaju; BABALOLA, 2018; DOLD, 2014; SANDY; BUTLER, 2009). Em condições limitantes de ferro, os micro-organismos usarão energia para obtê-la, produzindo e secretando sideróforos. Estes sideróforos são ligantes orgânicos multidentados que quelam Fe(III) insolúvel e permitem que ele seja absorvido pela célula, onde é então reduzido a Fe(II) por redutases férricas assimilatórias e pode ser incorporado em proteínas (SCHRÖDER; JOHNSON; DE VRIES, 2003). As propriedades químicas e a composição estrutural dos sideróforos bacterianos são classificadas em quatro grandes grupos, como hidroxamatos, catecolatos, carboxilatos e tipos mistos, revelando associações complexas para melhor desintoxicação (ARORA; VERMA, 2017). As bactérias e os fungos podem secretar sideróforos de um ou mais grupos, os quais apresentam afinidades diferentes para ligação de ferro dependendo do pH (HAAS, 2014; KURTH; KAGE; NETT, 2016; SANDY; BUTLER, 2009). Centenas de sideróforos diferentes foram identificados (NEWSOME; FALAGÁN, 2021).

A produção de sideróforos representa uma estratégia de desintoxicação de íons metálicos na maioria das espécies bacterianas (HESSE et al., 2018; MATHIVANAN et al., 2021; NEWSOME; FALAGÁN, 2021). Geralmente são moléculas pequenas e de baixo peso molecular que quelam ferro e outros íons metálicos do ambiente com alta afinidade (BRAUD et al., 2010). Os sideróforos podem se ligar ao ferro e a outros metais e imobilizá-los dos solos, revelando seu potencial para remediar ambientes contaminados por metais (AHMED; HOLMSTRÖM, 2014; HERNLEM; VANE; SAYLES, 1999). O aumento da produção de sideróforos pode contribuir para a resistência do metal, pois os metais ligados aos sideróforos podem ser impedidos de entrar nas células e os catecolatos podem oferecer proteção contra o estresse oxidativo (JOHNSTONE; NOLAN, 2015; NEWSOME; FALAGÁN, 2021; SCHALK; HANNAUER; BRAUD, 2011). A complexação do metal com os sideróforos dificulta a toxicidade subjacente à penetração nas membranas internas celulares, causando a transição da liberação de metais pesados menos perigosos no ambiente, garantindo a segurança (SCHALK; HANNAUER; BRAUD, 2011). Os mecanismos de extrusão e reciclagem envolvendo a produção de sideróforos para uma biorremediação eficaz contam com os sistemas de bomba de efluxo de bactérias. O sistema de efluxo *PvdRT-OpmQ* (*Pseudomonas aeruginosa*), *MacAB* (*Salmonella enteric Serovar Typhimurium*), bomba de efluxo *MFS* (*Azotobacter vinelandii*) são

os sideróforos representativos para o aumento da desintoxicação em uma base quelante de ferro (BOGOMOLNAYA et al., 2020; HANNAUER et al., 2012; MATHIVANAN et al., 2021; PAGE et al., 2003). Os sideróforos microbianos são amplamente relatados com ação na eliminação de outros metais pesados como cádmio, cobre, níquel, chumbo, zinco e actínídeos como Th(IV), U(IV) e Pu(IV) (KÜGLER et al., 2020; MATHIVANAN et al., 2021). Cada metal tem um efeito diferente na produção de sideróforos em bactérias. A exposição ao chumbo e alumínio mostrou um aumento na produção de sideróforos em *Bacillus amyloliquefaciens* sem qualquer efeito no crescimento celular em comparação com o crescimento supressivo na presença de cádmio e cobalto, confirmando a atividade diferencial de produção de sideróforos (GAONKAR; BHOSLE, 2013).

As plantas se beneficiam pelos micro-organismos produtores de sideróforos que estão associados a sua rizosfera. Eles promovem o crescimento da planta, auxiliando na absorção dos metais que a planta necessita, além de contribuir na desintoxicação em ambientes com concentrações elevadas de metais (MATHIVANAN et al., 2021). Os impactos agrícolas dos sideróforos são estabelecidos para a promoção do crescimento das plantas, juntamente com a desintoxicação de metais pesados com tolerância e sequestro de vários metais pesados (MATHIVANAN et al., 2021). Esta característica aponta o potencial de produção microbiana de sideróforos como uma característica positiva na estratégia de fitorremediação de ambientes impactados pela mineração.

1.4.3 Ligantes de ácidos orgânicos

Os ácidos carboxílicos orgânicos são produzidos pelo metabolismo microbiano. A dissociação de alguns desses ácidos geram acidez contribuindo para o aumento da solubilidade dos metais, enquanto os ânions orgânicos desprotonados, também conhecidos como ácidos graxos voláteis, podem atuar como agentes quelantes aumentando a solubilidade do metal (NEWSOME; FALAGÁN, 2021). Ácidos orgânicos que realizam maior quantidade de ligações coordenadas com o metal são mais eficazes na quelação e solubilização de cátions metálicos de minerais (WELCH; ULLMAN, 1993).

A produção de ácidos orgânicos mais significativa ocorre durante o metabolismo da glicose. A molécula de glicose a partir da via glicolítica é transformada em piruvato, o qual pode ser fermentado para produzir lactato, acetato e formiato, ou respirado através do ciclo do ácido cítrico para produzir citrato, succinato, fumarato e malato, entre outros intermediários e

produtos. Os ácidos orgânicos podem ser produzidos a partir de outras reações de fermentação, como por exemplo, bactérias acetogênicas geram acetato quimiolitotroficamente a partir de CO_2 e H_2 (NEWSOME; FALAGÁN, 2021).

Os fungos em geral são produtores de ácidos orgânicos, e algumas espécies produzem grandes quantidades de ácidos oxálico e cítrico (SAYER et al., 1999). A superprodução de ácido oxálico por fungos pode solubilizar fosfatos metálicos, sulfetos, carbonatos e minerais de óxidos e precipitar os metais como minerais oxalatos altamente insolúveis (FOMINA et al., 2005). Essa complexação altamente insolúvel contribui para que os metais percam a mobilidade em ambientes ácidos. Vários fungos foram relatados com a capacidade de lixiviar cobalto e níquel através da produção de ácidos orgânicos (VALIX; USAI; MALIK, 2001). Além disso, os ácidos orgânicos fúngicos também podem lixiviar metais de rejeitos de minas e solo contaminados por metais (ILYAS; CHI; LEE, 2013; SEH-BARDAN et al., 2012). Desta forma, a atividade fúngica influencia no comportamento do metal em solos superficiais através da secreção de ácidos orgânicos.

1.4.4 Ligantes fosfatos e carbonatos

Os compostos de fosfato e carbonato são aplicados diretamente em solos impactados por metais e resíduos de minas para formar minerais insolúveis de fosfato metálico (ANDRUNIK et al., 2020). O fosfato aplicado aos resíduos da mina pode formar revestimentos de fosfato metálico nos minerais sulfetos. Desta forma impede o processo de oxidação e a consequente formação de ácido e dissolução dos metais (DOLD, 2014; SANDY; BUTLER, 2009). Esta tecnologia foi avaliada com vários graus de sucesso, usando ácido fosfórico, fosfato de rocha e biossólidos (NEWSOME; FALAGÁN, 2021).

Os micro-organismos conseguem realizar a liberação de ortofosfato de compostos orgânicos de fosfato a partir de enzimas fosfatases, processo enzimático que garante a disponibilidade de fósforo para absorção como um nutriente essencial. Os micro-organismos que superexpressam a fosfatase mostraram precipitar metais da solução como minerais de fosfato (LIANG; CSETENYI; GADD, 2016). A atividade da fosfatase microbiana contribui para a remediação de resíduos de minas quando compostos de fosfato orgânico, como biossólidos estão presentes (LIANG; CSETENYI; GADD, 2016).

O uso de carbonato para formação de minerais de carbonato metálico tem sido utilizado como tecnologia de remediação. Micro-organismos fotossintéticos, como

cianobactérias, podem facilitar a precipitação de carbonatos minerais usando bicarbonato como fonte de carbono, produzindo íons hidroxila e deslocando o equilíbrio para carbonato, além de fornecerem superfícies reativas para nucleação mineral (KONHAUSER, 2007). Os Microorganismos que realizam o processo de ureólise, decompõem a ureia $\text{CO}[\text{NH}_2]_2$ formando amônio e carbonato. Desta forma estimulam a precipitação de minerais de carbonato. Este processo já foi utilizado para remediar a contaminação do metais cádmio e cobre por coprecipitação com calcita (BHATTACHARYA; NAIK; KHARE, 2018), e também para promover a precipitação de minerais de carbonato de metal de chumbo (KANG et al., 2015).

1.4.5 Produção de substâncias exopoliméricas

A produção de substâncias exopoliméricas (EPS) é um mecanismo adaptativo que colabora com o alívio de stress contra a dessecação, salinidade, temperatura, radiação e desintoxicação de poluentes orgânicos e inorgânicos (FITRIYANTO et al., 2011; MATHIVANAN et al., 2021; NEWSOME; FALAGÁN, 2021). O EPS é formado a partir de processos microbianos como secreção ativa, liberação de materiais da superfície celular, lise celular e adsorção do ambiente (PAL; PAUL, 2013). Independentemente de sua origem, as EPS se localizam na superfície da célula bacteriana ou fora dela e são compostas por uma variedade de macromoléculas orgânicas de alto peso molecular, como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídios (JIANG et al., 2022; PAL; PAUL, 2013). Com base em seu estado físico, as EPS podem ser distinguidas como solúveis ou ligadas, de acordo com o metabolismo das células bacterianas. As EPS solúveis são consideradas ativamente secretadas pelas bactérias e são biodegradáveis, enquanto as ligadas permanecem associadas à biomassa ativa e inerte ou são moléculas resultantes da lise celular (PAL; PAUL, 2013). As EPS bacterianas são compostas por 40-95% de polissacarídeos, 1-60% de proteína, 1-10% de ácidos nucleicos e 1-40% de lipídios (KUMAR; ANANDAPANDIAN; PARTHIBAN, 2011). As porções de açúcar hexose como homo e heteropolissacarídeos são responsáveis pelos intrincados mecanismos das EPS (GUPTA; DIWAN, 2017). Os homopolissacarídeos contêm unidades de monossacarídeos únicos, enquanto os heteropolissacarídeos compreendem uma unidade repetida de diferentes monossacarídeos, como D-glicose, D-galactose, L-frutose, L-ramnose, ácido D-glucurônico, ácido L-gulurônico e ácido D-manurônico (MATHIVANAN et al., 2021).

Em ambientes onde existe uma elevada concentração de metais a produção de EPS por cepas bacterianas é aumentada para auxiliar na desintoxicação destes metais (MATHIVANAN

et al., 2021; MOHITE; KOLI; PATIL, 2018; RIZVI et al., 2019). As EPS produzidas por bactérias podem se ligar a íons metálicos tóxicos, permitindo o crescimento bacteriano mesmo em altas concentrações de íons metálicos, além disso, as EPS desempenham um papel crítico na capacidade de biossorção. Assim, a especificidade e sensibilidade da biorremediação bacteriana são amplamente atribuídas à produção de EPS e à química estrutural para ligação e desintoxicação de íons metálicos (MATHIVANAN et al., 2021). A produção de EPS e a formação de biofilme são mecanismos de desintoxicação e resistência de grande destaque na biorremediação bacteriana (PRIYADARSHANEE; DAS, 2021). Desta forma, a produção de EPS pode ser enriquecida para otimizar e melhorar a adaptação ao estresse da comunidade bacteriana, além de promover processos de biorremediação.

1.4.6 Metalotioneínas

Metalotioneínas (MTs) é um nome dado a uma família de proteínas de ligação a metais encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais (CHOUDHARY et al., 2017). Verificou-se que as MTs ligam tanto metais pesados essenciais como não essenciais. As MTs são ricas em tiol, abundantes em cisteína e proteínas de baixo peso molecular, e são consideradas uma estratégia bacteriana adaptativa eficaz contra a toxicidade do metal, afirmando a homeostase do metal e sua desintoxicação (BLINDAUER, 2011). As MTs foram relatadas pela primeira vez na cianobactéria *Synechococcus* PCC 7942, onde é codificada pelo locus *smt*, que consiste em dois genes transcritos divergentemente *smtA* e *smtB* (CHOUDHARY et al., 2017). A classe II MT é codificada por *smtA*, e a transcrição de *smtA* é reprimida pelo produto de *smtB* (CHATTERJEE et al., 2020). O SmtA está envolvido na homeostase do zinco, pois sua deleção em *Synechococcus* PCC 7942 leva à sua hipersensibilidade ao Zn(II) (BLINDAUER, 2011). O produto do gene de ligação ao cobre “*MymT*” corresponde a um segundo tipo de MTs bacterianos, previamente identificados em micobactérias (MATHIVANAN et al., 2021). A cianobactéria *Oscillatoria brevis* têm MTs da família *BmtA* com 55 sequências de aminoácidos (LIU et al., 2003), enquanto que *Yersinia pestis* têm MTs do tipo SmtA com 261 sequências de aminoácidos, confirmando variações de cepas na tolerância a metais específicos (CHATTERJEE et al., 2020).

A desintoxicação de íons metálicos tóxicos por células bacterianas é estabelecida através do processo de influxo onde os metais são sequestrados intracelularmente por MTs resultando na desintoxicação (KHAN et al., 2016). As MTs a partir de seus grupos tiols e

resíduos de cisteína conferem o mecanismo de regulação de metais essenciais incluindo ferro, zinco, cobre, selênio e metais não essenciais como cádmio, chumbo, mercúrio, arsênico e prata (YIN et al., 2019). O sequestro intracelular de metais por MTs tem sido relatado como uma forma de manutenção da homeostase e base celular da proteção bacteriana na desintoxicação de metais (MURTHY; BALI; SARANGI, 2011). A superexpressão da síntese de MTs foi relatada para o aumento do sequestro de metal em concentrações mais altas de chumbo (MURTHY; BALI; SARANGI, 2011).

1.4.7 Bioissorção de metais

Muitos metais podem ser removidos da solução via sorção para biomassa, em um processo denominado bioissorção (NEWSOME; FALAGÁN, 2021). A bioissorção é um processo físico-químico no qual os metais pesados são removidos da água contaminada por troca iônica, complexação de superfície, quelação e coordenação de íons metálicos usando adsorventes biológicos (FATHOLLAHI et al., 2021; MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013). Em geral, a bioissorção é considerada um método de remediação eficiente, barato e ambientalmente amigável para remoção de metais pesados de água contaminada (BILAL et al., 2018; FATHOLLAHI et al., 2021). Células microbianas vivas e mortas de bactérias, algas e fungos são os bioissorventes mais utilizados. As paredes celulares dos bioissorventes consistem em vários grupos funcionais, como grupos amino, carboxila, hidroxila e carbonila, que removem íons metálicos de soluções aquosas formando um complexo químico (FATHOLLAHI et al., 2021).

As bactérias apresentam diferenças consideráveis nas capacidades de bioissorção para diferentes metais pesados, o que pode ser explicado por vários fatores, como peso molecular, raio iônico e estado de oxidação do íon metálico (PARK; YUN; PARK, 2010). Além disso, propriedades do bioissorvente, como os grupos funcionais disponíveis na superfície e o estado bacteriano (micro-organismos vivos ou mortos), influenciam o processo de bioissorção (FATHOLLAHI et al., 2021; XING et al., 2018). A complexação ocorre pela formação de um complexo entre os grupos funcionais disponíveis na superfície das células bacterianas e o íon metálico (EL-SHEIKH; SHUDAYFAT; FASFOUS, 2019). Os grupos funcionais têm vários processos de complexação para diferentes metais pesados que levarão a diferentes capacidades de bioissorção. Grupos carboxila, hidroxila e amina são os principais grupos funcionais que foram relatados como responsáveis pela bioissorção de metais pesados por cepas bacterianas

(SHAMIM, 2018). Íons metálicos mais pesados têm maior afinidade com grupos funcionais disponíveis nas células bacterianas, durante o processo de complexação (FATHOLLAHI et al., 2021).

A biossorção de metais pesados por processos de biomassa bacteriana tem sido afetada por vários parâmetros físico-químicos, como pH, temperatura, dosagem de biomassa, concentração inicial de metal, tempo de contato, tipo de metal pesado e tipo de biossorvente (FATHOLLAHI et al., 2021). A temperatura pode alterar a estrutura das proteínas e grupos funcionais disponíveis na superfície do biossorvente. O pH influencia a solubilidade dos íons de metais pesados, bem como os sítios de ligação ativos da biomassa.

As microalgas são consideradas boas biossorbentes (FLOUTY; ESTEPHANE, 2012) devido ao seu grande tamanho, alta capacidade de sorção e a maioria não produzem substâncias tóxicas. Elas são autotróficas e podem crescer em grande biomassa mesmo com quantidade de nutrientes reduzida (SHAMIM, 2018). As seguintes características são responsáveis pela ligação de íons de metais pesados à superfície das microalgas: espécies de algas, carga iônica do metal e composição química da solução de íons metálicos (SHAMIM, 2018). Os sítios de ligação de íons metálicos na superfície das algas incluem grupos sulfidril, hidroxila, fosfato, sulfato, imidazol, amina, carboxila (OYEDEPO TA, 2011). O mecanismo de absorção de metal nas algas é semelhante ao das bactérias, que é a ligação de íons metálicos com a superfície seguida de internalização.

A biossorção de cátions metálicos é menos eficaz em condições ácidas devido à protonação das superfícies celulares e, portanto, é improvável que seja significativa em ambientes impactados pelo intemperismo oxidativo de resíduos de minas sulfídicas (NEWSOME; FALAGÁN, 2021). Além disso, a sorção da biomassa não é um sumidouro de longo prazo para os metais ambientais, pois as células morrem e se decompõem, liberando seus metais sorvidos de volta ao meio ambiente (NEWSOME; FALAGÁN, 2021). Desta forma, a biossorção não apresenta um impacto significativo no destino geral dos metais nos resíduos da mina, mas quando empregada em um processo de biorremediação que prevê a retirada da biomassa, ela pode se tornar atrativa.

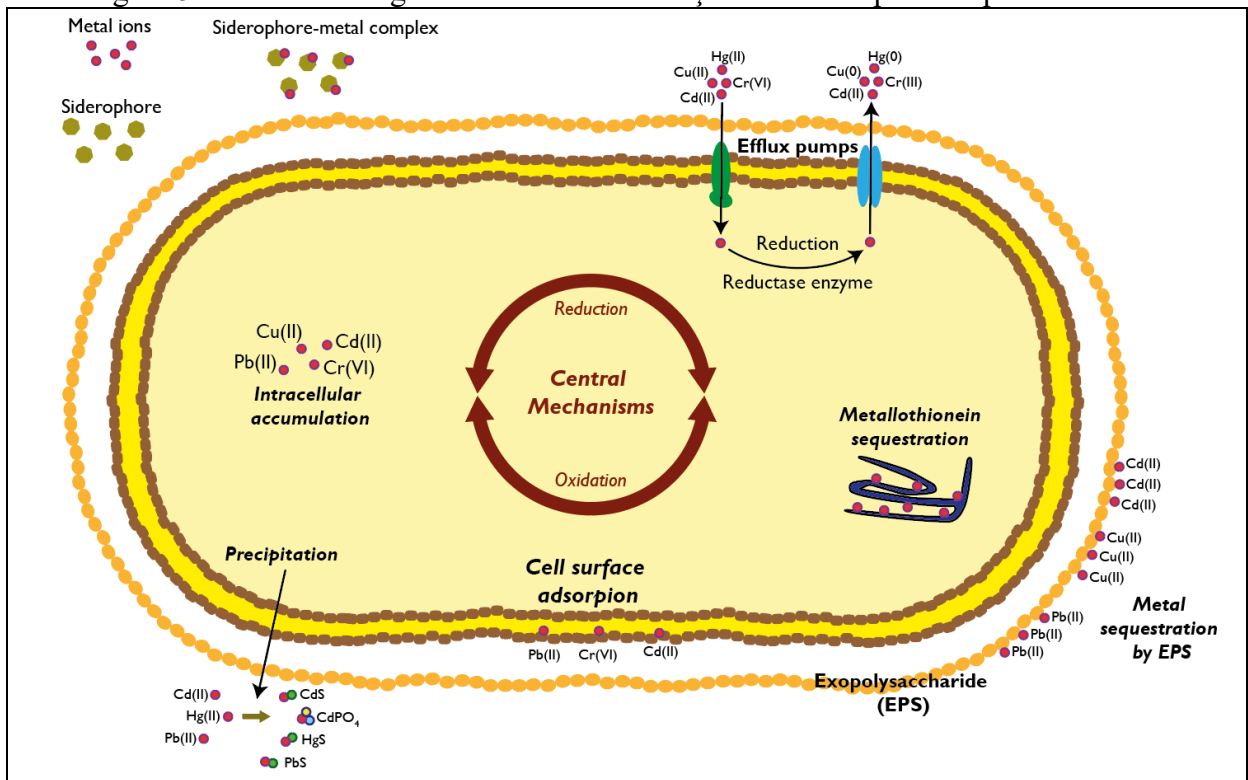
1.4.8 Biotransformação de metais tóxicos

A biotransformação auxilia na evolução adaptativa da biorremediação bacteriana, resultando na conversão de íons metálicos altamente tóxicos em formas menos tóxicas (YIN et

al., 2019). O processo de biotransformação pode ser intracelular ou extracelular para eliminação efetiva da toxicidade e estratégia de biorremediação (GOVARTHANAN et al., 2015). As reações redox são responsáveis pela base química da biotransformação e desintoxicação (BRINK; HÖRSTMANN; PEENS, 2020). A regulação enzimática extracelular da remoção tóxica de metais pesados é realizada por genes de resistência na transformação bacteriana (MATHIVANAN et al., 2021).

A biotransformação bacteriana é uma desintoxicação eficaz na minimização dos riscos tóxicos dos metais pesados na segurança ambiental. Portanto, os esboços completos da biorremediação bacteriana são uma multiplicidade de estratégias para tolerância a vários metais, e mecanismos de resistência baseados na evolução adaptativa (MATHIVANAN et al., 2021). A compartimentalização celular da biotransformação de metais por bactérias tem sido considerada um mecanismo generalizado de precipitação, metilação, oxidação, desalquilação e redução, envolvendo estratégias de resistências já citadas anteriormente (Figura 5).

Figura 5 - Mecanismos gerais de biotransformação de metais pesados por bactérias



Adaptado de (MATHIVANAN et al., 2021).

1.5 INTERAÇÕES DE MICRO-ORGANISMOS COM METAIS

Nesta sessão são descritas as interações que os micro-organismos exercem com os metais pesados cromo, cobre, zinco, níquel, arsênio, chumbo e mercúrio. Alguns metais são essenciais para a sobrevivência dos micro-organismos nas concentrações ideais, e podem se tornar tóxicos quando essa concentração excede. Nestes casos, interações de homeostase são predominantes. Já alguns metais não possuem funções biológicas essenciais e geralmente a sua presença está relacionada a toxicidade, predominando interações de proteção.

1.5.1 Cromo

O cromo é essencial para numerosos organismos vivos, no entanto, em quantidades elevadas se torna tóxico. Como metal de transição, ele se apresenta em diferentes estados de valência que variam de $-II$ a $+VI$ sendo $Cr(VI)$ e $Cr(III)$ as formas dominantes no ambiente. $Cr(VI)$ é conhecido por ser prejudicial a todas as formas de sistemas vivos (WISE et al., 2004). O cromo hexavalente geralmente entra na célula via transportador de sulfato e é reduzido a $Cr(III)$ por vários processos enzimáticos e não enzimáticos. Durante este processo, são formadas as espécies reativas de oxigênio que exercem efeitos deletérios nas células, interagindo com proteínas e ácidos nucleicos (CHEUNG; GU, 2007). Em contraste, o cromo trivalente tem muito menos toxicidade e biodisponibilidade. A solubilidade do Cr é ditada pelo pH, sendo que $Cr(III)$ precipita em condições de pH neutro a básico, enquanto em pH baixo tende a permanecer em solução. Já o $Cr(VI)$ é solúvel em todas as condições de pH. O cromo nos solos está sujeito a ciclagem redox, mas quando predominam as condições oxidativas, o $Cr(VI)$ pode persistir por anos (KIMBROUGH et al., 1999). A redução do cromo hexavalente para a forma trivalente seguida de precipitação pode ocorrer de forma química, envolvendo a redução de $Cr(VI)$ por muitos agentes redutores, como $Fe(0)$, $Fe(II)$, sulfeto, materiais orgânicos à base de carbono e outros (THATOI et al., 2014). Embora o método é amplamente utilizado e eficaz, ele apresenta uma alta entrada de energia e/ou grande quantidade de reagente químico, tornando assim, os métodos biológicos mais atrativos.

A transformação do $Cr(VI)$ na forma menos tóxica $Cr(III)$ é considerada um mecanismo de resistência. Várias espécies bacterianas e fúngicas são capazes de reduzir $Cr(VI)$ a $Cr(III)$ usando mecanismos diretos, ou indiretamente, produzindo agentes redutores extra ou intracelularmente (RAMÍREZ-DÍAZ et al., 2008). A redução enzimática por redutases de

Cr(VI) em bactérias é realizada de diferentes maneiras. As redutases solúveis podem participar na redução extracelular ou intracelular de Cr(VI) (DAS et al., 2014), enquanto a redutase ligada à membrana reduz por meios extracelulares (WANG et al., 1991). Nos processos intracelulares, o Cr(VI) é reduzido no citosol por meio de enzimas redutase citoplasmáticas solúveis. Essas enzimas desempenham um papel intermediário entre os doadores de elétrons biológicos associados. Os doadores de elétrons envolvidos na redução do Cr(VI) intracelular são NADH e NADPH (THATOI et al., 2014).

Em alguns casos, as enzimas redutoras de Cr(VI), produzidas por células bacterianas, são exportadas para o meio para reduzir o Cr(VI). Estas enzimas são de natureza extracelular (proteínas citosólicas), são redutases de cromato solúveis, como redutases de flavina, redutases de nitrato, proteínas de flavina e ferrireductases (CHEUNG; GU, 2007). Bactérias com redutases ligadas à membrana também podem reduzir Cr(VI) a Cr(III) por processos extracelulares, usando compostos de transporte de elétrons acoplados à redução de membrana (WANG et al., 1991). A maioria dessas enzimas é produzida indutivamente, ou seja, são produzidas na presença de Cr(VI) na solução e, portanto, são altamente reguladas (CHEUNG; GU, 2007).

No processo não enzimático o Cr(VI) reduz-se a Cr(III) na presença de diferentes compostos químicos, produzidos no processo metabólico bacteriano. Um exemplo bem conhecido é que bactérias redutoras de sulfato podem utilizar Fe(II) e HS⁻ como produtos finais de metabólitos anaeróbicos para reduzir o cromo hexavalente. Os redutores de cromato não enzimáticos mais poderosos podem ser ácido ascórbico, glutathione, cisteína, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (POLJSAK et al., 2010). A redução do Cr(VI) também pode ocorrer por reações químicas associadas a compostos presentes em compostos intra/extra celulares, como aminoácidos, nucleotídeos, açúcares, vitaminas, ácidos orgânicos ou glutathione (DHAL et al., 2010).

1.5.2 Cobre

O cobre pode ser encontrado em condições ambientais como Cu(I) ou Cu(II) em soluções aquosas, embora Cu(I) seja instável e facilmente oxidado a Cu(II). Na natureza também existe como Cu elementar, e como Cu(II) ou Cu(I) em minerais, por exemplo, calcopirita (CuFeS₂), calcocita, malaquita (Cu₂[CO₃][OH]₂). A especiação do cobre é influenciada pelo pH, potencial redox e a presença de outros íons, por exemplo, Cl⁻, OH⁻,

SO_4^{2-} e CO_3^{2-} (CUPPETT; DUNCAN; DIETRICH, 2006). A calcopirita é muito comum em resíduos de minas, é um mineral de sulfeto de cobre recalcitrante que se dissolve lentamente gerando DAM rica em cobre.

Como o cobre faz parte de muitas funções biológicas, manter as concentrações intracelulares de cobre no nível certo é de grande importância para os organismos. O cobre atua como cofator para muitas enzimas, incluindo oxidase e hidroxilase. Existem várias proteínas em bactérias envolvidas no transporte ativo de cobre, tais como as porinas (sistemas de transporte dependentes de TonB) e os calcóforos (metalóforos de ligação de cobre) (ANDREI et al., 2020). As proteínas envolvidas no transporte de cobre do periplasma para o citoplasma incluem transportadores do tipo facilitador principal-superfamília e calcóforos (ANDREI et al., 2020). O transporte de cobre em eucariotos é realizado pela família de proteínas transportadoras de cobre (Ctr) associadas à membrana, ligação ou aquisição de cobre (Mets), ou sistemas de absorção de baixa afinidade como o transportador Fet4 de ferro, cobre e zinco em *S. cerevisiae* (SMITH; LOGEMAN; THIELE, 2017). No entanto, concentrações mais altas de cobre são altamente tóxicas para as células bacterianas, e por isso, desenvolveram diferentes mecanismos de defesa contra a biotoxicidade induzida pelo cobre (LU et al., 1999).

Os mecanismos de resistência bacteriana ao cobre envolvem o efluxo ativo do metal do citoplasma para o espaço periplasmático, por enzimas como ATPases (sistema *Cus*), complexos e aglomerados de proteínas (Sistemas *Cop/Pco*) (ANDREI et al., 2020; ORELL et al., 2010). A presença de ATPases envolvidas na resistência ao cobre em *A. ferrooxidans* e *Escherichia coli* sugere que elas funcionem como bombas de efluxo, as quais também são encontradas em eucariotos (ORELL et al., 2010). Em *E. coli* o complexo multiproteico CusCBA controla o efluxo de cobre. CusA é uma proteína RND que é impulsionada pela força motriz do próton, e transporta cobre para fora das células bacterianas com a ajuda de produtos dos genes *CusB* e *CusC* (SEEGER et al., 2006). A homeostase do cobre em *E. Coli* é realizado pela multicobre oxidase que oxida Cu(I) a Cu(II) e protege as proteínas periplasmáticas (SINGH et al., 2004).

Em plasmídeos de *Pseudomonas* sp. o operon *cop* é composto por quatro proteínas CopA, CopB, CopC e CopD e confere resistência ao cobre. Estas proteínas acumulam cobre em uma compartimentalização simultânea no periplasma da célula e na membrana externa, conferindo proteção contra o cobre. O Cu(II) extracelular entra na célula bacteriana através da membrana externa porosa. A CopA (proteína periplasmática) liga-se ao Cu(II) e transporta-os para a CopD através da proteína CopC. CopD transporta o Cu(II) dentro da célula e detecta

quando ocorre concentrações elevadas de Cu(II) no espaço periplasmático, e CopS transmite o mesmo para CopR que induz a expressão de genes *copABCD* (NANDA; KUMAR; SHARMA, 2019; NIES, 1999).

A homeostase do cobre em *Enterococcus hirae* é mantida pelo operon *copYZAB*. Este operon *cop* contém dois genes estruturais, ambos codificando uma ATPase do tipo P. Enquanto *CopA* é responsável pela absorção de cobre e nutrição de cobre, *CopB* é responsável pelo efluxo e desintoxicação de cobre (NIES, 1999). As proteínas *CopY* (repressor de transcrição) e *CopZ* (um chaperon de cobre) regulam a expressão do operon *cop* (SOLIOZ; STOYANOV, 2003). Outro mecanismo de resistência bacteriana ao cobre é conferida pela presença de proteínas de ligação ao cobre e chaperonas. Estas proteínas e chaperonas ficam localizadas no espaço periplasmático e sequestram cobre, diminuindo sua toxicidade e fornecendo o cobre para a biogênese de cuproenzimas (ANDREI et al., 2020).

As bactérias acidófilas e archaeas usadas na biomineração possuem seu potencial de membrana positivo, fornecendo um mecanismo de resistência para o acúmulo de cátions como o cobre em seu citoplasma (ORELL et al., 2010). A produção de polímeros longos de polifosfato inorgânico (polifosfato quinase [PPK]) pode estar relacionada à resistência ao cobre (ORELL et al., 2010). Os mecanismos de resistência ao cobre encontrados em fungos e leveduras incluem o sequestro de cobre por metalotioneínas em *S. cerevisiae* e *Candida albicans*, sequestro extracelular e agentes quelantes (ANTSOTEGI-USKOLA; MARKINA-IÑARRAIRAEGUI; UGALDE, 2020).

1.5.3 Níquel

O níquel é onipresente nos solos e é fortemente sorvido, particularmente para oxihidróxidos de ferro e manganês e argilas em menor grau (RINKLEBE; SHAHEEN, 2017). É tipicamente encontrado como Ni(II), nesta forma é estável em uma ampla faixa de pH e condições redox (YUSUF et al., 2011). Alterações nas condições de pH e potencial redox afetam sua solubilidade. Em valores de pH mais altos, o níquel adsorve a compostos como silicatos, matéria orgânica ou óxidos de ferro e manganês (NEWSOME; FALAGÁN, 2021), enquanto em valores de pH baixos a solubilidade do níquel aumenta. Quando as condições redutoras prevalecem, e as condições se tornem sulfídicas, a precipitação de sulfetos de níquel diminuiria as concentrações aquosas de níquel. O H₂S produzido por bactérias redutoras de sulfato removerá o níquel da solução como NiS (RINKLEBE; SHAHEEN, 2017).

Em pequenas quantidades o níquel aumenta o crescimento de micro-organismos, no entanto, em altas concentrações têm impactos negativos nas comunidades microbianas. O níquel é necessário para o funcionamento de certas enzimas em micro-organismos, atuando, por exemplo, como cofator em metaloenzimas (MACOMBER; HAUSINGER, 2011). Essas enzimas são cruciais para uma ampla variedade de processos e metabolismos microbianos e incluem: urease que hidrolisa a uréia para formar amônia; Ni-Fe hidrogenase que catalisa a oxidação reversível do H₂; enzimas envolvidas na oxidação reversível de CO a CO₂ em condições anaeróbicas; metil-coenzima M redutase que é essencial para a metanogênese; as enzimas de proteção celular superóxido dismutase dependente de níquel, glioxilase dependente de níquel, e vários outros (MULROONEY; HAUSINGER, 2003).

O níquel pode entrar na célula por meio de vários sistemas de proteínas, ligando-se a proteínas específicas de níquel, por meio de permeases e por rotas não específicas (LI; ZAMBLE, 2009). Existem dois mecanismos de absorção ativa de níquel em bactérias: transportadores do tipo ATP-binding cassette (ABC) e permeases específicas de níquel. O sistema de transporte ABC utilizado por bactérias e archaea envolve várias proteínas, o sistema NikABCDE é o mais difundido, enquanto o sistema NiCoT é encontrado em bactérias e em eucariotos (NEWSOME; FALAGÁN, 2021; ZHANG et al., 2009). O transportador NikABCDE é constituído por duas proteínas transmembranares, *NikB* e *NikC* que formam um poro, em seguida, *NikD* e *NikE* se ligam e hidrolisam ATP e por fim, *NikA* que é uma proteína periplasmática, se liga ao níquel com um metalóforo. O sistema é regulado pelo regulador fumarato-nitrato (ROWE; STARNES; CHIVERS, 2005). As permeases de níquel de alta afinidade, da família *NiCoT*, são divididas entre aquelas que podem transportar Ni(II), aquelas que podem transportar cobalto ou aquelas que podem transportar tanto níquel quanto cobalto (MACOMBER; HAUSINGER, 2011). O transporte não específico de níquel pode ocorrer via *CorA* e outros canais na presença de altas concentrações de níquel (MACOMBER; HAUSINGER, 2011).

Existem vários sistemas de efluxo que os micro-organismos usam para bombear níquel para fora da célula. Estão envolvidas na desintoxicação as proteínas RND que bombeiam metais através da membrana externa, a proteína *NreB*, que bombeia níquel para fora do citoplasma usando a força motriz de prótons, e a bomba de efluxo *DmeF*, que é uma proteína que fornece resistência a vários metais (ou seja, Fe, Zn, Co, Cd e Ni) (MACOMBER; HAUSINGER, 2011). A bomba de efluxo *RcnA* encontrada em Proteobacteria, Cyanobacteria e archaea exporta níquel e cobalto para fora do citoplasma (RODRIGUE; EFFANTIN; MANDRAND-BERTHELOT,

2005), outros exportadores incluem uma suposta ATPase de efluxo de metal (CAMPBELL et al., 2007). Em fungos, os mecanismos de resistência direta ao níquel envolvem a modificação de um sistema de transporte de magnésio que também transporta níquel (JOHO et al., 1995).

A resistência ao níquel em bactérias também foi relatada por sistemas de tolerância do tipo *cnr/ncc*- e *cnr/ncc/nreB* (NIES, 2003). O complexo proteico CnrCBA exporta níquel para fora da célula (NIES, 2003). O sistema de efluxo *cnrCBA* é expresso pelo sistema de genes *cnrYHXCBAT*. Consiste em três genes estruturais *cnrC*, *cnrB*, *cnrA* cujos produtos proteicos se complexam para formar o sistema de efluxo que bombeia o níquel para fora das células bacterianas. À medida que o níquel entra no espaço periplasmático, os genes reguladores *cnrY* e *cnrC* iniciam a transcrição na região promotora. As proteínas codificadas pelos genes *cnrYXH* regulam a expressão de todos os outros genes e *cnrH* ativa constitutivamente a expressão de *cnrCBA* (NANDA; KUMAR; SHARMA, 2019).

NreB pertence à superfamília de proteínas MFS que exporta Ni(II) através da membrana citoplasmática (STOPPEL; MEYER; SCHLEGEL, 1995). Os determinantes de resistência ao níquel em *Klebsiella oxytoca* foram descritos como contendo quatro genes *nirABCD* (STOPPEL; MEYER; SCHLEGEL, 1995). O aumento de produção de histidina auxilia no sequestro do níquel, a histidina se liga ao níquel e este complexo é sequestrado em um vacúolo (NANDA; KUMAR; SHARMA, 2019).

1.5.4 Zinco

O zinco está predominantemente presente como Zn(II) em quase todas as condições ambientais. É relativamente imóvel nos solos, pois adsorve a partículas do solo, como argilas, siltes, óxidos de ferro e manganês, além de matéria orgânica. A solubilidade do zinco em águas é limitada pela formação de carbonato e hidróxidos, mas em pH baixo é móvel como Zn(II). Pode formar complexos com ligantes orgânicos e inorgânicos como ácidos húmicos. Em pH quase neutro e alto, o zinco pode precipitar como sulfeto de zinco sob condições redutoras e sob condições oxidantes pode coprecipitar com óxidos de ferro e manganês. A especiação do zinco não muda com redox.

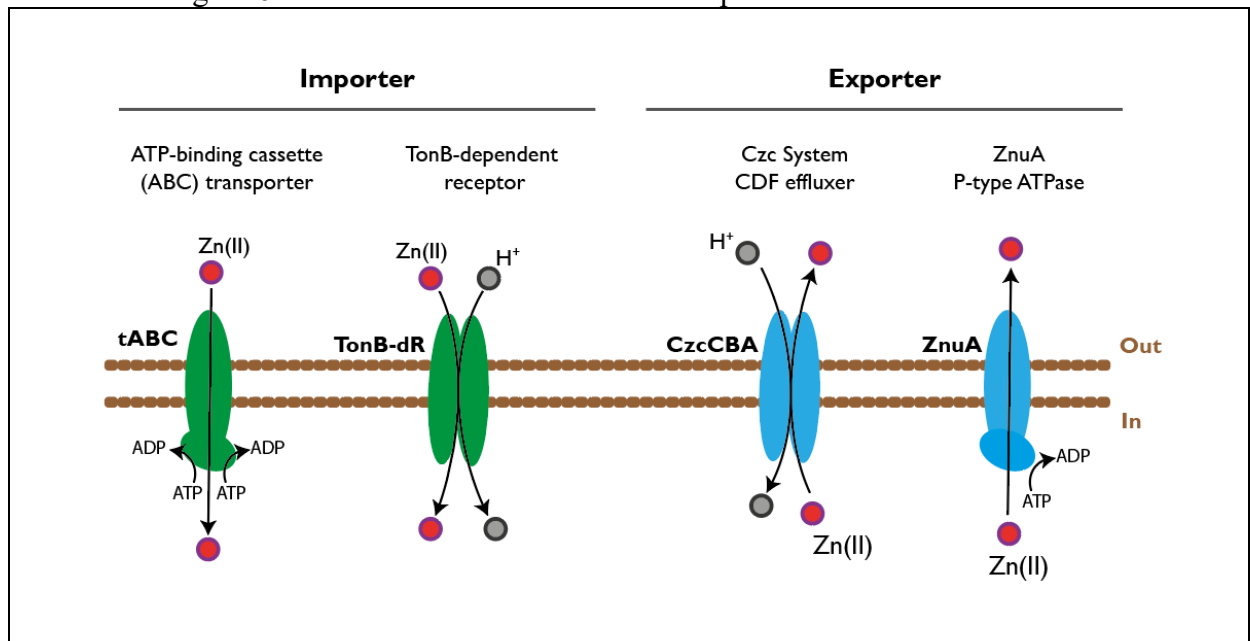
O zinco é um oligoelemento essencial necessário para o funcionamento de muitas metaloenzimas em todos os domínios da vida, mas pode ser tóxico em altas concentrações, bem como deficiente em baixas concentrações. Como tal, as concentrações intracelulares de zinco

são cuidadosamente balanceadas pela homeostase, envolvendo a regulação dos mecanismos de aquisição, sequestro e efluxo.

O zinco entra nas células procarióticas por movimento não específico através de gradientes de difusão ou via sistemas de captação ativa dependentes de energia, principalmente proteínas de transporte ABC (ATP-binding cassette) (BLENCOWE; MORBY, 2003). A captação ativa de zinco é regulada pela proteína sensora Zur (regulador de captação de zinco), que faz parte da família Fur de proteínas que detectam e respondem a baixas concentrações de metais e garantem a manutenção da homeostase (MIKHAYLINA et al., 2018). Zur se liga ao zinco e reprime ainda mais a captação, mas quando a concentração de zinco é deficiente, Zur sofre uma mudança conformacional para permitir a expressão dos genes de captação de zinco (BLINDAUER, 2015). Os fungos usam importadores de zinco de alta afinidade (CDF) para garantir um suprimento adequado de zinco (GERWIEN et al., 2018). A toxicidade do zinco ocorre quando os mecanismos de homeostase são sobrecarregados pelo excesso de zinco (CHANDRANGSU; RENSING; HELMANN, 2017). Tanto em procariontes quanto em fungos, o excesso de zinco compete com outros metais por sítios de ligação, causando efeitos tóxicos. Por exemplo, o zinco supera o transporte e a absorção de Mn(II), e sem manganês, o crescimento e a sobrevivência das células são prejudicados (MCDEVITT et al., 2011). O zinco pode inativar a cadeia de transporte de elétrons necessária para a respiração aeróbica (ALHASAWI et al., 2014), inibir o metabolismo da glicose e diminuir a biossíntese da cápsula (ONG; WALKER; MCEWAN, 2015).

Mecanismos de exportação de zinco são essenciais para manter a homeostase celular, e esses mecanismos de efluxo podem ser empregados para lidar com o excesso de zinco (Figura 6). Em procariontes o efluxo de zinco é mediado por proteínas sensoras e pode envolver três mecanismos. Eles são dependentes de energia, portanto, exigem ATP, o que significa que há um custo de adequação para exportar o excesso de zinco. A primeira é uma ATPase do tipo P regulada cromossômica (codificada pelo gene *zntA*) que permite o efluxo de íons de zinco através da membrana plasmática por um transporte ativo dirigido por ATP, assim como Zn(II), também podem translocar Cd(II) e Pb(II) (BLENCOWE; MORBY, 2003; NANDA; KUMAR; SHARMA, 2019). Em segundo lugar, a família de proteínas CDF inclui sistemas de efluxo de Zn(II) em certas bactérias (BLENCOWE; MORBY, 2003). Este processo requer energia na forma de um potencial eletroquímico para transportar Zn(II) para fora da célula (BLINDAUER, 2015). Finalmente, proteínas transportadoras impulsionadas por RND promovem ativamente o efluxo extracelular de zinco (BLINDAUER, 2015).

Figura 6 - Mecanismos envolvidos no transporte do zinco em bactérias



Bombas de importação tABC e TonB-dR envolvidas na captação de Zn(II), e os sistemas Czc e ZnuA envolvidos na exportação de Zn(II).

Outro sistema de tolerância ao zinco bem conhecido é o sistema *Czc* localizado em um operon plasmidial. Além do zinco, ele também confere resistência ao cádmio e cobalto e funciona como antiportador de cátions/prótons que eflui cátions das células. O operon *czc* é constituído por três genes estruturais, *czcC*, *czcB* e *czcA* que juntos formam o sistema de efluxo de cátions (NANDA; KUMAR; SHARMA, 2019).

Alternativamente, o excesso de zinco pode desencadear a expressão de proteínas de sequestro de zinco, como metalotioneínas que quelam metais intracelularmente e metalochaperonas, que trafegam metais dentro dos compartimentos celulares e facilitam a transferência para proteínas aceptoras (BLINDAUER, 2015; MA; JACOBSEN; GIEDROC, 2009). Em fungos, o excesso de zinco pode ser sequestrado no vacúolo e ligado a polifosfatos, ou pelo uso de metalotioneínas (GERWIEN et al., 2018). A atividade redutora de sulfato pode remover completamente o zinco das águas de DAM por precipitação como ZnS (LE PAPE et al., 2017).

1.5.5 Chumbo

O chumbo não possui função biológica conhecida e é tóxico aos humanos e outros seres vivos. Na natureza é na maioria das vezes encontrado como Pb(II) em quase todas as condições ambientais. O chumbo também é relativamente imóvel nos solos, estando fortemente

adsorvido às partículas do solo, como argilas, siltes, óxidos de ferro, óxido de manganês e matéria orgânica, mas pode ganhar mobilidade através da formação de complexos com carbono orgânico em pH 4-6. O chumbo é efetivamente retido nos solos, muitas vezes devido à forte ligação à matéria orgânica presente nas camadas húmicas (MICHOPoulos et al., 2005). O transporte de chumbo nos rios ocorre principalmente na fase sólida como colóides, partículas de carbonato de chumbo, óxido ou outros minerais, ou adsorvidos em sedimentos. A fração de chumbo adsorvida à colóides é a mais lábil. A solubilidade do chumbo em águas naturais é limitada pela formação de minerais de carbonato, hidróxido e enxofre. A solubilidade do chumbo aumenta em pH mais baixo, na presença de alto teor de cloreto e sob condições redutoras (NEWSOME; FALAGÁN, 2021).

O chumbo na forma de Pb(II) consegue entrar na célula através dos canais de Ca(II) (KERPER; HINKLE, 1997). O mecanismo de resistência intracelular do chumbo foi descrito em *Cupriavidus metallidurans*, apontando como responsável o operon de *pbrUTRABCD* encontrado no plasmídeo pMOL30 (BORREMANS et al., 2001; GEORGE; WAN, 2020). A proteína permease de Pb(II), codificada por *pbrT*, transporta o Pb(II) para dentro da célula, e então o Pb(II) se liga ao regulador *pbrR*, que induz a transcrição de *pbrABCD* do promotor *pbrA* (BORREMANS et al., 2001). Uma proteína intracelular, a chaperona de chumbo, produto do gene *pbrD*, liga-se ao chumbo e o transfere para a membrana celular onde o produto do gene *pbrA* (proteína de efluxo ATPase do tipo P1B) exporta ativamente Pb(II) para o periplasma (TAGHAVI et al., 2009). O produto do gene *pbrB*, uma undecaprenil pirofosfato fosfatase (C55-PP fosfatase), produz fosfato inorgânico que se combina com Pb(II) formando fosfato de chumbo, o qual é sequestrado no periplasma. Isso leva à expressão descontinuada do operon *pbr*, iniciando a síntese do produto gênico *pbrC* e *pbrD* (HYNNINEN et al., 2009). *PbrD* também pode acumular Pb(II) e prevenir o aumento da absorção de Pb(II) na célula (TAGHAVI et al., 2009). O produto do gene *pbrC* é uma peptidase sinal de lipoproteína que interage com o produto do gene *pbrB* (TAGHAVI et al., 2009). O produto do gene *pbrU* pode ser uma permease mas é inativa em *C. metallidurans* (TAGHAVI et al., 2009). Apenas os produtos de *PbrA* e *pbrB* são essenciais para resistência ao chumbo, os produtos de *pbrT*, *pbrC*, *pbrD* e *pbrU* não são (HYNNINEN et al., 2009; TAGHAVI et al., 2009).

O chumbo também pode ser sequestrado intracelularmente por metalotioneína (GEORGE; WAN, 2020). O gene *bmtA* (metalotioneína bacteriana), foi detectado em *Pseudomonas aeruginosa* cepa WI-1, acompanhado pela indução de um provável produto do gene *bmtA* e sequestro intracelular de chumbo (NAIK; PANDEY; DUBEY, 2012).

Quando expostos à contaminação por chumbo, os micro-organismos utilizarão primeiro estratégias de imobilização extracelular para limitar a entrada de Pb(II) no envelope celular para manter a homeostase. Em geral, a imobilização extracelular é realizada principalmente por meio de biossorção e precipitação. A precipitação extracelular de chumbo se assemelha à precipitação intracelular. Já a ligação biossortiva de chumbo envolve uma série de polímeros ou compostos produzidos por micro-organismos, incluindo EPS, sideróforos e vários grupos funcionais na parede celular.

A precipitação microbiana de minerais de Pb pode atuar como um mecanismo de resistência indireta. Algumas bactérias e fungos podem precipitar Pb(II) extracelularmente como piromorfita, ligado à atividade da fosfatase (LIANG et al., 2016). Além de formar biominerais de Pb-fosfato, os fungos podem secretar ácido oxálico para precipitar Pb(II) como Pb-oxalato (LIANG et al., 2016). Outra forma resistência ao chumbo é a produção de EPS. Um *Bacillus anthracis* isolado de águas residuais industriais excreta EPS e precipita sulfeto de chumbo (PbS) extracelularmente (EL-SHANSOURY et al., 2012).

Os micro-organismos excretam sideróforos que podem se ligar a metais pesados, como chumbo, e reduzir a toxicidade (O'BRIEN; HODGSON; BUCKLING, 2014). Em *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, o chumbo liga-se ao sideróforo pioverdina, mas não é transportado para dentro da célula (BRAUD et al., 2009). *Pseudomonas aeruginosa* cepa 4EA, isolada de solos contaminados com chumbo, aumenta a produção de piochelina e pioverdina na presença de concentrações mais altas de chumbo (NAIK; DUBEY, 2011). Sideróforos excretados também eliminam chumbo, resultando na produção de precipitados de chumbo através da ação da fosfatase e formação de fosfatos de chumbo (NAIK; DUBEY, 2011; O'BRIEN; HODGSON; BUCKLING, 2014).

1.5.6 Arsênio

O arsênio é normalmente encontrado no ambiente como As(V) em condições oxidantes ou As(III) em condições redutoras. O As(V) é menos móvel e menos tóxico comparado ao As(III). A redução microbiana de As(V) à As(III) via respiração ou desintoxicação tem o efeito de aumentar a mobilidade ambiental do arsênio, enquanto que a oxidação de As(III) a As(V) diminui sua mobilidade ambiental (NEWSOME; FALAGÁN, 2021). A biogeoquímica do ferro desempenha um papel crucial na mediação do comportamento

ambiental do arsênio, visto que o As(V) sorve fortemente os minerais de óxido de ferro, tornando-o pouco móvel (LAFFERTY; LOEPPERT, 2005).

As comunidades microbianas serão capazes de reduzir tanto Fe(III) quanto As(V) e, portanto, a atividade microbiana aumentará a mobilidade de arsênio se as condições geoquímicas forem adequadas, ou seja, se houver doador de elétrons disponível e transferência limitada de oxigênio (condição anaeróbica) (LOVLEY; HOLMES; NEVIN, 2004). Já se as condições forem suficientemente redutoras para estimular a redução de sulfato, isso favorecerá a remoção de arsênio da solução (ZHANG et al., 2017). Desta forma, condições de redução bacteriana de arsênio e de sulfato podem precipitar o arsênio da solução com minerais de sulfeto acoplados à oxidação de orgânicos, como etanol ou lactato (RODRIGUEZ-FREIRE et al., 2014).

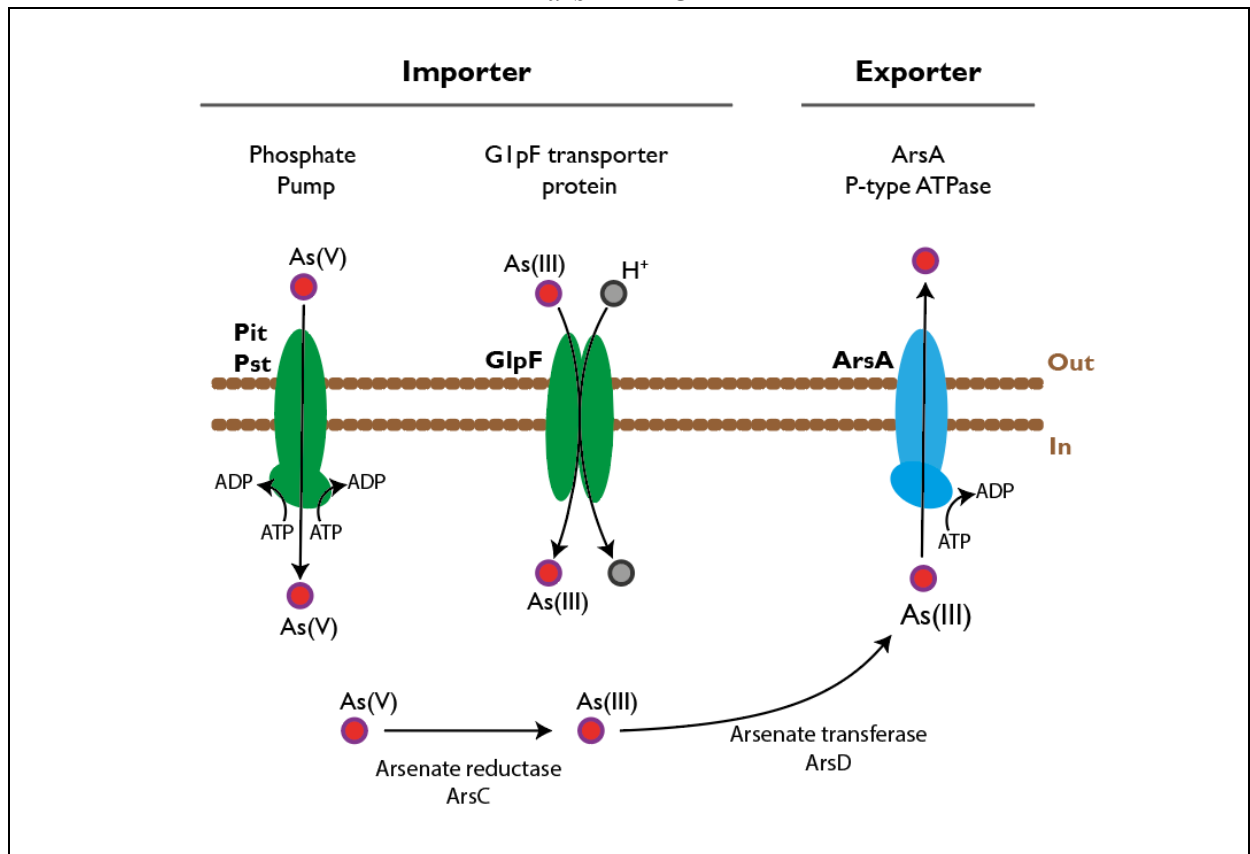
Óxidos de Mn(IV) podem oxidar efetivamente As(III) a As(V) (FISCHEL et al., 2015). Os óxidos de Mn(IV) também são preferencialmente reduzidos antes dos óxidos de ferro contendo As(V) e, portanto, retardarão a liberação de arsênio para a solução sob condições redutoras (EHLERT; MIKUTTA; KRETZSCHMAR, 2016). Sob condições redutoras, o arsênio é liberado para solução como resultado da dissolução dos óxidos de Fe(III) e Mn(IV) por bactérias redutoras de metais. As transformações redox mediadas microbianamente ocorrem muito mais rapidamente e são, portanto, mais importantes ambientalmente do que as reações abióticas (HUANG, 2014).

Mecanismos de absorção específicos para arsênio não existem. As(V) é captado através de sistemas de captação de fosfato inorgânico devido às semelhanças dos aniões arsenato e fosfato (GARBINSKI; ROSEN; CHEN, 2019). A entrada de As(III) nas células ocorre através da proteína transportadora G1pF (ROSEN, 2002), enquanto o As(V) utiliza transportadores que geralmente carregam outros compostos, como por exemplo, transportadores de fosfato (bombas *Pit* e *Pst*). O sistema *Pit* é o mais utilizado (NANDA; KUMAR; SHARMA, 2019), por ser menos específico e acumular arsênio nas células durante a abundância de fosfato. O *Pst* sendo altamente específico transporta fosfato apenas durante a falta de fosfato com a ajuda de duas proteínas, a *PstS* (liga-se ao fosfato) e o complexo *PstABC* ATPase (ROSEN, 2002).

A desintoxicação do arsênio ocorre via efluxo, sequestro intracelular ou metilação. O As(V) primeiramente é reduzido a As(III) para então ser transportado extracelularmente por meio de várias proteínas de efluxo (Figura 7). Em procariontes, o operon *ars* é amplamente distribuído e inclui genes resistência ao arsênico (*arsR*, *arsC*, *arsB*, *arsA* e *acr3*). As proteínas

reguladoras ArsR (repressor) e ArsD (co-regulador) controlam o operon *ars* (NANDA; KUMAR; SHARMA, 2019). A mudança de As(V) para As(III) é principalmente catalisada por ArsC (arsenato redutase). A ArsD transfere o As(III) até a ArsA ATPase (LIN; WALMSLEY; ROSEN, 2006). E desta forma o As(III) é exportado para fora da célula por um sistema de efluxo de metal, arsênio ATPase, formado por proteínas ArsA (subunidade catalítica) e ArsB (subunidade de membrana); ou por uma permease de efluxo de arsenito Acr3 (SHI et al., 2018). Quando o arsênio (III) não está presente, a proteína repressora (ArsR) ocupa o operador e restringe sua própria expressão, assim como os demais genes do operon *ars* (ROSEN, 2002). Eucariotos não têm bomba de efluxo *ArsB*. Para o fungo *Saccharomyces cerevisiae* a permease de efluxo Acr3 confere a resistência ao arsênio (MACIASZCZYK-DZIUBINSKA et al., 2014). Foi relatado que *Aspergillus niger* reduz As(V) a As(III) como um mecanismo de desintoxicação e a presença do transportador de efluxo AcrA (e um homólogo de Acr3) gera resistência ao As(V) (CHOE et al., 2012).

Figura 7 - Mecanismos envolvidos no transporte do arsênio em bactérias com o operon *arsRDABC*



A entrada de arsênio ocorre por bombas de fosfato do tipo Pit/Pst ou pela proteína carreadora GlpF. O As(V) é transformado em As(III) pela arsenato redutase (ArsC). Quando o As(III) é identificado dentro da célula a arsenato redutase o transfere para a arsenito ATPase (ArsA) que exporta o metal por efluxo.

Os fungos também são capazes de sequestrar arsênio em vacúolos como um mecanismo de resistência. Esse mecanismo foi reportado em vários fungos descrevendo a associação com ligações à biossíntese de glutatona e o sequestro vacuolar (CHOE et al., 2012; LI et al., 2021b). Existem bactérias e fungos que podem transformar o arsênio em formas metiladas facilitando o processo de volatilização. O mecanismo de biometilação de *Challenger* reduz o As(V) para As(III) a partir de uma série de reações de metilação-oxidação e redução para eventualmente formar trimetilarsina, que é volátil e pode ser perdida para o meio ambiente (CULLEN, 2014). Isso geralmente é considerado um processo de desintoxicação, apesar de algumas formas metiladas de arsênio serem mais tóxicas do que as formas inorgânicas (FEKIH et al., 2018). Os genes de metiltransferase de arsênio fúngico aumentam a biometilação e volatilização e conferem resistência ao arsênio (VERMA et al., 2016).

A redução de As(V) respiratória foi documentada em bactérias anaeróbicas e archaea (AHMANN et al., 1994; HUBER et al., 2000). Na redução dissimilatória de As, o As(V) é reduzido como acceptor de elétrons terminal para ganhar energia acoplada à oxidação de compostos orgânicos ou H₂. Esta respiração usa o operon *arr* que contém um cluster de dois genes (*arrA* e *arrB*) (SALTIKOV; NEWMAN, 2003). Os genes dissimilatórios da redutase de arsênio são altamente conservados (MALASARN et al., 2004). A maioria dos redutores dissimilatórios de As(V) são heterotróficos e podem ganhar energia oxidando uma variedade de compostos orgânicos (SALTIKOV; NEWMAN, 2003), no entanto, a redução autotrófica de As(V) também foi documentada (HOEFT et al., 2007).

As bactérias também podem conservar energia oxidando As(III) a As(V), com As(III) atuando como um doador de elétrons acoplado ao O₂ ou redução de nitrato e com C obtido a partir de CO₂ ou bicarbonato (HOEFT et al., 2007). Dois sistemas de oxidação de arsênio em bactérias foram identificados; o mais comum é o arsenito oxidase aeróbico *aio* (LETT et al., 2011), enquanto os genes *arx* codificam para oxidação microaerofílica ou anaeróbica de As(III) acoplada à redução de nitrato (AMEND et al., 2014).

1.5.7 Mercúrio

O mercúrio ocorre naturalmente como mercúrio elementar metálico Hg(0), mercúrio inorgânico (sais de Hg) e mercúrio orgânico (por exemplo, metilmercúrio [CH₃Hg]⁺). O mercúrio pode ser encontrado em pilhas de entulho e estéril e outros ambientes de mineração, em conjunto com outros elementos tóxicos, como o arsênio (LOREDO; PEREIRA;

ORDÓÑEZ, 2003). A forma mineral mais comum do mercúrio é o cinábrio (HgS). O mercúrio tem três estados redox, Hg(0), Hg(I) e Hg(II). O Hg(0) pode formar amálgamas com outros metais, é líquido à temperatura ambiente e pode evaporar. Os vapores de mercúrio podem ser oxidados na atmosfera pelo ozônio a Hg(II), que é então removido por precipitação. Hg(II) pode ser reduzido de volta a Hg(0), ou sofrer transformações mediadas por micro-organismos incluindo redução, metilação e oxidação (NEWSOME; FALAGÁN, 2021).

A metilação de Hg(II) ocorre de forma abiótica a partir da metilação por ácidos fúlvicos e húmicos, ácidos carboxílicos e compostos metilados (BARKAY; MILLER; SUMMERS, 2003). Também é relatado a metilação biológica através de bactérias redutoras de sulfato, onde a metiltransferase transfere CH_3^- de metilcobalamina na via acetil-CoA (CHOI; CHASE; BARTHA, 1994). Já a desmetilação de CH_3Hg^+ ocorre por fotodegradação em 200-400 nm (SELLER et al., 1996). De forma biológica pode ocorrer a partir de redução, onde *merAB* produz CH_4 e Hg(0), ou por oxidação em um processo não caracterizado que produz CO_2 e uma fração de mercúrio não identificada (BARKAY; MILLER; SUMMERS, 2003).

A redução de Hg(II) ocorre de forma abiótica a partir de reações fotoquímicas e escuras por radicais livres orgânicos e inorgânicos (NRIAGU, 1994). E de forma biológica pela redutase de mercúrio bacteriana e vias indefinidas por algas durante o crescimento claro e escuro (DEVARS et al., 2000). Já a oxidação de Hg(0) ocorre por foto-oxidação de vários oxidantes e radicais livres, e também por oxidação escura possivelmente por O_2 em condições salinas (LINDBERG et al., 2002). De forma biológica ocorre por hidroxidases em micróbios, plantas e animais (SMITH et al., 1998).

O metilmercúrio é solúvel, móvel e pode ser assimilado por plantas e outros organismos, também se bioacumula e biomagnifica na cadeia trófica (BRAVO et al., 2014). A adsorção de Hg(II) nos solos é influenciada por vários fatores, incluindo a presença de cloreto, carbono orgânico dissolvido e pH. Em pH 3-5, Hg(II) é altamente adsorvido nos solos, mas diminui em pH mais alto na ausência de cloreto (YIN et al., 1996).

Até recentemente, nenhuma função biológica estava associada ao mercúrio até o relato de que *Rhodobacter capsulatus* possui maior taxa de crescimento na presença de mercúrio, e que as reações de redução não foram apenas utilizadas como mecanismo de desintoxicação, mas também para manter a homeostase redox (GRÉGOIRE; POULAIN, 2016).

A absorção de Hg por micro-organismos tem sido estudada em fototróficos como algas (BEAUVAIS-FLÜCK; SLAVEYKOVA; COSIO, 2017) e cianobactérias (CAIN; VANNELA; WOO, 2008). Acredita-se que a difusão passiva seja o principal mecanismo de captação de

mercúrio devido à capacidade dos complexos neutros de Hg-S de se difundirem no citoplasma (MA; DU; WANG, 2019).

O operon *mer* é o principal mecanismo que confere resistência ao mercúrio em procariontes (DASH; DAS, 2012). Hg(II) é transportado para o citoplasma pela proteína de membrana interna *MerT* e outros transportadores, e então a redução é regulada por *MerR*. Isso permite a expressão do gene de resistência ao mercúrio *merA*, que codifica uma redutase mercúrica que usa NAD(P)H para reduzir Hg(II) ao Hg(0) que então se difunde através da membrana (FREEDMAN; ZHU; BARKAY, 2012). O mecanismo envolve o transporte de Hg para o citosol e a subsequente redução pela redutase do íon mercúrico (BARKAY; MILLER; SUMMERS, 2003). O operon *mer* que confere resistência ao mercúrio é amplamente distribuído em bactérias e archaea, indicando sua evolução potencial durante o início da vida na Terra (FREEDMAN; ZHU; BARKAY, 2012). Outra enzima importante na resistência ao mercúrio em bactérias é a *merB*, que codifica uma liase organomercurial que libera Hg(II) de compostos organomercuriais (LELLO; LAFRANCE-VANASSE; OMICHINSKI, 2010). Esta enzima cliva a ligação C-Hg e, em seguida, reduz o Hg(II) em metal volátil que se move para fora da célula. Os genes *merB* adicionais estão presentes a jusante do gene *merA* (OSBORN et al., 1997). No entanto, no caso de *Pseudomonas stutzeri*, o gene *merB* situa-se entre *merR* e *merT* (RENIERO; GALLI; BARBIERI, 1995). Outros genes que conferem resistência ao organomercurio também foram relatados, a saber, *merG* e *merE* (HUANG et al., 1999).

A desmetilação é outra via contra a toxicidade do mercúrio. O metilmercúrio é degradado em Hg(II) e CO₂ (BRIDOU et al., 2011) ou CH₄ (OREMLAND; CULBERTSON; WINFREY, 1991). Algumas bactérias redutoras de sulfato executam a desmetilação do mercúrio para Hg(II), mas não produzem Hg(0) como um produto final que de outra forma poderia ser liberado para fora da célula (LU et al., 2016). Isso é interessante porque o Hg(II) é altamente tóxico e seu acúmulo tem um impacto negativo no funcionamento celular. Ambos os processos de metilação e desmetilação ocorrem em algumas cepas de bactérias, se eles podem ser considerados como mecanismos de desintoxicação ou como doadores ou aceptores alternativos de elétrons não está esclarecido (LU et al., 2016).

O operon *mer* não foi encontrado em organismos eucarióticos. Os mecanismos de desintoxicação do mercúrio em fungos envolvem bioacumulação e biovolatilização (CHANG et al., 2020; PIETRO-SOUZA et al., 2020). Cepas de *Bacillus* e *Candida spp.* formam cristais intracelulares de nanopartículas de HgS sob condições de não crescimento (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2017). Uma cepa resistente ao mercúrio de *Enterobacter sp.* tem a capacidade de

acumular mercúrio e de sintetizar nanopartículas de mercúrio (SINHA; KHARE, 2011). A estrutura de EPS também é capaz de absorver mercúrio, conforme encontrado na levedura *Yarrowia* (OYETIBO et al., 2016).

1.6 FERRAMENTAS GENÉTICAS PARA ESTUDO EM DAM

As características abióticas encontradas em DAM se diferem de uma mina para a outra, fazendo assim com que a comunidade microbiana apresente diferenças em sua distribuição. Com os recentes avanços no sequenciamento de alto rendimento ajudaram a desvendar o microbioma, e suas associações a diferentes ambientes (BHARTI; GRIMM, 2021). Essa tecnologia, permite a identificação e comparação de comunidades microbianas inteiras, incluindo organismos não cultiváveis. Isso trás uma grande relevância na avaliação de ambientes de DAM que geralmente possuem características tão extremas que impossibilitam o cultivo da maioria dos organismos que ali habitam. Estas técnicas de sequenciamento de alto rendimento, normalmente engloba duas estratégias particulares de sequenciamento, o sequenciamento de *amplicons* e o sequenciamento shotgun, também chamado de *whole genome sequence* (WGS).

O sequenciamento do gene amplicon tem sido a principal técnica para estudar a filogenia e a taxonomia de microbiomas complexos. Para esta técnica o DNA total da amostra é extraído e após isso, realizado uma amplificação de um gene específico, a partir desta amplificação é realizado o sequenciamento. Em geral, são escolhidos genes marcadores conservados funcionalmente em distâncias filogenéticas. O gene alvo mais comumente usado para identificação bacteriana é o 16S rRNA (ou 16S rDNA), que é o padrão ouro na identificação microbiana (BRUMFIELD et al., 2020; PEL et al., 2018). O gene 16S rRNA codifica a pequena subunidade 30S procariótica do complexo ribossômico 70S na maioria das bactérias e archaea (BHARTI; GRIMM, 2021). O método de sequenciamento do gene 16S rRNA geralmente emprega primers de PCR universais para amplificar regiões hipervariáveis (V1-V9) do gene 16S rRNA (BRUMFIELD et al., 2020). O sequenciamento destes amplicons são usados para inferir identificação taxonômica a partir do alinhamento bioinformático contra vários bancos de dados de sequência de rRNA, como o *Ribosomal Database Project* (RDP) (COLE et al., 2014), *SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project* (QUAST et al., 2013), ou *Greengenes Database* (DESANTIS et al., 2006). Para a identificação de eucariotos outros alvos são melhor empregados a exemplo do 18S e do ITS. Com o avanço das ferramentas de

bioinformática é possível realizar a predição funcional a partir da lista de taxons encontradas na amostra, com o uso de aplicações como PICRUSt (DOUGLAS et al., 2020) e Tax4fun (ASSHAUER et al., 2015).

No sequenciamento por WGS o DNA total é extraído e cortado em fragmentos que são sequenciados e alinhados independentemente, para identificação taxonômica em bancos de dados genômicos, como o *Reference Sequence* (RefSeq) (O'LEARY et al., 2016), GenBank (BENSON et al., 2018) ou *Pathosystems Resource Integration Center Database* (PATRIC) (WATTAM et al., 2014). Sequências de WGS com alta quantidade de leituras possibilitam que sejam montados os genomas dos micro-organismos presentes na amostra. Desta forma, esta técnica permite a identificação de forma abrangente dos micro-organismos presentes, sejam eles cultiváveis ou não, sejam conhecidos ou desconhecidos. Em contraste com a análise filogenética unimodal baseada na diversidade de um único gene, por exemplo, o gene 16S rRNA, o WGS sistematiza a composição genética multimodal das comunidades microbianas e, portanto, fornece uma melhor resolução taxonômica e informação genômica (QUINCE et al., 2017). A metagenômica por WGS também foi complementada com abordagens metatranscriptômicas para descrever a função microbiana a partir de sequências de mRNA (GILBERT et al., 2008). Estes avanços permitiram a criação de bancos de dados com curadoria para sequências de anotação de genoma (BRUMFIELD et al., 2020).

A técnica de sequenciamento por *amplicon* permite com menor custo de sequenciamento, realizar estudos de ecologias a partir do conhecimento dos táxa presentes na amostra. Quando comparado ao WGS, é uma técnica mais restrita em relação a resolução taxonomica e ao estudo das funções metabólicas. No entanto, os custos relativamente altos do WGS e os requisitos bioinformáticos mais exigentes impedem seu uso para análise de microbiomas em larga escala.

A partir de estudos de sequenciamento por *amplicon* ou WGS é possível ter um entendimento mais profundo da composição microbiana e das comunidades que habitam a DAM, e do seu potencial funcional. Vários estudos já foram realizados em ambientes de DAM utilizando abordagens de metagenômica, ampliando o conhecimento da vida que habitam nesses ambientes. Gupta et al. (2021) realizaram um estudo para compreender a diversidade de archaea em sedimento de DAM do Malanjkhand Copper Project, Índia, através do sequenciamento de amplicon do gene 16S rRNA da região V6, específica de archaea. Os dados de amplicon do gene de rRNA 16S-v6 específico de Archaea mostraram uma predominância de membros de *Thermoplasma* (BSLdp215, *Thermoplasmata* não cultivado e

Thermoplasmataceae) e Nitrososphaeria (Nitrosotaleaceae) constituindo ~95% da comunidade de archaea. (ABRAMOV et al., 2021) usaram uma combinação de sequenciamento de *amplicon* de 16S rRNA (gene) com análises hidrogeoquímicas, explorando o impacto do pH, Fe(III), Fe(II) e Cl₂ em micro-organismos que ciclam Fe. A partir dos resultados, descobriram que a comunidade microbiana influencia o transporte de metais pesados ao longo do Rio Tinto, Espanha. Em um outro trabalho, (SHE et al., 2021) investigaram a diversidade microbiana procariótica e a montagem da comunidade ao longo de um perfil de profundidade em um lago de DAM estratificado, usando o sequenciamento do gene 16S combinado com métodos ecológicos e estatísticos multivariados. Como resultados, entenderam que o pH foi identificado como o principal fator de diversidade microbiana e montagem de comunidades ao longo do perfil vertical do lago. Em um estudo envolvendo o impacto de solos submetidos ao contato com DAM, (XU et al., 2020) descobriram que o impacto da DAM reduziu a diversidade da comunidade microbiana do solo e alterou ainda mais os padrões de agrupamento filogenético ao longo do gradiente avaliado. Coletivamente, os resultados sugeriram que os gradientes geoquímicos alteraram substancialmente a microbiota do solo e enriqueceram os micro-organismos relevantes adaptados às diferentes condições. Estes estudos são apenas uma amostra do potencial da aplicação da técnica no estudo das funções metabólicas relevantes para o metabolismo e adaptação de micro-organismos em ambientes impactados por DAM.

1.7 HIPÓTESES

- A composição das comunidades procariontes e eucariontes encontradas em DAM podem distinguir os locais altamente contaminados com DAM dos locais com níveis intermediários de contaminação.
- As algas filamentosas encontradas em DAM apresenta no seu microbioma associado a superfície, espécies com potencial de biorremediação deste local impactado.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar microbiomas procariontes e eucariontes de drenagem ácida de minas da Bacia Carbonífera de Santa Catarina (Sul do Brasil), correlacionando sua composição com variáveis físico-químicas e identificando os potenciais de biorremediação destas comunidades.

1.8.2 Objetivos específicos

- Determinar as características físico-químicas de água e sedimento dos locais estudados;
- Avaliar a composição das comunidades procarióticas e eucarióticas por meta-taxonomica (*amplicons* 16S e 18S) nos sedimentos e corpos d'água de diferentes áreas impactadas por DAM;
- Correlacionar as comunidades procarióticas e eucarióticas com variáveis ambientais físico-químicas;
- Determinar a capacidade de retenção de metais pela biomassa do biofilme da superfície de algas filamentosas extremófilas;
- Caracterizar por meta-taxonomica (*amplicons* 16S e 18S) as comunidades procariontes e eucariontes associadas ao biofilme da superfície de algas filamentosas extremófilas, com potencial de biorremediação.

2 CAPÍTULO 1

Meta-taxonômica de microbiomas de drenagem ácida de minas da Bacia Carbonífera de Santa Catarina (Sul do Brasil)

Estácio Jussie Odisi^{1,2}, Robert Cardoso de Freitas², Diego Serrasol do Amaral¹, Saulo Britto da Silva², Marcus Adonai Castro da Silva³, William de Oliveira Sant Ana⁴, André Oliveira de Souza Lima³, Leonardo Rubi Rörig^{1*}

¹Laboratory of Phycology, Department of Botany, Federal University of Santa Catarina (LAFIC – UFSC), Florianópolis, Campus Universitário Trindade, Caixa postal 476, Florianópolis - SC - 88040-900 - Brazil

²Biome4All, São Paulo - SP 01419-909, Brazil.

³Center for Earth and Sea Technological Sciences, University of Vale do Itajaí (UNIVALI), Rua Uruguai, 458, Itajaí – SC - 88302-202 - Brazil.

⁴SATC Technological Center, Beneficent Association of the Santa Catarina Coal Industry (SATC), Pascoal Meller St. 73, Criciúma – SC – Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55 (48) 3721-4769; fax: +55 (48) 3721-9672.

E-mail address: leororig@gmail.com.

2.1 RESUMO

As atividades de mineração geram grandes quantidades de rejeitos sólidos e líquidos capazes de alterar sensivelmente a biogeoquímica e a estrutura ecológica em bacias hidrográficas inteiras. As comunidades microbianas que se desenvolvem nessas áreas impactadas apresentam uma variedade de mecanismos de sobrevivência e adaptação. Conhecer essa diversidade ao nível molecular é estratégico tanto para compreender processos adaptativos, como para identificar genomas e mecanismos com potencial uso em biorremediação e bioprospecção. Neste trabalho foram avaliadas as comunidades procariontes e eucariontes por meta-taxonomica (amplicons 16S e 18S) nos sedimentos e corpos d'água de diferentes áreas de mineração na Bacia Carbonífera de Santa Catarina, importante área de mineração de carvão no sul do Brasil. Foram definidas cinco estações de amostragem, onde três delas são bocas de minas com histórico crítico de geração de DAM (pH 2.7-3.6), outra localizada em boca de mina com características menos ácidas (pH 4.25), e uma última estação foi na junção de rios que recebem DAM e esgotos domésticos gerados na bacia hidrográfica. Foram encontrados como táxa associados às três estações críticas em geração de DAM os gêneros procariontes, *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Thiomonas*, *Thermogymnomonas* e *Acidobacterium*; e nos eucariontes a alga *Poteroispumella* (Chrysophyceae), ciliados *Hypotricha* e fungos LKM11. Para ambientes de transição, com fracas condições de acidez e metais em DAM, os gêneros associados foram *Sediminibacterium*, *Gallionella*, *Geothrix* e *Geobacter*. Com isso as diferenças na composição das comunidades podem distinguir os locais altamente contaminados com DAM (pH 2.7-3.6) dos locais com níveis intermediários de contaminação (pH 3.8-4.25). A variação do pH foi o fator que melhor determinou a composição da comunidade procarionte, enquanto para a comunidade eucarionte, a concentração de nutrientes (TOC e N) e de metais (Ni, Cu, Mn e Zn) apresentaram a melhor explicabilidade sobre a composição da comunidade.

Palavras-chave: Impactos da mineração, carvão mineral, meta-taxonomia, extremófilos, metais pesados, 16S/18S.

2.2 INTRODUÇÃO

As atividades de mineração promovem impactos em grandes áreas, alterando a biogeoquímica e a ecologia de ambientes terrestres e aquáticos. Um dos principais impactos reconhecidos é a DAM, um efluente fortemente ácido e com altas concentrações de metais e sulfatos, capaz de impactar bacias hidrográficas inteiras e, inclusive zonas costeiras (RAMBABU et al., 2020; SIMATE; NDLOVU, 2014).

A DAM é gerada pela oxidação de minerais sulfetados, sendo o mais comum a pirita (FeS). A oxidação pode ocorrer naturalmente a partir da exposição dos minerais ao oxigênio, água e micro-organismos, mas em geral, é acelerado pelas atividades de mineração que aumentam a exposição desses minerais (CARLIER et al., 2020; WU et al., 2021). A taxa de oxidação química do ferro ferroso é insignificante abaixo de pH 4, portanto, a atividade das bactérias acidófilas oxidantes do ferro desempenham um papel crucial na geração de DAM (HALLBERG, 2010). A composição da drenagem pode diferir drasticamente de uma região para outra devido à geologia local, microclima, grupo de micro-organismos e fonte de água (RAMBABU et al., 2020; SIMATE; NDLOVU, 2014). A geração de DAM pode se dar em locais de mineração ativos ou abandonados, principalmente aqueles que não tiveram um planejamento de desativação (NEFF; DENICOLA; MALTMAN, 2021).

Um levantamento realizado em 2018 (MAUS et al., 2020), coloca o Brasil na 14ª posição em área de mineração ativa. O estado de Santa Catarina localizado no sul do país é um dos maiores polos de mineração de carvão do país, com mais de 140 anos de atividades (RANGEL et al., 2016; SILVA; WOLLENSCHLAGER; OLIVEIRA, 2011). A atividade de mineração intensiva tem produzido quantidades consideráveis de resíduos e, conseqüentemente, uma grave deterioração ambiental do meio ambiente local. As bacias hidrográficas dos rios Tubarão, Urussanga e Araranguá fazem parte da Bacia Carbonífera de Santa Catarina (BCSC). Esta área recebe DAM de 134 locais de minas a céu aberto cobrindo uma área total de 2.964 ha, com 115 áreas de depósito de resíduos (2.734 ha), 77 lagos ácidos (58 ha) e centenas de minas subterrâneas (SILVA et al., 2013). Estima-se que existam mais de 1000 minas abandonadas na BCSC (LATTUADA et al., 2009). Em 1980, esta região foi designada como “Área Nacional Crítica para Controle de Poluição e Conservação Ambiental”. Nos anos subsequentes foram empregadas ações pela Procuradoria Geral da República do Brasil exigindo das empresas de mineração a recuperação das áreas impactadas pelas atividades (SILVA et al., 2013).

Embora a BCSC possua um passivo ambiental de grande alerta, a maioria dos estudos existentes no local são de caracterização físico-química. As maiores concentrações de metais, especialmente de Fe, Al, Cu, Zn, Pb e Mn, juntamente com os menores valores de pH (pH = 2,4 – 3,8) foram documentados em amostras de corpos d'água próximos à minas (SILVA et al., 2013; SILVA; WOLLENSCHLAGER; OLIVEIRA, 2011). Alguns poucos estudos abordam a biologia, sendo eles relacionados a resistência de micro-organismos a metais pesados (CASTRO-SILVA et al., 2003), ao uso de peixes como bioindicadores (OSÓRIO et al., 2014), e a avaliação da microbiologia empregada para auxiliar o crescimento de plantas no processo de fitorremediação (PILLE DA SILVA et al., 2019). Estudos que descrevam o comportamento das comunidades microbianas em áreas de DAM na BCSC não foram realizados até o momento. Para acessar essas comunidades microbianas é importante a aplicação de métodos metataxonômicos baseados na extração total de DNA de amostras ambientais (BRUMFIELD et al., 2020).

A utilização de métodos de meta-taxonômica por sequenciamento permite a identificação e comparação de comunidades microbianas inteiras, incluindo organismos não cultiváveis. Esta técnica tem grande relevância na avaliação de ambientes de DAM que geralmente possuem características tão extremas que impossibilitam o cultivo da maioria dos organismos que ali habitam. Com estes métodos é possível realizar estudos de ecologia microbiana nestes ambientes e descobrir como a dinâmica destas comunidades responde à DAM. Vários trabalhos tem demonstrado que (SHE et al., 2021; XU et al., 2020) os gradientes geoquímicos alteram substancialmente a comunidade microbiana. Com isso é possível verificar espécies que podem ser indicadoras de condições de DAM.

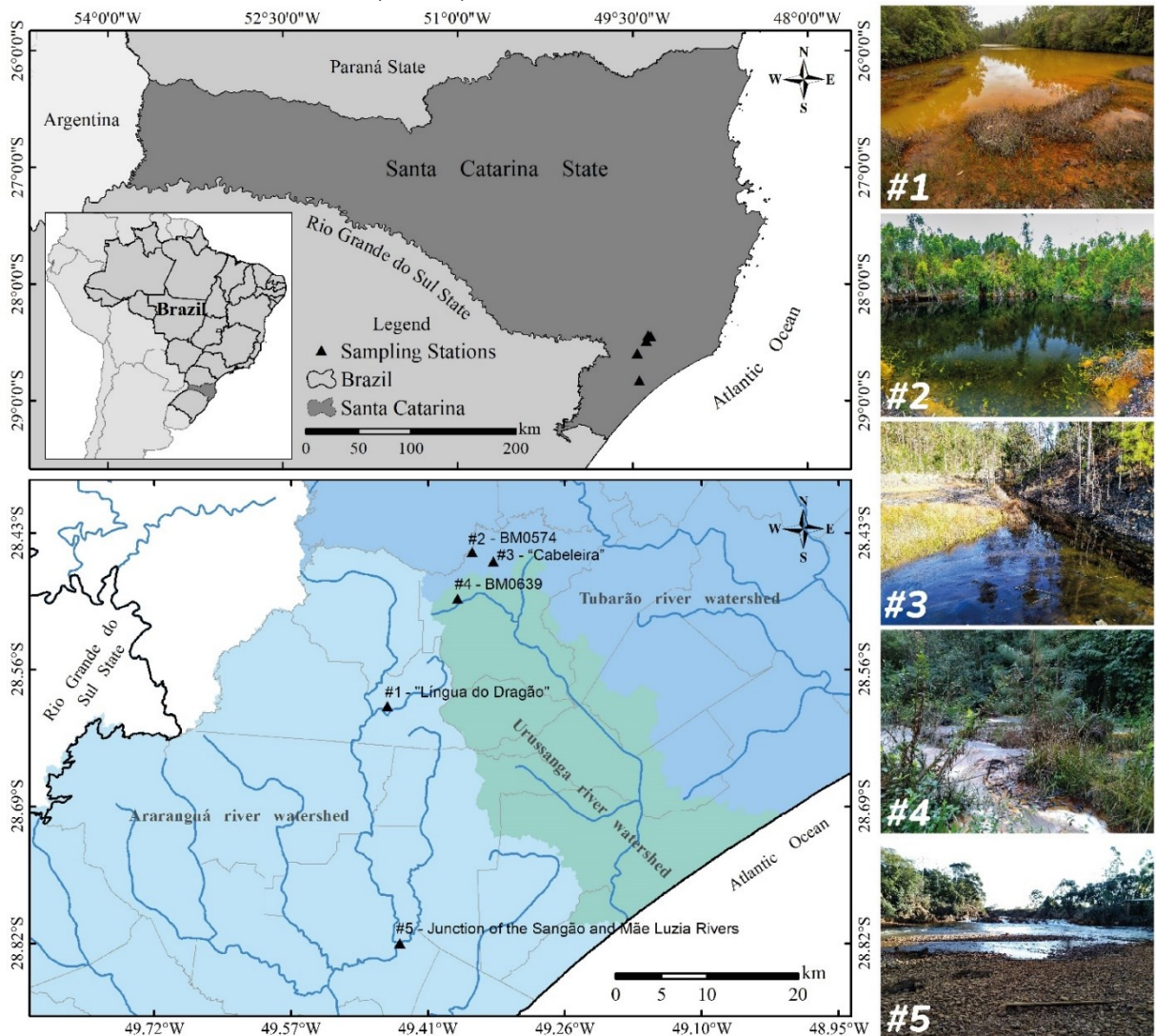
O objetivo principal deste trabalho foi caracterizar por meta-taxonômica (*amplicons* 16S e 18S) as comunidades procarióticas e eucarióticas nos sedimentos e corpos d'água de diferentes áreas impactadas por DAM na BCSC, correlacionando sua composição com variáveis físico-químicas. Foram definidas estações de coleta em ambientes com geração de DAM intensa e outros dois com características de transição, a fim de verificar a presença de comunidades específicas que possam ser utilizadas como bioindicadores destas áreas.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Área de estudo e amostragem

O estudo foi realizado em cinco locais diferentes na BCSC, localizada no Estado de Santa Catarina na região Sul do Brasil (Figura 8). Os pontos de amostragem estão distribuídos em três diferentes bacias hidrográficas, a saber: Araranguá, Urussanga e Tubarão. Na intersecção destas três bacias hidrográficas existe uma área de aproximadamente 1.625 km² impactados pela atividade de mineração.

Figura 8 - Localização das estações amostrais ao longo da Bacia Carbonífera de Santa Catarina (BCSC), estado de Santa Catarina, Brasil



Os nomes das amostras, as coordenadas do local de amostragem e suas breves descrições estão resumidos no Quadro 2. Onde três delas (#1, #2 e #3) foram em bocas de minas com intensa geração de DAM (pH 2.7-3.6), uma localizada em boca de mina (#4) com características menos ácidas (pH 4,25), e uma última localizada na junção de dois rios (#5) que recebem a DAM e esgotos domésticos de diferentes pontos da bacia hidrográfica. Fotos de cada estação de coleta estão disponíveis no Apêndice A.

Quadro 2 - Localização e descrição dos locais de amostragem Bacia Carbonífera de Santa Catarina (BCSC) e designação das amostras de sedimentos

ID	Nome do local	Coordenadas geográficas	Breve descrição do local
#1	Língua do Dragão	28°35'40.5849'' E 49°27'37.7780'' N	Mineração a céu-aberto. O local concentra águas ácidas que lixiviam mais de 500 hectares de áreas de mineração ativa e passiva, somado com interconexões subterrâneas com minas de subsolo. Compromete a qualidade das águas da Bacia do rio Araranguá. Considerado o maior gerador de impacto ambiental de mineração da região
#2	BM0574	28°26'28.2108'' E 49°22'04.1380'' N	Uma série de minas de lavra subterrânea de carvão mineral que formou um lago na sua saída. O local está abandonado há décadas, possivelmente há mais de 50 anos, uma época em que as atividades eram semi-mecanizadas e até mesmo manuais. Não foi realizado nenhum plano de fechamento de mina e recuperação da área. Escoa suas águas para rio Palmeiras, afluente do rio Tubarão.
#3	Cabeleira	28°27'00.2999'' E 49°20'37.2965'' N	Mineração por lavra a céu aberto. Existem pequenos córregos que lixiviam estas pilhas de estereis, os quais irão desaguar igualmente na Bacia do rio Tubarão. O nome “cabeleira” é uma alusão à grande quantidade de algas filamentosas que crescem neste local.
#4	BM0639	28°29'14.1817'' E 49°23'00.0189'' N	Mineração subterrânea. Esta mina era mecanizada tendo encerrado suas atividades no início da década de 1980, após fatalidade que vitimou mais de 30 trabalhadores no subsolo. A DAM que sai dessa mina apresenta uma coloração branca leitosa, devido ao contato com uma formação rochosa de calcário.
#5	Junção dos rios Sangão e Mãe Luzia	28°49'44.0039'' E 49°26'34.1674'' N	Ambos os rios são contaminados por dejetos de mineração e esgotos. O rio Mãe Luzia recebe maior aporte de afluentes com águas de boa qualidade. O rio Sangão é o manancial mais impactado da região, pela soma de fontes de poluição urbana e de DAM proveniente de extensas áreas de mineração e depósitos de rejeitos. Nesta localidade as águas são captadas para irrigação de arroz na agricultura.

Em cada uma das estações foram coletadas amostras de sedimento e de água. Amostras de sedimentos da camada superficial (~5 cm de profundidade) foram coletadas em cinco pontos para cada estação de coleta, em uma profundidade de água de cerca de 0,3 m, utilizando um tubo de conexão esterilizado com diâmetro de 40 mm. As cinco frações foram misturadas em um saco estéril e posteriormente foi transferida uma fração composta para um tubo cônico estéril (volume de 50 mL). Todo processo foi realizado utilizando luvas de vinil estéril. As amostras seguiram refrigeradas até o laboratório em caixa de isopor. No laboratório uma fração do sedimento foi colocada em tubos de 5 mL e foi submerso com RNA Later, até o momento da extração do DNA que ocorreu cinco dias após a coleta. O restante do sedimento presente no tubo cônico foi direcionado para análise de metais e nutrientes.

Amostras de água foram coletadas em locais onde a água estava em movimento até completar o volume de 5 L (galões de 5 L estéreis) para cada estação. Os galões foram armazenados em caixa térmica para posteriores análises químicas e genéticas de metataxonomia.

2.3.2 Análises geoquímicas

Amostras de água e sedimento das cinco estações foram coletadas em tubos de polietileno de 50 mL e estocadas em caixas térmicas no escuro até a chegada ao laboratório. As amostras para determinação de metais em água foram acidificadas até pH 2,0 com ácido sulfúrico. As concentrações de metais (Fe, Mn, Zn, Cu, Ni) foram determinadas nas amostras de água e sedimentos. Nas amostras de sedimento foi ainda determinada concentração de carbono orgânico total (TOC), nitrogênio total (TN) e fósforo total (PT). As análises foram realizadas no laboratório analítico LAQUA (Laboratório de Análises Químicas e Ambientais) pertencente a Associação Beneficente da Indústria Carbonífera de Santa Catarina (SATC). As concentrações totais de Cu, Fe, Zn, Mn e Ni na água e sedimento foram determinadas por *Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)*, seguindo as metodologias padrão para sedimentos (EPA 3050B; USEPA, 1996) e para água (*SMWW 3120 B*; APHA, 2018a).

O TOC foi determinado em um *Total Organic Carbon Analyzer* seguindo a metodologia padrão *SMWW 5310 D* (APHA, 2018a). Este método fornece características do conteúdo orgânico da amostra, independente do estado de oxidação da matéria orgânica e não mede outros elementos ligados. Para essa análise a amostra foi acidificada para remover o carbono

inorgânico e oxidada com persulfato a temperaturas de 116 a 130°C. O dióxido de carbono resultante foi medido por espectrometria de infravermelho não dispersivo.

Para a determinação do PT as amostras de água e sedimentos passaram por *Digestão ácida assistida por microondas* e posterior análise por *ICP-MS*, de acordo com as metodologias *EPA 3051A* (U.S. EPA, 2007) e *SMWW 3120 B* (APHA, 2018b). Para a determinação do NT os sedimentos passaram por oxidação alcalina de 100 à 110°C em bloco de digestão, sendo o digestato posteriormente analisado espectrofotometricamente como nitrato de acordo com o método *SMWW 4500-N* (APHA, 2018c).

2.3.3 Extração de DNA

Uma amostra composta de sedimento de cada estação de amostragem foi homogeneizada e submetida à extração de DNA usando o kit *DNeasy PowerSoil* (Qiagen®) seguindo as instruções do fabricante. As amostras de água foram filtradas através de uma membrana de celulose de 0,22µm (~3 Litros) e, em seguida, o DNA foi extraído com o kit de extração *DNeasy PowerWater* (Qiagen®), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do DNA eluído foram determinadas usando um espectrofotômetro (*NanoDrop3300*, Thermo Fisher Scientific, EUA).

2.3.4 Biblioteca de amplicons e sequenciamento

O DNA purificado extraído foi usado para construção de biblioteca de extremidade pareada (*pair-end* 250pb) com base em um protocolo Illumina. As regiões V3-V4 dos genes 16S rRNA foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') e 806R 5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3' (TAKAHASHI et al., 2014). As regiões V9 dos genes 18S rRNA foram amplificadas por PCR usando os primers *Euk1391F* (5'-GTACACACCGCCCGTC) e *EukBR* e (5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC) (AMARAL-ZETTLER et al., 2009). Todas as reações de PCR foram realizadas com *Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix* (New England Biolabs). As bibliotecas amplicon foram purificadas usando o protocolo padrão para *Agencourt Ampure XP Bead* (Beckman Coulter, EUA) e sua concentração de DNA medida usando o kit *Qubit™ HS DNA Assay* (Thermo Fisher Scientific, EUA). As bibliotecas de sequenciamento foram preparadas a partir das bibliotecas de amplicon purificadas usando uma segunda PCR.

Cada reação de PCR (25 μ L) continha tampão PCRBIO HiFi (PCRBiosystems, Reino Unido), PCRBIO HiFi Polimerase (1U) (PCRBiosystems, Reino Unido), mistura de adaptadores (400 nM de cada direto e reverso) e até 10 ng de amplicon modelo de biblioteca. A qualidade da biblioteca foi avaliada no Qubit@ 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific) e no sistema Agilent Bioanalyzer 2100. Finalmente, as bibliotecas de sequenciamento purificadas foram agrupadas em concentrações equimolares e diluídas a 2 nM, e as amostras foram sequenciadas (301 pb) em um MiSeq (Illumina) usando um kit MiSeq Reagent v3 (Illumina, EUA) seguindo as diretrizes padrão para preparação e carregando amostras no MiSeq. A biblioteca de controle Phix foi usada como um controle durante a execução (20% spikedin) para monitoramento da qualidade da execução para superar o problema de baixa complexidade que é frequentemente observado com amostras de *amplicon*.

2.3.5 Processamento de dados de DNA

O pacote QIIME2 (BOLYEN et al., 2019) foi usado para realizar o controle de qualidade, chamada de variante de sequência de *amplicon* (ASV) e classificação taxonômica das leituras de sequenciamento. As sequências de primers foram removidas previamente à chamada de ASVs (17 a 20 pares de base removidos na extremidade 5' das leituras). As etapas de filtragem por qualidade e chamada de ASVs foram realizadas utilizando o *pipeline* DADA2 denoise-paired (CALLAHAN et al., 2016), com os parâmetros `maxN = 0`; `truncQ = 2`; `minOverlap = 10`. As sequências representativas resultantes da chamada de ASVs foram classificadas com classificadores Naïve Bayes implementados no plugin *q2-feature-classifier*, treinados usando sequências extraídas do banco de dados SILVA 138 SSU (QUAST et al., 2013) de acordo com os primers 16S e 18S usados no processo de sequenciamento, por meio do comando *fit-classifier-naive-bayes*. O resultado foi um conjunto de tabelas taxonômicas com abundâncias relativas para cada amostra. Os dados brutos estão disponíveis no NCBI *Sequence Read Archive* (SRA) sob o número de acesso PRJNA1015584.

2.3.6 Análises de *downstream*

Os índices de alfa-diversidade foram estimados para todas as amostras usando o pacote Python *scikit-bio* 0.5.5 (<http://scikit-bio.org/>). Análises subsequentes a jusante foram feitas usando o pacote *Microeco* R (LIU et al., 2021a), onde as abundâncias relativas nos níveis de

gênero e filo foram calculadas usando o método de classe trans_abund. Para evidenciar prováveis relações entre os dados abióticos e a composição de organismos, foram realizadas análises multivariadas de Correspondência Canônica utilizando o software Past 3.10 (v. nov/2015); os dados ambientais (exceto pH) e de abundância de ASV foram normalizados por transformação logarítmica. Para essas análises foram considerados os 20 grupos taxonômicos mais abundantes classificados a nível de gênero.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Variáveis físico-químicas e químicas

As amostras mostraram consideráveis diferenças nos valores de pH, concentração de metais, fósforo e nitrogênio (Tabela 2). As estações #1, #2, #3 apresentaram DAM típica de um lixiviado de espólios ricos em pirita. O pH da água entre 2,70 e 3,20 e as concentrações de ferro são indicativos de intemperismo intenso da pirita nestas estações. A maioria dos parâmetros da água na estação #4 também são típicos de DAM, embora tenham se mostrado menos ácidos e contendo menor concentração de alguns íons metálicos, o que sugere efeito do contato com rochas alcalinas. As águas que chegam na estação #5 são resultado da junção dos rios Mãe Luzia e Sangão, e também apresentam o pH baixo (3,8), no entanto, a concentração de metais foi bem menor quando comparada as demais estações coletadas, evidenciando processos de diluição ou mesmo remoção físico-química e biológica.

Tabela 2 - Características químicas e físico-químicas da água e do sedimento nas estações de coleta influenciadas por drenagem ácida de mina de carvão na bacia carbonífera de Santa Catarina – Brasil

ID	Tipo	pH	Fe	Mn	Zn	Cu	Ni	C	N	P	MPS ¹	Cond. ²
			mg/L ou mg/kg ³									mS/cm
#1	Água	3,2	511	19,35	3,21	0,01	0,34	-	-	-	36,80	3,79
#2	Água	3,2	160	18,69	1,64	0,02	0,32	-	-	-	16,40	3,39
#3	Água	2,7	160	30,48	5,45	0,17	0,90	-	-	-	1,20	3,28
#4	Água	4,2	75	4,28	0,32	0,01	0,06	-	-	-	44,80	1,13
#5	Água	3,8	7,59	1,02	0,32	0,01	0,02	-	-	-	9,31	0,46
#1	Sedimento	3,2	268459	25,07	42,39	0,01	0,48	34230	1900	< 0,05	-	-
#2	Sedimento	3,6	1583	27,48	44,22	28,23	1,68	33090	2400	117,90	-	-
#3	Sedimento	3,6	20350	16,40	8,20	4,80	1,41	43050	1500	38,48	-	-
#4	Sedimento	4,3	16314	15,45	18,47	4,80	2,43	24700	1300	< 0,05	-	-
#5	Sedimento	4,2	52271	9,24	15,61	3,40	4,34	23580	1500	374,31	-	-

¹Material particulado em suspensão (MPS). ²Condutividade elétrica. ³mg/L para amostras de água e mg/kg para amostras de sedimento.

A estação #1 apresentou as maiores concentrações de Fe na água e no sedimento, apesar de a estação #3 apresentar maiores concentrações dos demais metais (Mn, Zn, Cu, Ni) em água. Nos sedimentos as maiores concentrações de Mn, Zn e Cu ocorreram na estação #2 e a maior

concentração de Ni na estação #5. A quantidade de ferro no sedimento da estação #1 representa uma fração de 26,8% do peso da amostra, o que representa um valor extremamente alto para um sedimento.

O TOC nos sedimentos apresentou maior teor na estação #3, seguido das estações #1 e #2. Em relação ao NT as diferenças entre estações foram baixas, com maior concentração na estação #2, seguida da estação #1. A maior concentração de PT no sedimento foi encontrada na estação #5, que recebe a carga de outros efluentes ao longo dos rios Mãe Luzia e Sangão. As estações #1 e #4 apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção analítico.

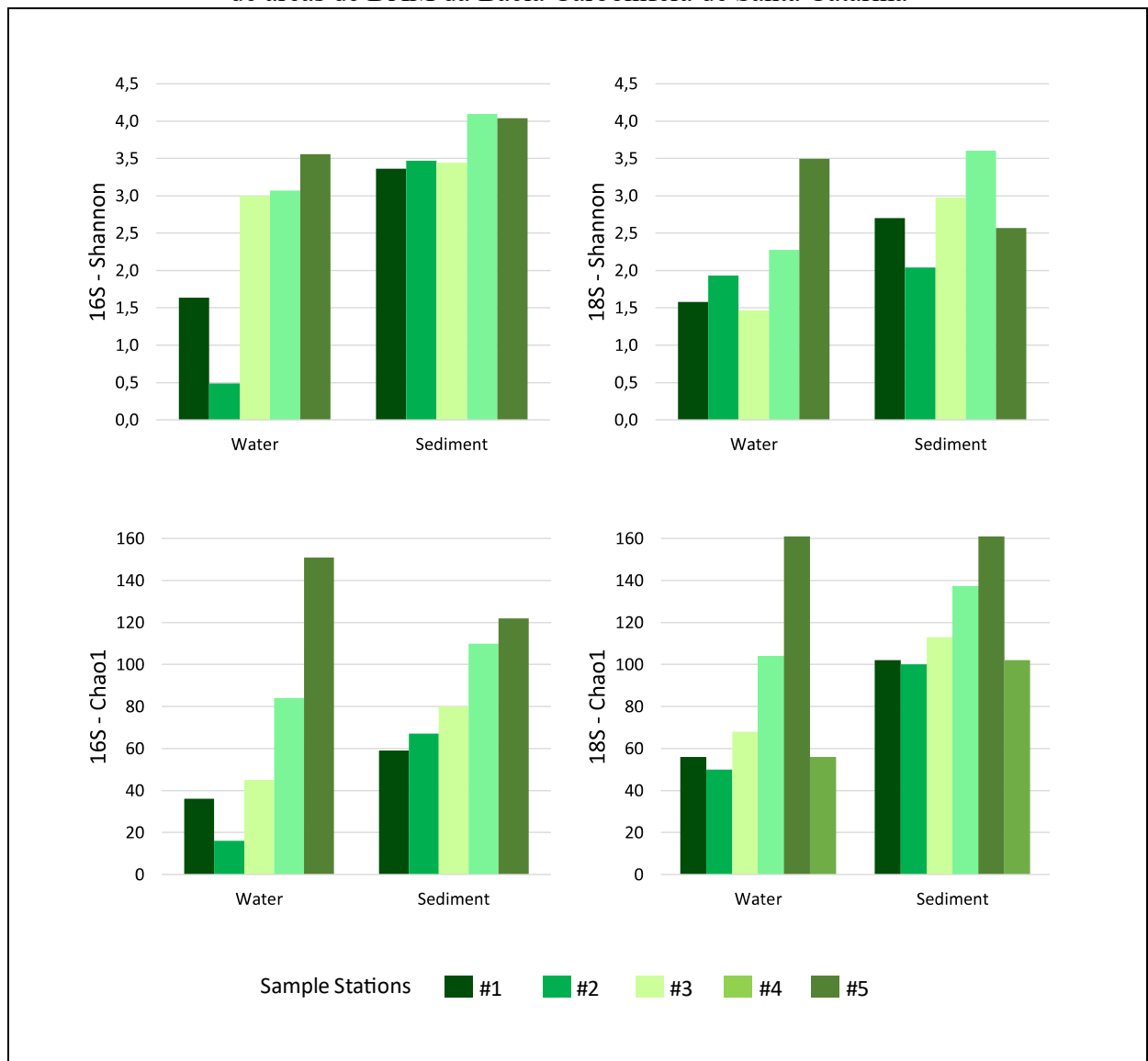
2.4.2 Biodiversidade do microbioma

As análises de meta-taxonômica foram realizadas para descrever a estrutura das comunidades procarióticas (amplicon 16S) e eucarióticas (amplicon 18S) nas amostras de água e sedimentos.

Foram identificadas um total de 525.136 e 687.620 sequências qualificadas foram obtidas para o sequenciamento dos genes 16S e 18S do rRNA, respectivamente. Para tornar as amostras comparáveis e evitar viés devido a diferenças na profundidade de sequenciamento, as sequências foram niveladas com base na amostra com o menor número de sequências (29.149 para 16S e 38.404 para 18S). O número de ASVs obtidas para cada amostra variou de 16 a 51 para 16S e de 18 a 100 para 18S, em 10 amostras para cada gene marcador. A cobertura de sequenciamento foi considerada suficiente para estudo da diversidade, a amostragem cobriu (Cobertura de Good) em média 99% da diversidade de procariontes e eucariontes.

A avaliação de alpha-diversidade pelo índice de Shannon mostrou uma maior biodiversidade de procariontes nas amostras coletadas no sedimento (Figura 9), com maiores valores para as estações #4 e #5. Em relação a água, o maior índice de Shannon de procariontes foi encontrado na estação #5 (junção dos rios), enquanto a estação #2 apresentou o menor valor. Em relação ao índice de Shannon de organismos eucarióticos a maior diversidade ocorreu na amostra #5 para água e na amostra #4 para sedimento, e os menores valores foram encontrados nas águas de bocas de mina das estações #1, #2 e #3. Considerando-se a biodiversidade de ambos os alvos procarióticos e eucarióticos na água e sedimento, os maiores valores foram verificados para as estações #4 e #5, que consistem em uma mina com menor grau de contaminação e água de rio, respectivamente.

Figura 9 - Alpha-diversidade do microbioma (índice de Shannon e Chao1) para organismos procarióticos (16S) e eucarióticos (18S) em amostras de água e sedimento de áreas de DAM da Bacia Carbonífera de Santa Catarina



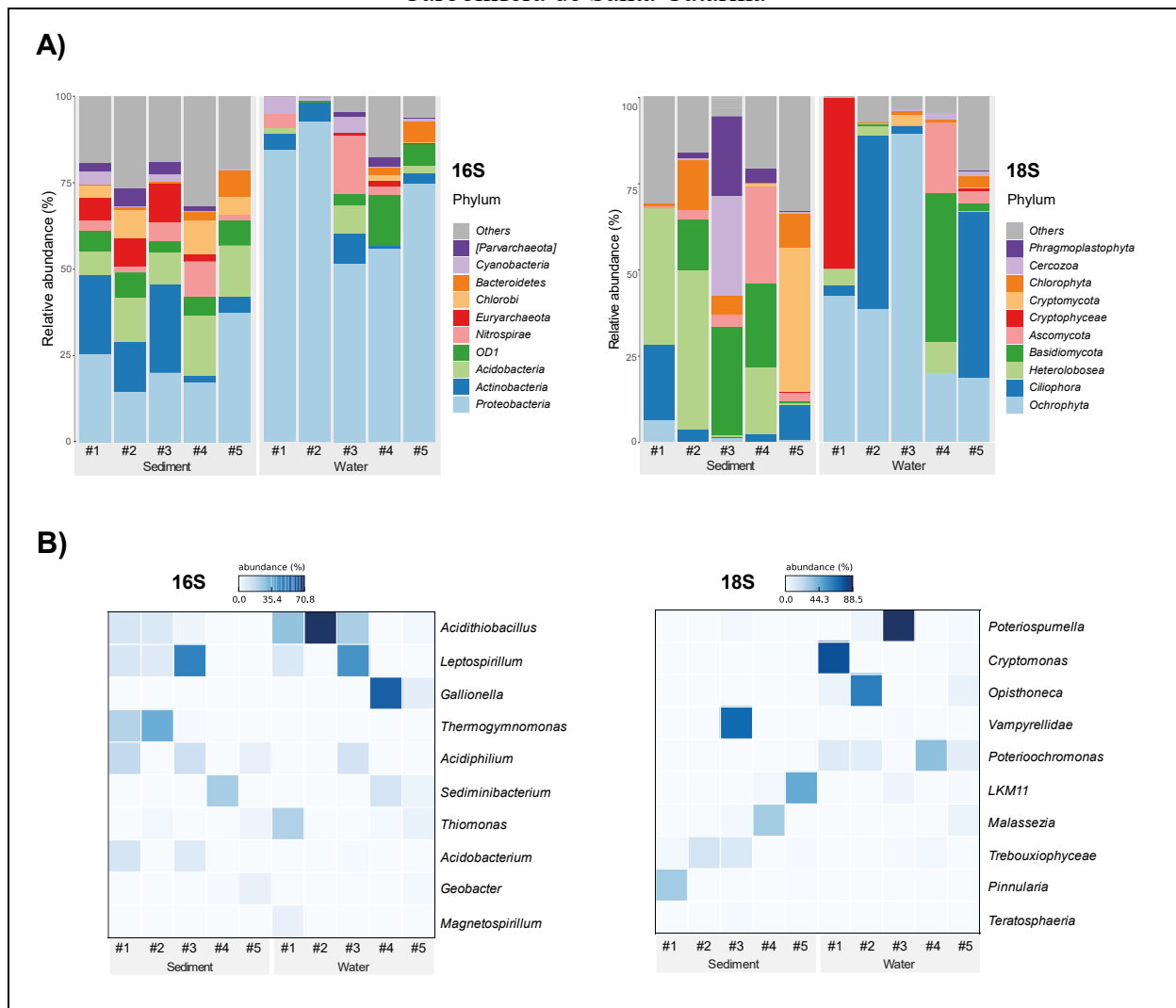
2.4.3 Composição da comunidade

A composição da comunidade microbiana foi avaliada a nível de filos e gêneros e os resultados estão apresentados na Figura 10.

Os filos procarióticos dominantes nas amostras foram Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, OD1, Nitrospirae, Euryarchaeota, Chlorobi, Bacteroidetes e Cyanobacteria. O filo Proteobacteria foi o mais dominante nas amostras de água, com abundância superior a 50% em todas as amostras, chegando a representar 90% na amostra da estação #2. Para as amostras de sedimento o filo Proteobacteria também foi o de maior abundância, mas com uma proporção

menos expressiva (15 a 40%), quando comparado as amostras de água. Ainda para amostras de sedimento os filos *Acidobacteria* e *Actinobacteria* também tiveram uma abundância de destaque. A distribuição de filos taxonômicos nas amostras de sedimento foi mais homogênea e equilibrada do que nas amostras de água. Ao comparar as amostras #1, #2 e #3 no sedimento foi possível verificar padrões similares na distribuição de filos. No entanto, as amostras de água possuem padrões bem variados na abundância de filos, mostrando uma relevante diferença das comunidades entre esses compartimentos.

Figura 10 - Composição da comunidade de organismos procarióticos (16S) e eucarióticos (18S) em amostras de água e sedimento em estações de coleta na Bacia Carbonífera de Santa Catarina



A) Frequência de abundância dos 10 principais filos (para 18S, dados identificados apenas no nível de domínio foram excluídos). B) Frequência de abundância dos 10 principais gêneros.

Os gêneros *Acidithiobacillus* e *Leptospirillum* foram os mais abundantes nas amostras da estação #1, #2 e #3 tanto na água quanto no sedimento, mas apresentaram baixa abundância

na amostra #5 água. O gênero *Acidiphilium* foi relativamente importante nas amostras de água e sedimento da estação #3, e também no sedimento das estações #1 e #5. O gênero *Gallionella* foi o mais abundante na amostra #4 água, e também ocorreu na amostra #5 água. O gênero *Sediminibacterium* esteve presente nas amostras de água e sedimento na estacao #4 e na amostra #5 água. Vale destacar também que o gênero *Thiomonas* foi o segundo mais frequente na amostra #1 água.

A distribuição de filos taxonômicos de organismos eucarióticos apresentou padrões bem diferentes entre as amostras de sedimento e as de água. Para as amostras de água os filos dominantes foram Ochrophyta, Ciliophora, Basidiomycota, Ascomycota e Cryptophyceae. O fato comum em todas amostras de água foi ter o filo Ochrophyta entre os dominantes em praticamente todas amostras, sendo em maior proporção nas estações #1, #2 e #3. O filo Ochrophyta inclui as microalgas Bacillariophyceae, comuns em biofilmes microfítobênticos, de rios e mesmo de ambientes de DAM. As amostras #2 e #5 água apresentaram Ciliophora como filo dominante. Para as amostras de sedimento os filos dominantes foram Heterolobosea, Basidiomycota, Ciliophora, Ascomycota, Cryptomycota, Clorophyta, Cercozoa e Phragmoplastophyta. As amostras #1 e #2 sedimento tiveram maior abundância do filo Heterolobosea, enquanto a amostra #5 teve o filo Cryptomycota como mais abundante. As amostras #3 e #4 tiveram três filos de maior ocorrência em cada uma delas, sendo o filo Basidiomycota comum para ambas.

Em relação aos gêneros de organismos eucariotos, *Poteroispumella* foi o gênero mais abundante para a amostra #3 água, *Cryptomonas* para a amostra #1 água, *Opisthonecta* para amostra #2 água e *Vampyrellidae* para amostra #3 sedimento. O gênero *Poteroiochromonas* foi encontrado em todas amostras de água e nas amostras #1 e #5 de sedimento, a sua maior abundância ocorreu na amostra #4 água.

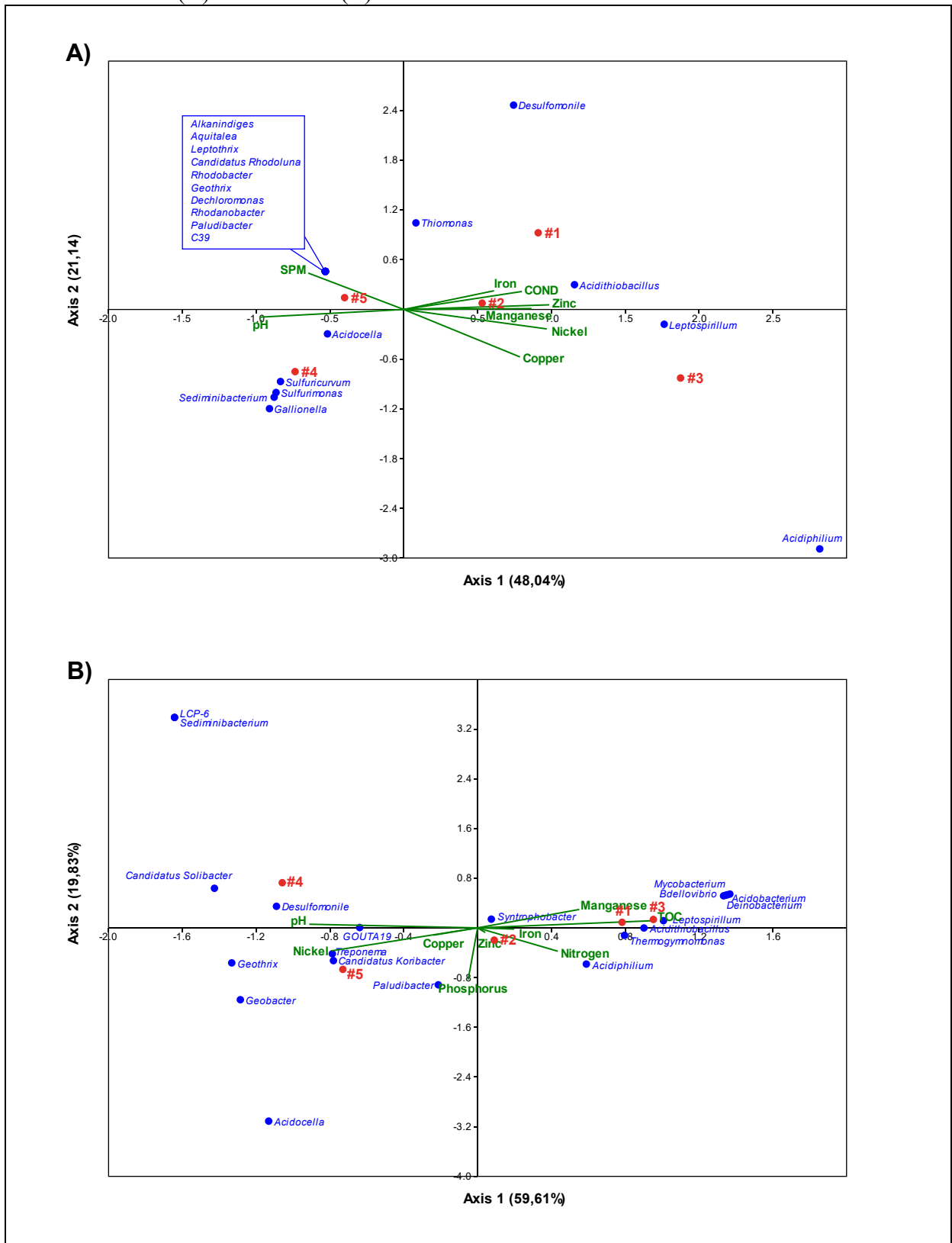
2.4.4 Caracterização físico-químicas vs. Perfis taxonômicos

As análises multivariadas de Correspondência Canônica (CCA) para os organismos procarióticos (16S) são apresentadas na figura 11. É possível verificar que o padrão de separação de amostras é o mesmo para água e para sedimentos, porém os organismos e fatores forçantes na explicabilidade de variância são distintos. Os dados de autovalores (*eigvalue*) e permutação das CCAs estão disponíveis no Apêndice B.

Na CCA envolvendo as amostras de água, onde o primeiro e segundo eixos explicaram, respectivamente, 48,04% e 21,14% da variância, as amostras #4 e #5 mostraram associação com pHs mais elevados e maior concentração de material em suspensão, enquanto as amostras #1, #2, e #3 são caracterizadas por baixo pH, e maiores condutividade e concentrações de Zn, Mn, Ni, Fe e Cu. *Leptospirillum* e *Acidithiobacillus* predominaram nessas amostras mostrando clara associação com essas últimas variáveis. Percebe-se também, embora mais ao nível do segundo eixo e, portanto, com menor explicabilidade na variância, uma nítida separação de dois grupos de táxa, um associado a amostra #4, caracterizada por pHs levemente superiores e outro com a amostra #5, caracterizada por pHs levemente inferiores e maior MPS. Ou seja, novamente o pH foi o principal fator determinante dos gradientes, influenciando positivamente também nas concentrações de metais.

Para as amostras de sedimento (Figura 11B) observa-se, ao nível do primeiro eixo, que explicou 59,61% da variância, que as amostras #4 e #5 se diferenciam das amostras #1, #2 e #3. O principal gradiente que explica essa diferenciação está relacionado ao pH, Ni e Cu, que apresentaram maiores valores nas amostras #4 e #5 e ao TOC, Mn, N e Fe, com maiores valores nas amostras #1, #2 e #3. O pH portanto, se relaciona positivamente com o Ni e Cu e negativamente com TOC, Mn, N e Fe. Os táxa mais associados a acidez foram *Deinobacterium*, *Acidobacterium*, *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus*, *Thermogymnomonas*, *Mycobacterium* e *Bdellovibrium*. Os táxa *Candidatus Solibacter*, *Treponema*, *Geothrix*, *Desulfomonile* e *C. Koribacter* foram mais associados a pHs menos ácidos. O P está associado ao segundo eixo, que explicou 19,83% da variância, sendo menos importante na determinação da composição de táxa e mostrando certa relação com os gêneros *Acidocella* e *Paludibacter*. O Zn, apesar de ser importante na amostra #2, não mostrou ser uma variável importante na definição da composição taxonômica, haja vista seu baixo peso nos dois eixos.

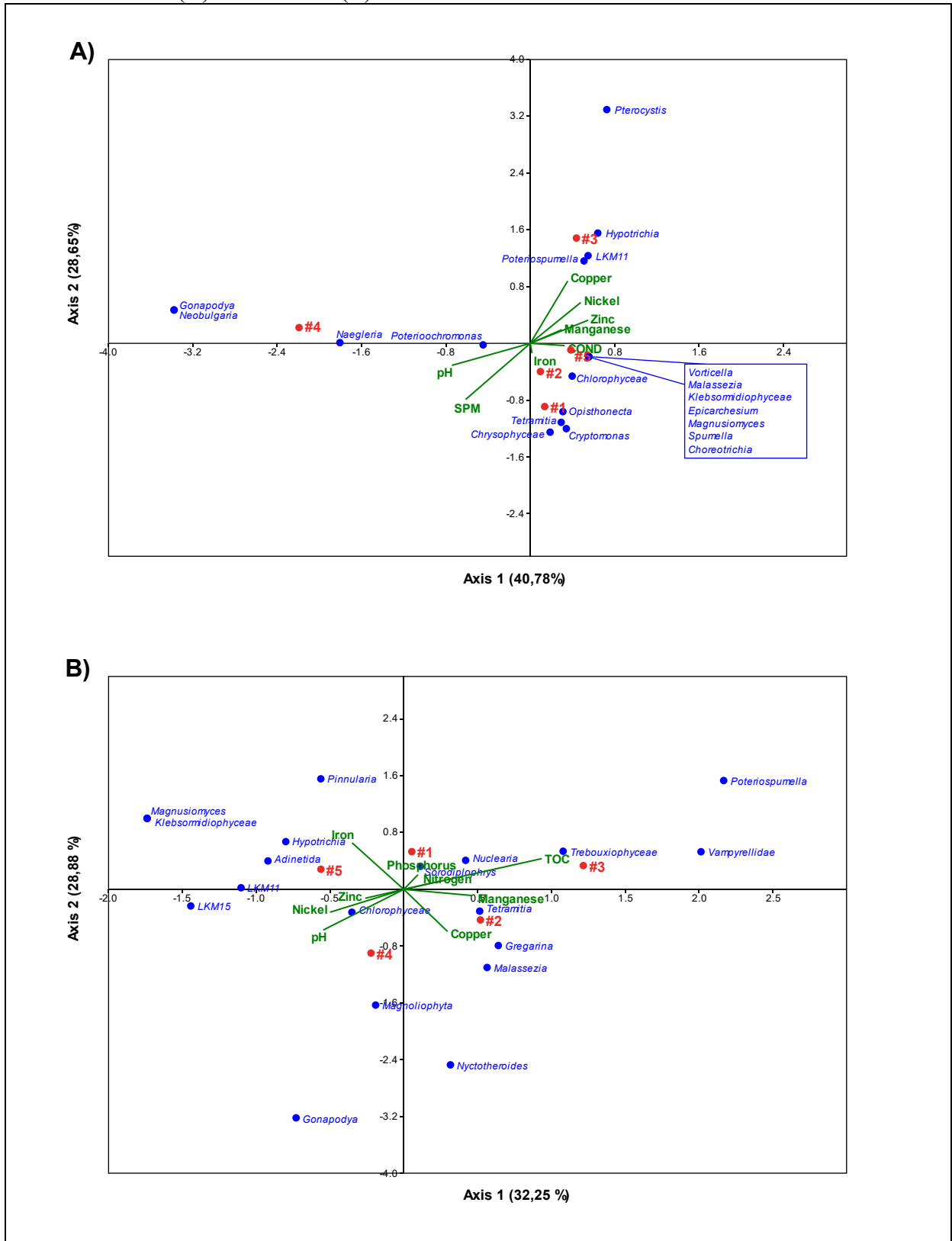
Figura 11 - Análise de Correspondência Canônica com dados abióticos (verde) e de composição de organismos procarionóticos 16S (azul) para amostras (vermelho) de água (A) e sedimento (B) da Bacia Carbonífera de Santa Catarina



As análises multivariadas de Correspondência Canônica para os 20 organismos eucarióticos (18S) mais abundantes são apresentadas na figura 12. Para o compartimento de água a separação de amostras mostrou tendências diferentes das análises anteriores. Ao nível do primeiro eixo, que explicou 40,78% da variância, as amostras #4 e #5 aparecem em posições opostas, sendo a #5 no lado positivo, associada à condutividade, Mn e Zn, e a amostra #4 no lado negativo, associada a pH mais elevado. Para o segundo eixo, que explicou 28,65% da variância, a amostra #3 se posicionou no lado positivo, associada a Ni e Cu, em oposição às amostras #1 e #2 no lado negativo, associadas ao Fe e MPS. Em relação aos organismos, a amostra #4 se caracterizou por maior importância do amebóide *Naegleria* e dos fungos *Gonapodya* e *Neobulgaria*. Do lado oposto, relacionados a amostra #5 aparecem principalmente ciliados (*Epicarchesium*, *Vorticella*, *Choreotrichia*), fungos Magnusiophyces e as algas *Spumella* (Chrysophyceae), Chlorophyceae e Klebsormidiophyceae. Para o segundo eixo, *Potriospumella* (Chrysophyceae), ciliados Hypotricha e fungos LKM11 aparecem no lado positivo, mais associados a amostra #3, enquanto *Cryptomonas*, outras Chrysophyceae, amebóides *Tetramitia* e ciliados *Opisthonecta* aparecem no lado negativo, associados às amostras #1 e #2.

Na CCA 18S para as amostras do sedimento as relações entre variáveis abióticas e taxa foram mais complexas, o que era esperado devido a grande diversidade de grupos de organismos representados, incluindo fungos, algas, ciliados, amebóides, plantas. Porém a separação de amostras e variáveis abióticas foi similar a revelada para 16S. Ao nível do primeiro eixo, que explicou 32,25% da variância, as variáveis que mais influenciaram a distribuição foram o Mn, o TOC e o N, associadas as amostras #2 e #3, em oposição o Ni e Zn, associados às amostras #4 e #5. O peso do pH nessa análise foi menor e mais associado ao segundo eixo, que explicou 28,88% da variância, juntamente com o Cu, em oposição ao Fe e ao P. A amostra #1, mais associada ao segundo eixo, se separou das demais devido a seus valores mais elevados em P. Em relação aos organismos, as algas *Potriospumella* e Trebouxiophyceae, juntamente com os amebóides Vampyrellidae se mostraram associados com o TOC, Mn e N e às amostras #2 e #3, em oposição às algas Klebsormidiophyceae e aos fungos do grupo LKM11 e Magnusiomyces, associados ao Zn, Ni e pH mais elevado e às amostras #4 e #5. Ao nível do segundo eixo, do lado negativo, mais associados à amostra #4, apareceram as plantas (Magnoliophyta), os fungos *Gonapodya* e *Malassezia*, os ciliados Nictotheroides e os alveolados *Gregarina*. No lado positivo do segundo eixo destacaram-se a diatomácea *Pinnularia* e ciliados Hypotricha.

Figura 12 - Análise de Correspondência Canônica com dados abióticos (verde) e de composição de organismos eucarióticos 18S (azul) para amostras (vermelho) de água (A) e sedimento (B) da Bacia Carbonífera de Santa Catarina



2.5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou pela primeira vez a composição microbiana de águas e sedimentos da Bacia Carbonífera de Santa Catarina (BCSC), no sul do Brasil, através de análises genômicas, relacionando essas informações com dados abióticos medidos em paralelo. A BCSC, como todas as áreas afetadas por rejeitos de mineração, apresenta ecossistemas aquáticos severamente impactados, primariamente, por amplas alterações de pH, o que exerce forte pressão seletiva na estrutura das comunidades biológicas (NOVIS; HARDING, 2007). O pH, por sua vez, gera uma série de efeitos em cascata sobre a geoquímica dos ambientes, proporcionando a lixiviação e mobilização de metais tóxicos da matriz geológica, a produção de elevadas concentrações de sulfatos, além de afetar a concentração de nutrientes inorgânicos e orgânicos e a disponibilidade de gases (GRAY, 1997). Apesar dos impactos determinarem diminuição da diversidade de micro-organismos, foi possível detectar muitas espécies adaptados as condições extremas da DAM, o que sugere um versátil arcabouço genômico.

O procedimento amostral executado tentou cobrir áreas com diferentes características em relação à contaminação com DAM, justamente para tentar evidenciar os principais contrastes na biodiversidade, uma vez que se trata de uma primeira abordagem genômica na região. As diferenças foram sensíveis, sendo o pH e alguns metais os principais determinantes dessas diferenças.

A estação #1, também chamada de Língua do Dragão, é o local de maior preocupação ambiental na região devido a alta vazão e concentração elevada de Fe. Esta área já foi alvo de outros estudos que avaliaram a composição geológica e relataram a origem do Fe. Em um estudo com a metodologia de *Raman spectroscopy* a maior composição de seu sedimento foi dada por goetita ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), seguida por jarosita ($\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$), calcita (CaCO_3) (SILVA; WOLLENSCHLAGER; OLIVEIRA, 2011). Os valores encontrados no sedimento e na água foram extremamente elevados. Para questões de referencia a resolução nacional (Resolução CONAMA n°357/2005) prevê a água de uso para irrigação, dessedentação de animais e harmonia paisagística prevê no máximo 5,0 mg/L de Fe e 0,5 mg/L de Mn, enquanto a *World Health Organization* (WHO) determina que a concentração máxima permitida em água potável é de 0,3 mg/L de Fe e 0,2 mg/L de Mn (HERSCHY, 2012). Na estação #1, a concentração de Fe extrapola a resolução CONAMA n°357/2005 em mais de 100 vezes, e mais de 38 vezes para a concentração de Mn.

As altas concentrações de metais e ácidos contidos na DAM são extremamente prejudiciais a todos os ecossistemas vicinais às áreas de mineração. Esses resíduos são lixiviados para rios, lençóis freáticos e, inclusive ambientes marinhos, estendendo os efeitos da contaminação por metais (OYETIBO et al., 2021). Prova disto, é a amostra da estação #5 que compreende a junção de dois rios que cruzam as cidades da bacia hidrográfica do rio Araranguá, e ainda apresenta pH muito baixo e altas concentrações de metais. A concentração de Fe nesta estação é 25 vezes superior a indicada pela WHO e 1,5 vezes superior ao indicado pela resolução CONAMA n°357/2005, considerando os mesmos usos acima, fato que expõe o nível de risco ambiental da região e a necessidade de mitigações. Um fato que chama atenção nesta estação é que a concentração de Fe no sedimento do rio foi uma das maiores avaliadas, enquanto a da água foi a menor. Isto pode ocorrer devido a entrada de efluentes de esgoto doméstico ao longo do rio. Alguns estudos evidenciaram que o encontro de DAM com esgoto promove uma série de reações biogeoquímicas. O Fe em grande quantidade na DAM atua como coagulante nos resíduos de esgoto, fazendo com que parte dos metais precipite junto com resíduos sólidos, promovendo assim um aumento de pH, redução de metais na solução, e ainda a diminuição da demanda bioquímica de oxigênio e concentração de P (HUGHES; GRAY, 2013; STROSNIDER et al., 2013). Os rios que se encontram a poucos metros a montante da estação #5, possuem características distintas. O rio sangão recebe maior aporte de DAM e de esgoto que o rio Mãe Luzia, que recebe um maior aporte de DAM. Esses processos podem ao menos em parte explicar a maior concentração de P no sedimento da estação #5.

A maior alpha-diversidade evidenciada em quase todas amostras de sedimento em comparação as amostras de água, foi também verificada em um estudo de diversidade procariótica na mina de São Domingos, Portugal (CARLIER et al., 2020). A explicação dos autores, que pode se estender ao presente estudo, é que as condições físico-químicas são homogêneas na água, enquanto nos sedimentos podem ser gerados micronichos com diferentes condições físico-químicas, favorecendo a maior diversidade microbiana. Microcamadas diferenciadas de minerais no leito dos corpos d'água e o acúmulo de orgânicos que precipitam podem causar o estabelecimento de comunidades microbianas estratificadas nos sedimentos próximos à interface água-sedimento (CARLIER et al., 2020). Na estação #5 a alpha-diversidade eucariótica foi maior na água que no sedimento, o que pode estar relacionado ao descrito anteriormente sobre a entrada de esgoto doméstico no rio, gerando mais condições para a proliferação de organismos de diferentes nichos, especialmente os eucariotos fotoautotróficos (microalgas) e heterotróficos (protozoários e fungos). Além disso, as estações #1, #2 e #3

tiveram a ocorrência de grupos dominantes o que diminui a equitabilidade de espécies na amostra, diminuindo assim o índice de Shannon.

As condições de acidez e toxicidade encontradas em ambientes de mineração induzem respostas adaptativas dos micro-organismos para sobreviverem nestes ambientes (AYANGBENRO; OLANREWAJU; BABALOLA, 2018). Devido a isso, os índices de diversidade ecológica encontrados neste estudo são menores que os encontrados em outros ambientes como solo, sedimento ou água de locais conservados (RAMBABU et al., 2020; WALTERS; MARTINY, 2020). Desta forma, apenas poucos táxa especializados como os citados neste trabalho sobrevivem nestes ambientes.

A dominância do filo Proteobacteria em ambientes de DAM foi citada em outros estudos (ETTAMIMI et al., 2019; GIDDINGS et al., 2020; HUA et al., 2014; KUANG et al., 2013; VILLEGAS-PLAZAS; SANABRIA; JUNCA, 2019). As proteobactérias geralmente dominam em DAM devido à sua plasticidade metabólica, que inclui oxidantes de ferro e enxofre que crescem sob condições de baixo pH e ricas em metais (GIDDINGS et al., 2020). Da mesma forma, actinobactérias foram relatadas em outros ambientes de DAM (KUANG et al., 2013). Tanto as Proteobactérias quanto as Actinobactérias prosperam em diversos sedimentos e desenvolveram mecanismos para habitar ambientes ricos em metais (GIDDINGS et al., 2020). Membros do filo Nitrospirae participam da oxidação e fixação de amônio em baixo pH e ambiente oligotrófico e, posteriormente, desempenham um papel importante no processo de nitrificação no sedimento das áreas impactadas com DAM (GIDDINGS et al., 2020). Assim como ocorreu nos ambientes estudados, informações coletadas das comunidades bacterianas que dominam diversos ambientes poluídos por DAM mostram que Proteobacteria, Nitrospirae, Acidobacteria, Chloroflexi e Actinobacteria são os filos dominantes (KUANG et al., 2013; LUKHELE et al., 2019; MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015; MUNYAI; OGOLA; MODISE, 2021).

Os gêneros relatados como os mais comuns em ambientes de DAM são *Acidithiobacillus* (AULD et al., 2013; GÓMEZ-VILLEGAS et al., 2022; WANG et al., 2019), *Leptospirillum* (GÓMEZ-VILLEGAS et al., 2022; HUA et al., 2014), *Acidiphilium* (GÓMEZ-VILLEGAS et al., 2022; MUNYAI; OGOLA; MODISE, 2021), *Gallionella* (HE et al., 2007), *Thermogymnomonas* (MESA et al., 2017) e *Sediminibacterium* (ETTAMIMI et al., 2019). Nos dados de compilação deste estudo, esses gêneros representam 37% em amostras de água e 47% nas amostras de sedimento. Dentro da diversidade de comunidades microbianas que habitam a água da DAM, as bactérias acidófilas sulfurosas e/ou oxidantes de ferro são os grupos

predominantes. A natureza ácida e a alta concentração de metais dissolvidos exercem forte pressão seletiva sobre os micro-organismos, favorecendo gêneros que desenvolveram múltiplos mecanismos de resistência ao estresse para lidar com as condições ambientais extremas (MATHIVANAN et al., 2021).

Acidithiobacillus e *Leptospirillum* foram os gêneros mais ocorrentes em todos ambientes avaliados com pH inferior a 3.8. Estes organismos são quimiolitotóxicos obrigatórios ou facultativos amplamente encontrados em ambientes de DAM. O gênero *Acidithiobacillus* é um importante representante das bactérias oxidantes de enxofre. As espécies deste gênero são bactérias Gram-negativas autotróficas, podem fixar tanto carbono quanto nitrogênio da atmosfera, utilizando compostos de enxofre reduzido como fonte primária de energia e gerando as espécies oxidadas de enxofre correspondentes (WANG et al., 2019). Algumas espécies do gênero também são capazes de oxidar ferro ferroso em ferro férrico ou crescer anaerobicamente, usando ferro férrico como aceptor final de elétrons (WANG et al., 2019). As espécies mais abundantes deste gênero nas amostras do presente estudo foram *A. ferriphilus* e *A. ferrooxidans* que, além de sulfetos e outros compostos sulfurados, são capazes de oxidar ferro ferroso a férrico, sendo importantes contribuintes para os ciclos biogeoquímicos do Fe e do S (AULD et al., 2013; GÓMEZ-VILLEGAS et al., 2022; WANG et al., 2019).

O gênero *Leptospirillum* inclui diferentes espécies oxidantes de ferro, cujo papel no ambiente ácido tem ganhado cada vez mais reconhecimento (GÓMEZ-VILLEGAS et al., 2022; HUA et al., 2014). Reconstruções metabólicas sugerem que *Leptospirillum* pode realizar a fixação de carbono através do novo ciclo redutivo do ácido tricarbóxico (MONTROYA et al., 2012) e foi encontrado como o principal fixador de nitrogênio em sistemas de DAM (HUA et al., 2014; VILLEGAS-PLAZAS; SANABRIA; JUNCA, 2019).

No presente estudo, o gênero *Acidiphilium* foi mais frequente nas amostras de menor pH e apresentou correlação positiva com Fe e Cu. *Acidiphilium* é um gênero acidófilo versátil, geralmente encontrado em ambientes de DAM (GÓMEZ-VILLEGAS et al., 2022; LI et al., 2020; MUNYAI; OGOLA; MODISE, 2021). Do ponto de vista metabólico, a maioria dos *Acidiphilium* spp. são heterotróficos aeróbicos que utilizam compostos orgânicos para obter carbono e energia, embora muitos possam obter alguma energia extra a partir da oxidação mixotrófica do ferro ferroso (GÓMEZ-VILLEGAS et al., 2022). Além disso, alguns membros do gênero foram descritos como capazes de reduzir Fe^{3+} em condições anaeróbicas ou microaerófilas, ou realizar assimilação fotossintética de CO_2 (KISKOVÁ et al., 2018). Hua

et al. (2014) argumentaram que a presença do gênero *Acidiphilium* facilita o domínio de outras espécies ao degradar substâncias orgânicas tóxicas.

Nas amostras de água das estações #4 e #5, que apresentaram baixas concentrações de metais e o pH em 4.25 e 3.8, respectivamente, é possível ver alta abundância do gênero *Gallionella*. Organismos deste gênero são oxidantes de Fe neutrofilicos e quimiolitotróficos, que habitam ambientes relativamente pobres em nutrientes, contendo ferro reduzido (HE et al., 2007). Adicionalmente, a oxidação do ferro pode ser efetuada principalmente por *Gallionella* spp. em ambientes com pouco oxigênio (HE et al., 2007). Outro gênero abundante na água das estações #4 e #5 e no sedimento da estação #4 foi *Sediminibacterium*. Este gênero também foi encontrado como um dos mais abundantes em área de transição de mineração com pH de 6.4 (CARLIER et al., 2020; ETTAMIMI et al., 2019).

As amostras de sedimento das estações #1, #2 e #3 apresentaram abundância do gênero *Thermogymnomonas*, uma arquea que pertence ao filo Euryarchaeota. A espécie é obrigatoriamente aeróbia e heterotrófica. Em Los Ruedos, *Thermogymnomonas* spp. foram abundantes em todas as amostras com características químicas compatíveis com seu nicho como aeróbio obrigatório heterotrófico (ITOH; YOSHIKAWA; TAKASHINA, 2007; MESA et al., 2017).

Conforme destacado acima, as comunidades procarióticas das estações #1, #2 e #3 mostraram-se similares às de outros ambientes de DAM com características severas, onde prevalece a baixa biodiversidade. Além disso, nestas estações ocorre uma comunidade com grupos taxonômicos especializados em realizar a reciclagem biogeoquímica de Fe, S, N, C e O. Já as estações #4 e #5 apresentam algumas características de maior biodiversidade e alguns grupos taxonômicos normalmente encontrados em ambientes com menor impacto de acidez.

Os resultados para a comunidade eucariótica indicaram que a diversidade de eucariotos nas amostras avaliadas também foi relativamente baixa, a exemplo do verificado para archaea e bactérias, um fato semelhante ao encontrado em biofilmes em Richmond Mine at Iron Mountain, EUA (BAKER et al., 2009). A associação do domínio Eukarya com DAM foi relatada em menor grau quando comparada com Bactérias (OYETIBO et al., 2021). Diatomáceas do filo Ochrophyta, como o gênero *Poteriospumella* (GÓMEZ-VILLEGAS et al., 2022) e *Pinnularia* (AGUILERA, 2013), foram relatadas anteriormente nas águas do Rio Tinto, Espanha. Espécies pertencentes a esses gêneros, especialmente *Pinnularia*, são bastante difundidas em ambientes com valores de pH em torno de 3,0 (AGUILERA, 2013). De todas as variáveis ambientais que afetam as diatomáceas de água doce, o pH parece ser o mais

importante e, a maioria dos taxa mostra uma preferência por uma faixa estreita de pH (AGUILERA, 2013). Esta característica foi observada nas amostras de água #1, #2 e #3, que mostraram alta dominância de eucariotos fotossintéticos.

Fungos dos filos Basidiomycota e Ascomycota também foram encontrados na Richmond Mine at Iron Mountain, EUA (BAKER et al., 2009). O clado de fungos ambientais LKM11 pertence a um grupo localizado próximo à raiz filogenética do reino Fungi, Rozellomycota (LARA; MOREIRA; LÓPEZ-GARCÍA, 2010). A reconstrução da filogenia indicou que o grupo LKM11 compartilhava alta similaridade com fungos *Paramicrosporidium*, que são parasitas endonucleares de amebas de vida livre (MESA et al., 2017).

Gómez-Villegas et al. (2022) descreveram a existência de ciliados (filo Ciliophora), amebas e outros predadores protistas no rio Tinto. Protistas do filo Heterolobosea foram igualmente encontrados em *Richmond Mine at Iron Mountain*, EUA (BAKER et al., 2009). O gênero identificado nesse filo de maior abundância foi *Naegleria*. Este eucarioto é relatado como um grupo adaptado à vida no ambiente hostil de DAM (BAKER et al., 2009).

É interessante notar a prevalência de organismos fotossintéticos, fungos, ciliados e protistas nas amostras. A grande maioria de organismos fotossintéticos foram encontrados na água como já esperado, uma vez que precisam de luz para a realização da fotossíntese. Enquanto que a maior quantidade de fungos e protistas foram encontrados em sedimento, onde possuem maior quantidade de matéria orgânica e nutrientes e, normalmente, menor irradiância. Os eucariotos fotossintéticos desempenham um papel fundamental na formação de oxigênio atmosférico, o que poderia favorecer a oxidação aeróbica de Fe e S (GONZÁLEZ-TORIL et al., 2011). Os fungos, amplamente representados por Ascomycota e Basidiomycota, são encontrados principalmente em biofilmes subsuperficiais de baixo pH que prosperam em DAM participando da ciclagem do C como os principais decompositores na comunidade microbiana da DAM (OYETIBO et al., 2021). As amebas são herbívoros secundários no ecossistema de DAM (MESA et al., 2017; VOLANT et al., 2016). Os ciliados, podem impactar a abundância de bactérias e archaea e, portanto, a composição da comunidade e sua função (MESA et al., 2017).

Apesar do pequeno número de amostras avaliadas, as análises de correspondência canônica realizadas mostraram com clareza e boa explicabilidade de variância as principais relações entre a composição dos principais grupos de organismos e as variáveis ambientais, seja nos diferentes compartimentos (água e sedimento) como nos grupos procariotos (16S) e eucariotos (18S).

É possível verificar que a maioria dos organismos procarióticos e eucarióticos mais abundantes foram associados com a água do ambiente da amostra #5, que se refere ao rio com menor poluição por metais pesados e que visivelmente possui maior carga de esgotos. Este é um fato esperado, já que é a condição de ambiente menos hostil entre as avaliadas, e, portanto, menos tóxico para a sobrevivência dos organismos.

A diversidade procariótica foi bastante distinta entre os locais com diferentes níveis de contaminação, evidenciando a prevalência de alguns grupos de organismos que, podem servir como bioindicadores das condições de ambientes de mineração. Os gêneros *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Thiomonas*, *Thermogymnomonas* e *Acidobacterium* são os grupos taxonômicos de maior destaque em ambientes impactados, correlacionados com menor pH e maior concentração de Fe. Alguns desses grupos já foram identificados como grupos associados com maior impacto de contaminação por DAM como os gêneros *Acidiphilium*, *Acidibacter* e *Acidobacterium* encontrados em ambientes baixo pH (abaixo de 3) na área de mineração de São Domingos, no sul de Portugal (CARLIER et al., 2020; ETTAMIMI et al., 2019). Já os gêneros *Acidocella*, *Sediminibacterium*, *Geothrix*, *Geobacter* e *Gallionella* se correlacionaram com os ambientes mais amenos, caracterizados como ambientes de transição de poluição por DAM. Os grupos *Sediminibacterium* e *Gallionella* como já mencionados são característicos de áreas de transição (ETTAMIMI et al., 2019; HE et al., 2007); *Geothrix* e *Geobacter* são bactérias anaeróbicas redutoras de sulfato, encontradas em ambientes com fracas condições de acidez em mineração de carvão (CHEN et al., 2021).

Entre os organismos eucarióticos encontrados em água, *Potriospumella* (Chrysophyceae), ciliados Hypotricha e fungos LKM11 foram associados às condições de maior contaminação (menor pH e maior concentração de Cu, Ni, Zn e Mn) de DAM. A subclasse *Hypotrichia* pertence ao grupo de ciliados, e já tem sido previamente associada a ambientes de lagos ácidos de mineração (WEISSE et al., 2013). Já no sedimento, novamente as algas *Potriospumella* junto com as algas Trebouxiophyceae e os amebóides Vampyrellidae se mostraram associados aos ambientes de maior impacto. A correlação de organismos procariontes em ambientes de maior contaminação por DAM é bem estabelecida, conforme foi relatado previamente, mas para organismos eucariontes, existem poucos estudos, o que mostra a relevância de se entender melhor esses grupos de eucariontes e até mesmo explorar seu uso para processos de biotecnológicos e biorremediação.

Um dos fatos que chamou a atenção foram os grupos relacionados ao sedimento com maior concentração de cobre, a citar o *Tetramitia* que é um protista, *Gregarina* um organismo

unicelular do filo Apicomplexa, considerado parasita de muitos invertebrados e *Malassezia* que é uma levedura. O Cu é um metal tóxico para a maioria dos eucariontes, para sobreviver à concentrações mais altas, é necessário desenvolver mecanismos de resistências. Estes mecanismos são mais difundidos em procariontes, mas em eucariontes, são poucas estratégias encontradas, uma das formas encontradas em fungos e leveduras no trabalho de Antsoetgi-Uskola et al. (2020), é o sequestro de Cu por metalotioneínas, sequestro extracelular por EPS e síntese de agentes quelantes.

Assim como o Cu, a concentração de Fe foi relacionada com a prevalência de alguns organismos eucarióticos no sedimento dos ambientes avaliados. Em locais como a estação #1 que apresenta 26% de Fe no sedimento, os organismos necessitam mecanismos de resistência a esse metal para sobreviver. Assim, para alcançar a homeostase eficaz do , devem equilibrar sua necessidade de eliminar eficientemente esse metal do ambiente para garantir que os suprimentos adequados sejam mantidos, com o gerenciamento cuidadoso dos níveis de Fe livre celular para se proteger contra a toxicidade (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003; TOUATI, 2000).

Os resultados deste estudo são ricos para o entendimento das populações procariontes e eucariontes existentes em ambientes de mineração de carvão na BCSC. É interessante ver que ambientes de mineração do mesmo minério (carvão) em uma localidade geográfica muito próxima, compartilhando do mesmo clima, apresentaram características abióticas, de biodiversidade e populacional distintas.

2.6 CONCLUSÕES

Como um primeiro estudo meta-taxonômico de procariontes e eucariontes de sedimento e água na área de mineração da BCSC, este trabalho contribuiu para entender melhor o impacto da DAM nesses ecossistemas. Revelou que diferenças na composição das comunidades podem distinguir os locais altamente contaminados com DAM (pH 2.7-3.6) dos locais com níveis intermediários de contaminação (pH 3.8-4.25), indicando possíveis bioindicadores. Para a localidade da BCSC foram encontrados como bioindicadores de áreas impactadas altamente impactada por DAM (baixo pH e alta concentração de metais) os gêneros procariontes, *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Thiomonas*, *Thermogymnomonas* e *Acidobacterium*; e eucariontes a alga *Poteroispumella* (Chrysophyceae), ciliados Hypotricha e fungos LKM11. Para ambientes de transição, com fracas condições de acidez e metais em DAM, os gêneros que possuem indícios como bioindicadores são *Sediminibacterium*, *Gallionella* *Geothrix* e *Geobacter*.

O compartimento de sedimento apresentou maior concentração de metais que se deposita pela precipitação, do que o ambiente de água. A variação do pH foi o fator que melhor determinou a composição da comunidade procarionte, enquanto para a comunidade eucarionte, a concentração de nutrientes (TOC e N) e de metais (Ni, Cu, Mn e Zn) apresentaram a melhor explicabilidade sobre a composição da comunidade.

O filo Proteobacteria que abriga várias bactérias oxidantes de enxofre foi o mais abundante em todas amostras, sendo uma característica marcante nestes ambientes de DAM. Já os organismos eucariontes apresentaram uma grande diversidade de filos como os organismos fotossintéticos (Ochrophyta, Chlorophyta e Cryptophyceae), fungos (Basidiomycota, Ascomycota e Cryptomycota), ciliados (Ciliophora) e protistas (Heterolobosea, Cercozoa).

3 CAPÍTULO 2

Microbioma associado à superfície de algas filamentosas extremófilas de drenagem ácida de minas da Bacia Carbonífera de Santa Catarina (Sul do Brasil)

Estácio Jussie Odisi^{1,2}, Robert Cardoso de Freitas², Diego Serrasol do Amaral¹, Saulo Britto², Marcus Adonai Castro da Silva³, William de Oliveira Sant'Ana⁴, André Oliveira de Souza Lima³, Leonardo Rubi Rörig^{1*}

¹ Laboratory of Phycology, Department of Botany, Federal University of Santa Catarina (LAFIC – UFSC), Florianópolis, Campus Universitário Trindade, Caixa postal 476, Florianópolis - SC - 88040-900 - Brazil

²Biome4All, São Paulo - SP 01419-909, Brazil.

³Center for Earth and Sea Technological Sciences, University of Vale do Itajaí (UNIVALI), Rua Uruguai, 458, Itajaí – SC - 88302-202 - Brazil.

⁴SATC Technological Center, Beneficent Association of the Santa Catarina Coal Industry (SATC), Pascoal Meller St. 73, Criciúma – SC – Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55 (48) 3721-4769; fax: +55 (48) 3721-9672.

E-mail address: leororig@gmail.com.

3.1 RESUMO

As atividades de mineração exercem uma influência significativa no ambiente, dando origem a fenômenos como a Drenagem Ácida de Mina (DAM), caracterizada pela sua extrema acidez ($\text{pH} < 4$), níveis reduzidos de oxigênio dissolvido e elevadas concentrações de metais e sulfatos. Em resposta a essa realidade, a investigação da diversidade biológica nesses ambientes a nível molecular se mostra fundamental, tanto para a compreensão dos processos de adaptação e mecanismos com potencial aplicação em biorremediação e bioprospecção, destacando-se o estudo dos microbiomas associados a algas filamentosas. Neste trabalho foram caracterizadas as comunidades procarióticas e eucarióticas que colonizam a superfície de algas filamentosas extremófilas, além de amostras de água e sedimento coletadas em uma área contaminada por DAM na Bacia Carbonífera de Santa Catarina (BCSC), região sul do Brasil. Para atingir esse objetivo, foram empregadas técnicas de meta-taxonômica com base em amplicons dos genes 16S e 18S. As algas filamentosas encontradas nesses ambientes se notabilizaram por sua extraordinária capacidade de acumulação de metais pesados (apresentando 9,8% de ferro na biomassa), e por prosperar em condições de pH extremamente ácido (2,25). Os gêneros *Ferrovum*, *Acidithiobacillus* e *Leptospirillum* se apresentaram como os potenciais microorganismos responsáveis pela formação da DAM neste ambiente a partir da oxidação de Fe e S. O microbioma de superfície algal possui em sua composição uma grande frequência da microalga *Pumilosphaera acidofila* e da bactéria *Acidiphilium*, que podem estar associados a fonte de carbono gerada pelas algas, criação de zonas anóxicas e produção de alcalinidade biogênica. Além disso, o fungo *Aspergillus penicillioides* pode participar de forma ativa neste processo através da formação de exopolissacarídeos sobre a estrutura da alga filamentosa. É possível verificar que o potencial de biorremediação das algas filamentosas se estende ao microbioma associado à sua superfície que possui interações importantes para os processos de imobilização de metais e alcalinização do ambiente.

Palavras-chave: meta-taxonomia, biorremediação, exopolissacarídeos, metais pesados, 16S/18S.

3.2 INTRODUÇÃO

As atividades de mineração, motivadas pela crescente urbanização e demanda por recursos minerais e energéticos, exercem uma influência substancial no ambiente. Um dos impactos mais notáveis é a Drenagem Ácida de Mina (DAM), caracterizada por sua extrema acidez ($\text{pH} < 4$), baixos níveis de oxigênio dissolvido e altas concentrações de metais e sulfatos (AYANGBENRO; OLANREWAJU; BABALOLA, 2018; DAS et al., 2009). Tais características afetam negativamente os ecossistemas aquáticos, causando perda de habitats, toxicidade e limitação a uma gama de formas de vida (RAMBABU et al., 2020). A geração de DAM resulta da oxidação de minerais sulfetados, como a pirita, acelerada pela exposição a oxigênio, água e micro-organismos durante atividades de mineração (CARLIER et al., 2020; WU et al., 2021), onde bactérias acidófilas oxidantes desempenham um papel fundamental nesse processo (HALLBERG, 2010). A composição da DAM varia de acordo com fatores locais como a geologia, microclima, comunidades microbianas e fontes de água (RAMBABU et al., 2020; SIMATE; NDLOVU, 2014). Esses impactos ambientais são significativos em locais de mineração ativos ou abandonados, onde um planejamento inadequado de desativação pode agravar a situação (NEFF; DENICOLA; MALTMAN, 2021).

O Brasil apresenta uma considerável área de mineração ativa, ocupando a 14ª posição em um levantamento realizado em 2018 (MAUS et al., 2020). A região sul do país, em particular o estado de Santa Catarina, destaca-se como um importante pólo de mineração, sobretudo na extração de carvão mineral, atividade que já conta com mais de 140 anos de história na Bacia Carbonífera de Santa Catarina (BCSC) (RANGEL et al., 2016; SILVA; WOLLENSCHLAGER; OLIVEIRA, 2011). Esta área enfrenta desafios significativos relacionados à DAM, originada de mais de 134 minas a céu aberto, abrangendo cerca de 2.964 hectares, incluindo áreas de deposição de resíduos, lagos ácidos e minas subterrâneas (SILVA et al., 2013), sendo estimado que existam mais de 1000 minas abandonadas na BCSC (LATTUADA et al., 2009).

Embora o pH baixo e as altas concentrações de metais sejam restritivos para a maioria da vida aquática, observa-se frequentemente associações de algas compostas por espécies de *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Cyanidium*, *Dunaliella*, *Euglena*, *Klesormidium*, *Microspora*, *Mougeotia*, *Ulothrix*, *Stigeoclonium*, *Zygnema* e *Microthammion* (AMARAL ZETTLER et al., 2002; FREITAS; SCHNEIDER; SCHWARTZBOLD, 2011; LÓPEZ-ARCHILLA; MARIN; AMILS, 2001; MASSOCATO et al., 2018; NIYOGI; LEWIS JR.; MCKNIGHT, 2002; NOVIS,

2019; VERB; VIS, 2001). Estudos prévios realizados pelo Laboratório de Ficologia (LAFIC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) na região da BCSC identificaram 22 espécies de microalgas, abrangendo algas verdes, diatomáceas, crisofíceas e euglenóides. Algumas dessas espécies, como as cepas de *Euglena mutabilis* e *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004, foram isoladas e estão mantidas no cepário do LAFIC para pesquisas biotecnológicas (SOUZA et al., 2017).

Essas algas contribuem para a produção aprimorada de oxigênio e carbono orgânico, reduzindo as condições oligotróficas de águas poluídas pela DAM, além de apresentar elevada retenção de metais na sua biomassa (FREITAS; SCHNEIDER; SCHWARTZBOLD, 2011). A simbiose entre várias espécies de algas e fungos incrementam efetivamente as fontes de carbono que ajudam a manter a população de bactérias redutoras de sulfato (BRS) em ambiente predominantemente anaeróbico (BWAPWA; JAIYEOLA; CHETTY, 2017; DAS et al., 2009). As algas produzem zonas anóxicas para ação de BRS e auxiliam na geração de alcalinidade biogênica (DAS et al., 2009). Alguns fungos produzem grandes quantidades de EPS, que contribuem como fonte de carbono e estratégia de imobilizar metais (PARIA; PYNE; CHAKRABORTY, 2021), o que é extremamente importante para o estabelecimento das BRS que necessitam de requisitos ambientais especiais, como condição anaeróbica, pH alto, doadores de elétrons suficientes e substrato adequado para imobilização (AYANGBENRO; OLANREWaju; BABALOLA, 2018). Esses aspectos são relevantes para o contexto da poluição gerada pela DAM e podem fornecer novas possibilidades para o desenvolvimento de estratégias de remediação e monitoramento ambiental.

Para compreender o relacionamento e as comunidades presentes em associações de algas filamentosas, é oportuno utilizar metodologias de biologia molecular que permitam acessar os organismos sem a necessidade de cultivo ou identificação morfológica. O emprego de métodos de metataxonomia por sequenciamento possibilita a identificação e comparação de comunidades microbianas completas, abrangendo organismos que não podem ser cultivados (BRUMFIELD et al., 2020). Essa técnica desempenha um papel crucial na avaliação de ambientes de DAM, que frequentemente apresentam condições tão extremas que inviabilizam o cultivo da maioria dos organismos presentes (AULD et al., 2017). Por meio desses métodos, torna-se possível conduzir estudos de ecologia microbiana nesses ambientes e investigar como a dinâmica dessas comunidades se relaciona com as algas filamentosas, e como interagem com a água e o sedimento da DAM.

O objetivo deste estudo foi caracterizar as comunidades procarióticas e eucarióticas associadas à superfície de algas filamentosas extremófilas, bem como amostras de água e sedimento coletadas na área de DAM da BCSC. Para alcançar esse propósito, foram aplicadas técnicas de meta-taxonômica baseadas em amplicons dos genes 16S e 18S e realizadas caracterizações das matrizes ambientais associadas.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Área de estudo e amostragem

O estudo foi realizado na BCSC, localizada no Estado de Santa Catarina na região Sul do Brasil. O local de amostragem se encontra na bacia hidrográfica de Tubarão nas coordenadas geográficas 28°27'00.2999'' E e 49°20'37.2965'' N. Nesta área foi realizada a tipologia de mineração por lavra a céu aberto, com descobertura do solo natural e posterior inversão de camadas do substrato, remanescendo uma morfologia alterada. Com a falência da empresa que explorava esta área, o passivo ambiental foi imbuído a União, que realiza atividade de reflorestamento para recuperação da área. Este local apresenta características típicas de ambientes de DAM, com presença de sedimentação metálica e ausência de fauna aquática. Os fluxos de DAM são formados pela percolação de águas pluviais, misturadas com fluxos fluviais, que drenam minas afogadas, onde ocorrem as reações que levam a produção de DAM.

A coleta das amostras foi realizada no dia 17 de maio de 2022 (Figura 14). Foram coletadas amostras do sedimento, água e de algas filamentosas encontradas no córrego de DAM do ponto amostral. Todas as amostras foram realizadas em três réplicas biológicas. Para cada réplica biológica de sedimento foi realizado uma amostragem composta (5 amostras simples) da camada superficial (~5 cm de profundidade), localizado em pontos com uma profundidade de cerca de 10 cm, utilizando um trado calador esterilizado com diâmetro de 20 mm. As cinco frações de amostra simples foram misturadas em um saco estéril, e posteriormente, a fração composta foi transferida para um tubo falcon estéril de 50 mL.

Cada réplica de amostra de água foi coletada em locais onde a água estava em movimento até completar o volume de 5 L (galões de 5 L estéreis) para cada estação. Os galões foram armazenados em caixa térmica. Para cada réplica de amostra de algas filamentosas foram coletadas cinco frações de amostra simples, que foram misturadas em um saco estéril, e posteriormente, a fração composta foi transferida para um tubo falcon estéril de 50 mL.

O processo de coleta dos três tipos de amostra foi realizado utilizando luvas de vinil estéril. As amostras seguiram refrigeradas até o laboratório em caixa de isopor. No laboratório uma fração de cada amostra foi separada e mantida em geladeira até o dia seguinte onde foi conduzida a extração de DNA. O restante das amostras presente no tubo falcon foi direcionado para análise de biomassa, metais e nutrientes.

Figura 13 - Aspecto das algas filamentosas coletadas



(A) Local de coleta mostrando o fluxo de DAM e o tapete algal; (B) e (C) Detalhe das algas filamentosas no local de coleta; (D) Realização da coleta, e (E) aspecto dos filamentos coletados.

3.3.2 Análises geoquímicas

Amostras de água, sedimento e de alga filamentosa foram coletadas em tubos de polietileno de 50 mL e estocadas em caixas térmicas no escuro até a chegada ao laboratório. A amostra para determinação de metais em água foi acidificada até pH 2,0 com ácido sulfúrico. As concentrações de metais (Fe, Mn, Zn, Cu, Ni) foram determinadas nas amostras de água e sedimento. As análises foram realizadas no laboratório analítico LAQUA (Laboratório de Análises Químicas e Ambientais) pertencente a Associação Beneficente da Indústria Carbonífera de Santa Catarina (SATC). As concentrações totais de Cu, Fe, Zn, Mn e Ni na água e sedimento foram determinadas por *Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)*, seguindo as metodologias padrão para sedimento (EPA 3050B; USEPA, 1996) e para água (*SMWW 3120 B*; APHA, 2018a).

3.3.3 Caracterização da biomassa

A biomassa de algas filamentosas foi caracterizada quanto ao teor de umidade e cinzas, seguindo os métodos gravimétricos tradicionais (VEGA; LOBINA, 2007). Alíquotas de biomassa em quadruplicata, com massa úmida conhecida, foram secas em estufa à 70 °C por 12 h, gerando a massa seca. Alíquotas de massa seca conhecida, em quadruplicata, foram submetidas a queima em mufla a 500 °C por 2 h, gerando a massa de cinzas e a massa seca livre de cinzas. Alíquotas da massa seca foram também utilizadas para a determinação do conteúdo em metais (Cu, Fe, Mn, Ni e Zn).

3.3.4 Identificação molecular taxonômica

A alga filamentosa coletada foi conduzida para uma identificação molecular. A amostra de alga foi acondicionada em freezer (-20°C) até o momento da extração de DNA. Para a realização da extração, fragmentos de amostra foram selecionados e triturados, com o auxílio de almofariz e pistilo em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. A extração de DNA foi realizada com o kit NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, Düren, Germany), seguindo o protocolo estabelecido pelo fornecedor. O marcador molecular utilizado foi o *rbcl*, gene responsável pela produção da ribulose-1,5-bisfosfato, ou RuBisCO. O marcador molecular foi amplificado a partir da PCR (termociclador de gradiente Techne TC-3000, Techne Techgene,

Burlington, USA). Para um volume final de 25 μ L, foram utilizados: 1x PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 μ M de cada primer (*Forward* e *Reverse*), 5-10 ng de DNA total e 1,25 U de Taq DNA polimerase (Master Mix Gotaq - Promega Corporation, USA). O *rbcL* foi amplificado e sequenciado a partir dos pares de primers *rbcL_RH1* (5'–ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGC–3') e o *rbcL_1385R* (5'–AATTCAAATTTAATTTCTTTCC–3') (HALL et al., 2010). Os produtos amplificados foram purificados com o protocolo de precipitação PEG 20%. As reações de sequenciamento *Sanger* foram feitas com o kit *BigDye™ Terminator v3.1 Sequencing* (Applied Biosystems, Carlsbad, California USA). Por fim, as amostras foram enviadas a uma empresa terceirizada para realização do processo de obtenção das sequências. As sequências obtidas foram limpas e montadas no software CLC Genomics Workbench com a qualidade Q₃₀, e posteriormente foram alinhadas pela Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (BLAST) no banco de dados do NCBI.

3.3.5 Avaliação do microbioma

3.3.5.1 Extração de DNA

Cada amostra composta de sedimento foi homogeneizada e submetida à extração de DNA usando o kit DNeasy PowerSoil (Qiagen®) seguindo as instruções do fabricante. As amostras de água foram filtradas através de uma membrana de celulose de 0,22 μ m (~3 Litros) e, em seguida, o DNA foi extraído com o kit de extração DNeasy PowerWater (Qiagen®), seguindo as instruções do fabricante. Cada amostra de algas filamentosas foi colocada em um saco com fecho esterilizado e submetido à um banho com ultrassom (SoniClean 2PS - Sanders) por 40 minutos, para que os micro-organismos aderidos a superfície das algas pudessem se desprender, formando a amostra de Microbioma de Superfície Algal (MSA). Após isto, foi pipetado uma alíquota de 3 mL a qual foi conduzida para extração de DNA utilizando o kit de extração DNeasy PowerWater (Qiagen®), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do DNA eluído foram determinadas usando um espectrofotômetro (NanoDrop3300, Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.3.5.2 Biblioteca de amplicons e sequenciamento

O DNA purificado extraído foi usado para construção de biblioteca de extremidade pareada (*pair-end* 250pb) com base em um protocolo Illumina. As regiões V3-V4 dos genes 16S rRNA foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') e 806R 5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3' (TAKAHASHI et al., 2014). As regiões V9 dos genes 18S rRNA foram amplificadas por PCR usando os primers Euk1391F (5'-GTACACACCGCCCGTC) e EukBR e (5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC) (AMARAL-ZETTLER et al., 2009). Todas as reações de PCR foram realizadas com Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs). As bibliotecas amplicon foram purificadas usando o protocolo padrão para Agencourt Ampure XP Bead (Beckman Coulter, EUA) e sua concentração de DNA medida usando o kit Qubit™ HS DNA Assay (Thermo Fisher Scientific, EUA). As bibliotecas de sequenciamento foram preparadas a partir das bibliotecas de amplicon purificadas usando uma segunda PCR. Cada reação de PCR (25 µ L) continha tampão PCRBIO HiFi (PCRBiosystems, Reino Unido), PCRBIO HiFi Polimerase (1U) (PCRBiosystems, Reino Unido), mistura de adaptadores (400 nM de cada direto e reverso) e até 10 ng de amplicon modelo de biblioteca. A qualidade da biblioteca foi avaliada no Qubit@ 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific) e no sistema Agilent Bioanalyzer 2100. Finalmente, as bibliotecas de sequenciamento purificadas foram agrupadas em concentrações equimolares e diluídas a 2 nM, e as amostras foram sequenciadas (301 pb) em um MiSeq (Illumina) usando um kit MiSeq Reagent v3 (Illumina, EUA) seguindo as diretrizes padrão para preparação e carregando amostras no MiSeq. A biblioteca de controle Phix foi usada como um controle durante a execução (20% spikedin) para monitoramento da qualidade da execução para superar o problema de baixa complexidade que é frequentemente observado com amostras de amplicon.

3.3.5.3 Processamento de dados de DNA

O pacote QIIME2 (BOLYEN et al., 2019) foi usado para realizar o controle de qualidade, chamada de variante de sequência de amplicon (ASV) e classificação taxonômica das leituras de sequenciamento. As sequências de primers foram removidas previamente à chamada de ASVs (17 a 20 pares de base removidos na extremidade 5' das leituras). As etapas de filtragem por qualidade e chamada de ASVs foram realizadas utilizando o *pipeline* DADA2

denoise-paired (CALLAHAN et al., 2016), com os parâmetros $\text{maxN} = 0$; $\text{truncQ} = 2$; $\text{minOverlap} = 10$. As sequências representativas resultantes da chamada de ASVs foram classificadas com classificadores Naïve Bayes implementados no plugin *q2-feature-classifier*, treinados usando sequências extraídas do banco de dados SILVA 138 SSU (QUAST et al., 2013) de acordo com os primers 16S e 18S usados no processo de sequenciamento, por meio do comando *fit-classifier-naive-bayes*. O resultado foi um conjunto de tabelas taxonômicas com abundâncias relativas para cada amostra. Os dados brutos estão disponíveis no NCBI *Sequence Read Archive* (SRA) sob o número de acesso PRJNA1015589.

3.3.5.4 Análises de downstream

As análises gráficas e estatísticas foram realizadas usando o pacote *Microeco R* (LIU et al., 2021a) da seguinte forma: (a) índices de alpha diversidade foram calculados com a função *trans_alpha*, método ANOVA ($p < 0,05$) para as categorias índice de Shannon, CHAO1 e Cobertura de Good; (b) uma matriz de dissimilaridade de diversidade beta foi calculada usando a distância de Bray-Curtis e ordenada pela Análise de Coordenada Principal (PCoA) através do método de classe *trans_beta*; (c) as abundâncias relativas nos níveis de gênero e filo foram calculadas usando o método de classe *trans_abund*, (d) diagrama de Venn a partir do método de classe *trans_venn*, e finalmente (e) interação das ASVs no gráfico ternário através da classe *trans_abund*.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Variáveis físico-químicas

As variáveis físico-químicas e químicas das amostras de água e sedimento do local de coleta mostraram típicas características de DAM, com baixo pH, elevadas condutividade e concentrações de Fe (Tabela 3). A concentração de Fe, Zn, Ni e Cu foi maior no sedimento do que na água. Já a concentração de Mn foi maior na água do que no sedimento.

Tabela 3 - Características físico-químicas de água e sedimento das amostras avaliadas.

Variável	Água	Sedimento
pH	2,25	3,6
Condutividade	2,5 mS.cm ⁻¹	-
Fe	162,760 mg.L ⁻¹	20.349,96 mg.Kg ⁻¹
Mn	30,480 mg.L ⁻¹	16,401 mg.Kg ⁻¹
Zn	5,449 mg.L ⁻¹	8,200 mg.Kg ⁻¹
Ni	0,903 mg.L ⁻¹	1,411 mg.Kg ⁻¹
Cu	0,165 mg.L ⁻¹	4,850 mg.Kg ⁻¹

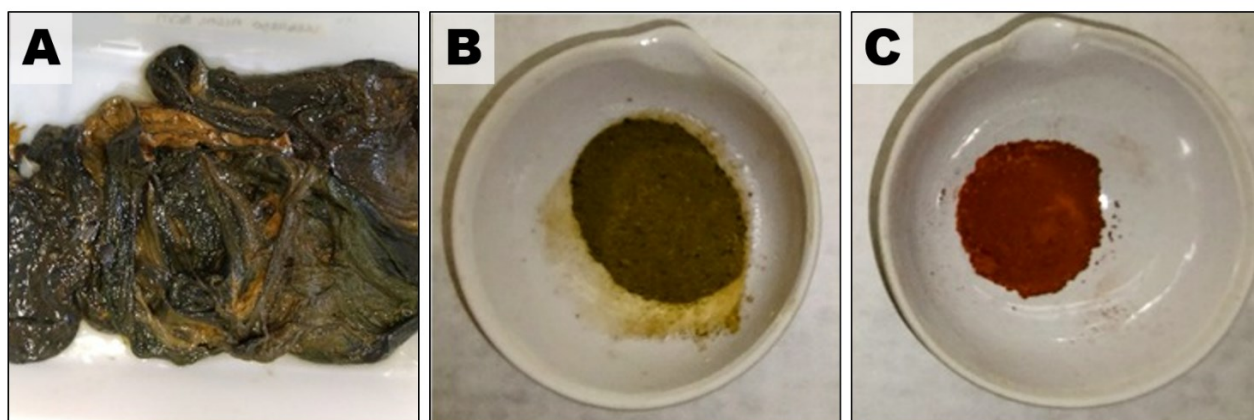
3.4.2 Caracterização da biomassa algal

A biomassa algal apresentou uma composição surpreendente de metais, contendo 9,8% de Fe em sua biomassa (Tabela 4). A biomassa seca do material algal coletado chamou a atenção por mostrar coloração alaranjada e peso notavelmente maior do que típicas amostras de biomassa algal (Figura 15). Comparando-se os valores de metais na biomassa com as concentrações verificadas para a água de entorno dos tapetes algais verificam-se fatores de concentração (FC = concentração de metal na biomassa ÷ concentração de metal na água) bastante elevados, atingindo cerca de 606,5 para Fe; 9,2 para Mn; 14,6 para Zn; 31,7 para Ni e 76,4 para Cu. Tais valores indicam a alta capacidade de adsorção/absorção de metais por parte dessa biomassa.

Tabela 4 - Características da biomassa dos tapetes algais coletados e processados na área de DAM.

Variável	Valor
Teor de umidade na massa fresca (%)	91,8 ± 0,002
Teor de cinzas na massa seca (%)	49,15 ± 0,17
Teor de massa seca livre de cinzas (%)	50,85 ± 0,17
Fe (mg kg ⁻¹)	98.867,59
Mn (mg kg ⁻¹)	275,839
Zn (mg kg ⁻¹)	79,003
Cu (mg kg ⁻¹)	28,571
Ni (mg kg ⁻¹)	12,656

Figura 14 - Caracterização da biomassa algal



(A) aspecto da biomassa fresca coletada; (B) aspecto da biomassa seca e pulverizada; (C) aspecto das cinzas obtidas após calcinação da biomassa seca.

3.4.3 Identificação da alga filamentosa

A identificação da alga filamentosa pelo marcador *rbcl* apresentou uma baixa identidade com as sequências depositadas no banco do NCBI. Sendo que a maior identidade foi de 93,85% com a família Zygnematophyceae, e 93,20% com a espécie *Zygonium ericetorum* que pertence a classe Zygnematophyceae (Tabela 5).

Tabela 5 - Táxa alinhados com a sequência da alga filamentosa através da ferramenta BLAST do banco NCBI.

Nome Científico	Max Score ¹	Total Score ²	Cobertura	Identidade ³	ID Acesso NCBI
<i>Zygonium ericetorum</i>	1882	1882	100%	93.20%	KM205115.1
<i>Zygnematophyceae sp.</i> KM.19b	1860	1860	96%	93.85%	OM241458.1
<i>Zygnematophyceae sp.</i> GSM.2.16.1	1844	1844	96%	93.60%	OM241459.1
<i>Mesotaenium sp.</i> AG-2009-1	1502	1502	100%	87.82%	FM992361.1
<i>Zygnematophyceae sp.</i> GSM.2.16.s1	1450	1450	96%	87.92%	OM241468.1
<i>Zygnematophyceae sp.</i> GSM.2.16.s2	1439	1439	96%	87.75%	OM241469.1
<i>Spirogyra punctata</i>	1434	1434	100%	86.90%	MK558127.1
<i>Cylindrocystis sp.</i> Fox7	1428	1428	100%	86.81%	MN177732.1
<i>Spirogyra sp.</i> TT-2019	1423	1423	99%	86.95%	MK558128.1
<i>Spirogyra sp.</i> JH0977	1411	1411	100%	86.59%	KC779182.1
<i>Mougeotia sp.</i> M2055	1411	1411	99%	86.62%	FM992362.1
<i>Cylindrocystis brebissonii</i>	1411	1411	100%	86.57%	FM992349.1
<i>Spirogyra juergensii</i>	1411	1411	99%	86.79%	DQ015939.1
<i>Spirogyra sp.</i> TT-2019	1400	1400	99%	86.64%	MK558130.1
<i>Mougeotia sp.</i> JH0304	1395	1395	99%	86.38%	EF371364.2
<i>Spirogyra sp.</i> TT-2019	1389	1389	100%	86.28%	MK558106.1
<i>Spirogyra varians</i>	1389	1389	100%	86.28%	MK558105.1
<i>Spirogyra sp.</i> TT-2019	1389	1389	100%	86.28%	MK558103.1
<i>Spirogyra varians</i>	1389	1389	100%	86.28%	KC779199.1
<i>Spirogyra varians</i>	1389	1389	100%	86.28%	DQ015951.1
<i>Spirogyra gracilis</i>	1389	1389	100%	86.28%	DQ015937.1
<i>Mougeotia sp.</i> SVCK 417	1389	1389	99%	86.31%	AJ553953.1
<i>Spirogyra sp.</i> 169.80	1387	1387	100%	86.19%	FJ715721.1
<i>Spirogyra semiornata</i>	1384	1384	100%	86.20%	MK558116.1
<i>Spirogyra sp.</i> TT-2019	1384	1384	100%	86.20%	MK558104.1
<i>Gonatozygon kinahani</i>	1384	1384	100%	86.20%	AJ553945.1
<i>Spirogyra sp.</i> TT-2019	1378	1378	100%	86.13%	MK558110.1
<i>Spirogyra sp.</i> TT-2019	1378	1378	100%	86.13%	MK558108.1
<i>Spirogyra communis</i>	1378	1378	100%	86.13%	DQ015931.1
<i>Spirogyra sp.</i> TT-2019	1373	1373	99%	86.09%	MK558138.1

¹ Número total de nucleotídeos que a sequência depositada no banco possui.

² Número de nucleotídeos que foram idênticos entre a sequência depositada no banco e a amostra avaliada.

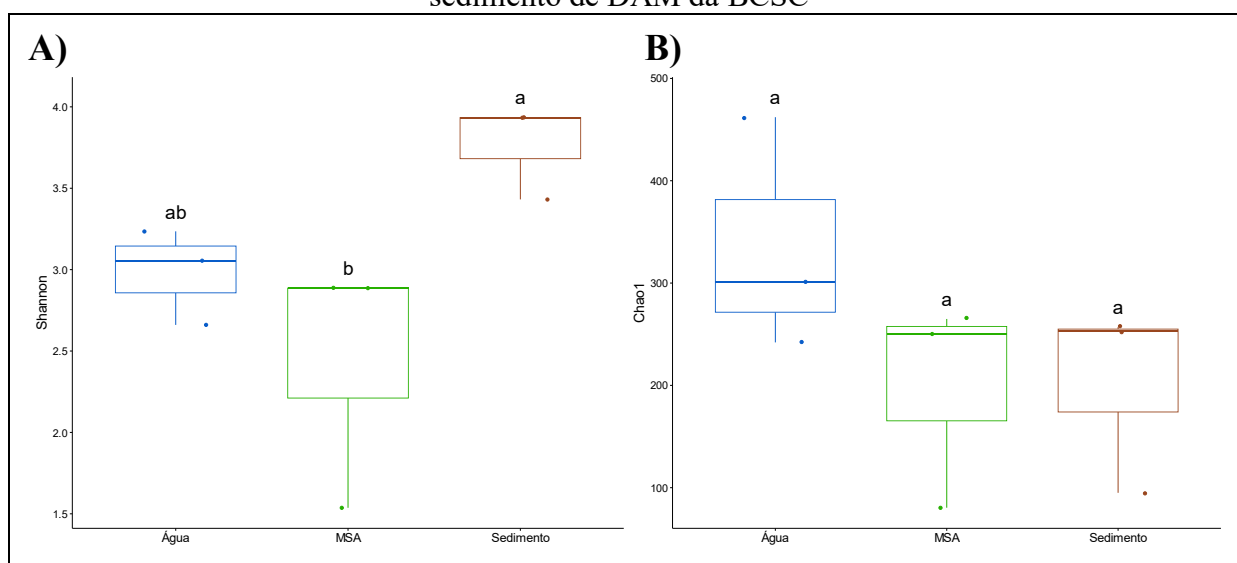
³ Esse é o valor que representa o número nucleotídeos que correspondem exatamente na mesma posição entre a sequência depositada e amostra avaliada, expresso como uma porcentagem de toda a sequência;

3.4.4 Biodiversidade do microbioma

Foram identificadas um total de 1.642.382 e 1.546.671 sequências qualificadas para o sequenciamento dos genes 16S e 18S do rRNA, respectivamente. Para tornar as amostras comparáveis, as sequências foram niveladas na mesma profundidade de sequenciamento, com base na amostra com o menor número de sequências (77.212 para 16S e 153.390 para 18S). O número de ASVs obtidas para cada amostra variou de 102 a 550 para 16S e de 50 a 136 para 18S, em 9 amostras para cada gene marcador. A cobertura de sequenciamento foi considerada suficiente para estudo da diversidade, a amostragem cobriu (Cobertura de Good) em média 99% da diversidade de procariontes e eucariontes.

A avaliação de alpha-diversidade pelo índice de Shannon e de Chao1 para organismos procariontes é apresetada na figura 16. Foi possível verificar que a média do índice de Shannon foi maior para as amostras de sedimento, seguido pela água e MSA, sendo que as amostras de sedimento, apresentam diferença estatística significativa em relação as amostras de MSA (ANOVA; $p < 0.05$). Já o índice de Chao1 apresentou uma maior riqueza de espécies para a amostra de água, enquanto as amostras de MSA e sedimento apresentaram valores similares.

Figura 15 - Alpha-diversidade do Microbioma pelo (A) índice de Shannon e (B) índice de Chao1, para organismos procariontes (16S) nas amostras de água, MSA e sedimento de DAM da BCSC

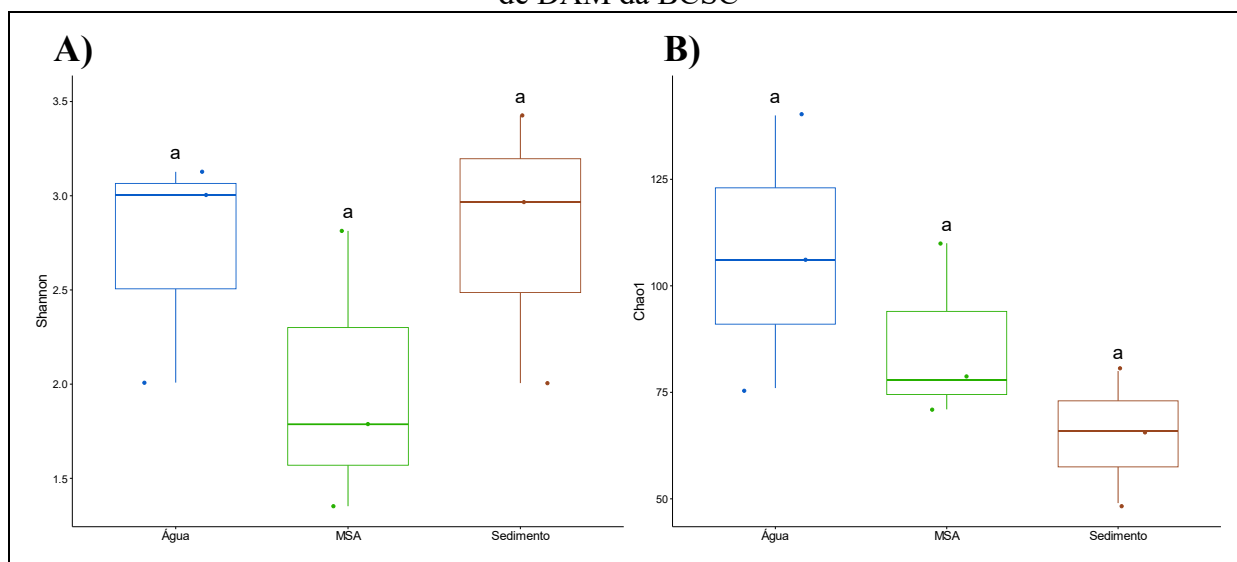


Amostras com a mesma letra não apresentam diferença significativa (ANOVA; $p < 0.05$).

Em relação aos eucariontes foi possível verificar que o índice de Shannon apresentou tendência de valores maiores para amostras de água e sedimento, mas sem diferença

significativa (ANOVA; $p < 0.05$) (figura 17). O índice de Chao1 apresentou uma média maior para amostra de água, seguido pela MSA e por último o sedimento, mas também sem diferença estatística (ANOVA; $p < 0.05$).

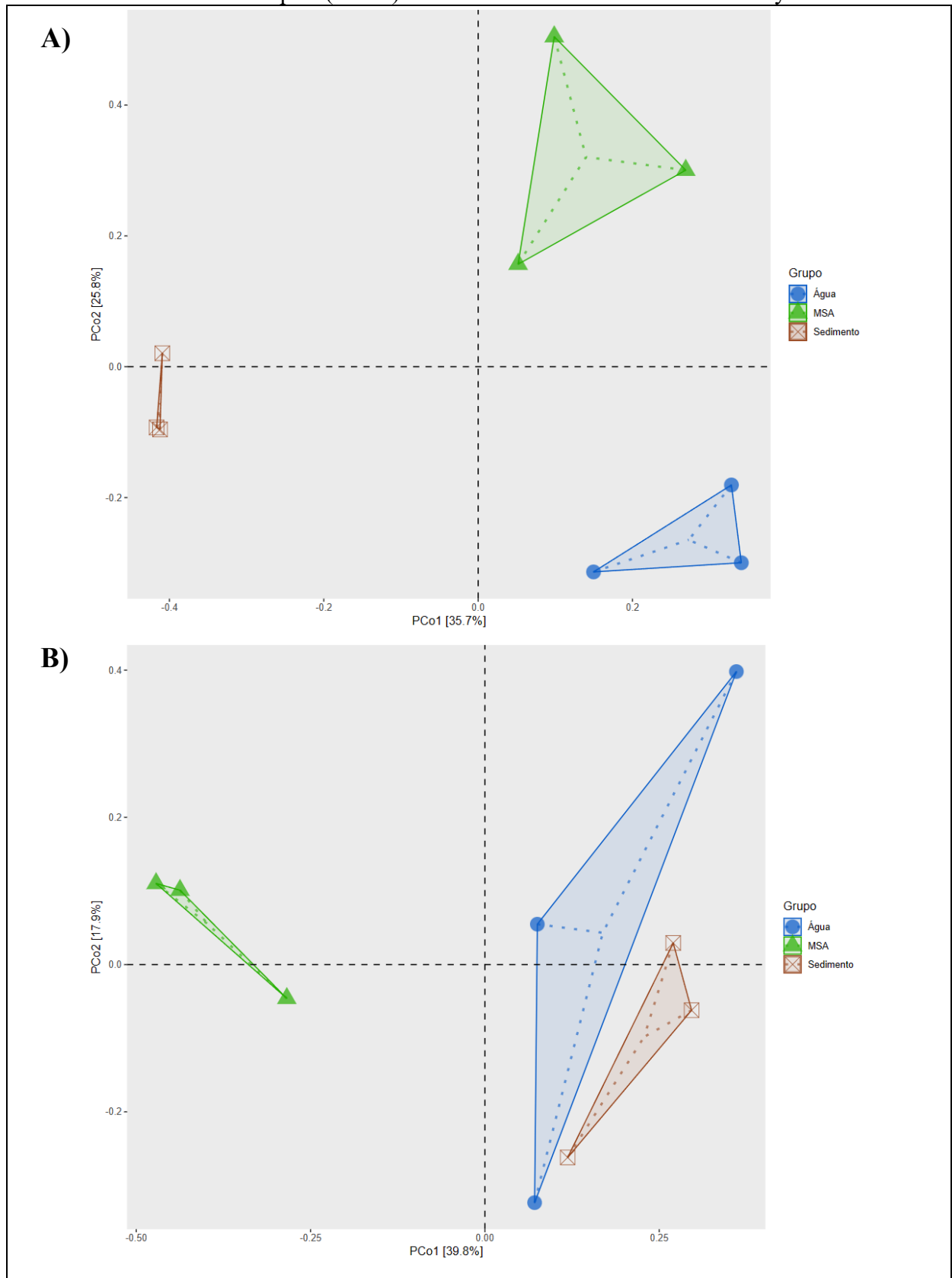
Figura 16 - Alpha-diversidade do Microbioma pelo (A) índice de Shannon e (B) índice de Chao1, para organismos eucariontes (18S) nas amostras de água, MSA e sedimento de DAM da BCSC



Amostras com a mesma letra não apresentam diferença significativa (ANOVA; $p < 0.05$).

O resultado para a beta-diversidade dos organismos procariontes (Figura 18A) apresentou uma separação bem clara entre as amostras de água, MSA e sedimento, com as amostras de sedimento em posição oposta às de água e MSA em relação ao primeiro eixo que explicou 35,7% da variância. Ao nível do segundo eixo, que explicou 25,8% da variância, entretanto, as amostras de MSA e água se posicionaram de forma oposta. A beta-diversidade dos organismos eucariontes também apresentou uma diferença na estrutura populacional. No entanto, pode-se observar uma maior proximidade das amostras de água para com as de sedimento, em oposição às amostras da MSA quando analisadas ao nível do primeiro eixo, que explicou 39,8% da variância.

Figura 17 - Beta-diversidade do microbioma de organismos (A) procariontes 16S e (B) eucariontes 18S, em amostras de água, MSA e sedimento. Gráfico de Análises de Coordenadas Principais (PCoA) baseado na matriz de distância de Bray-Curtis



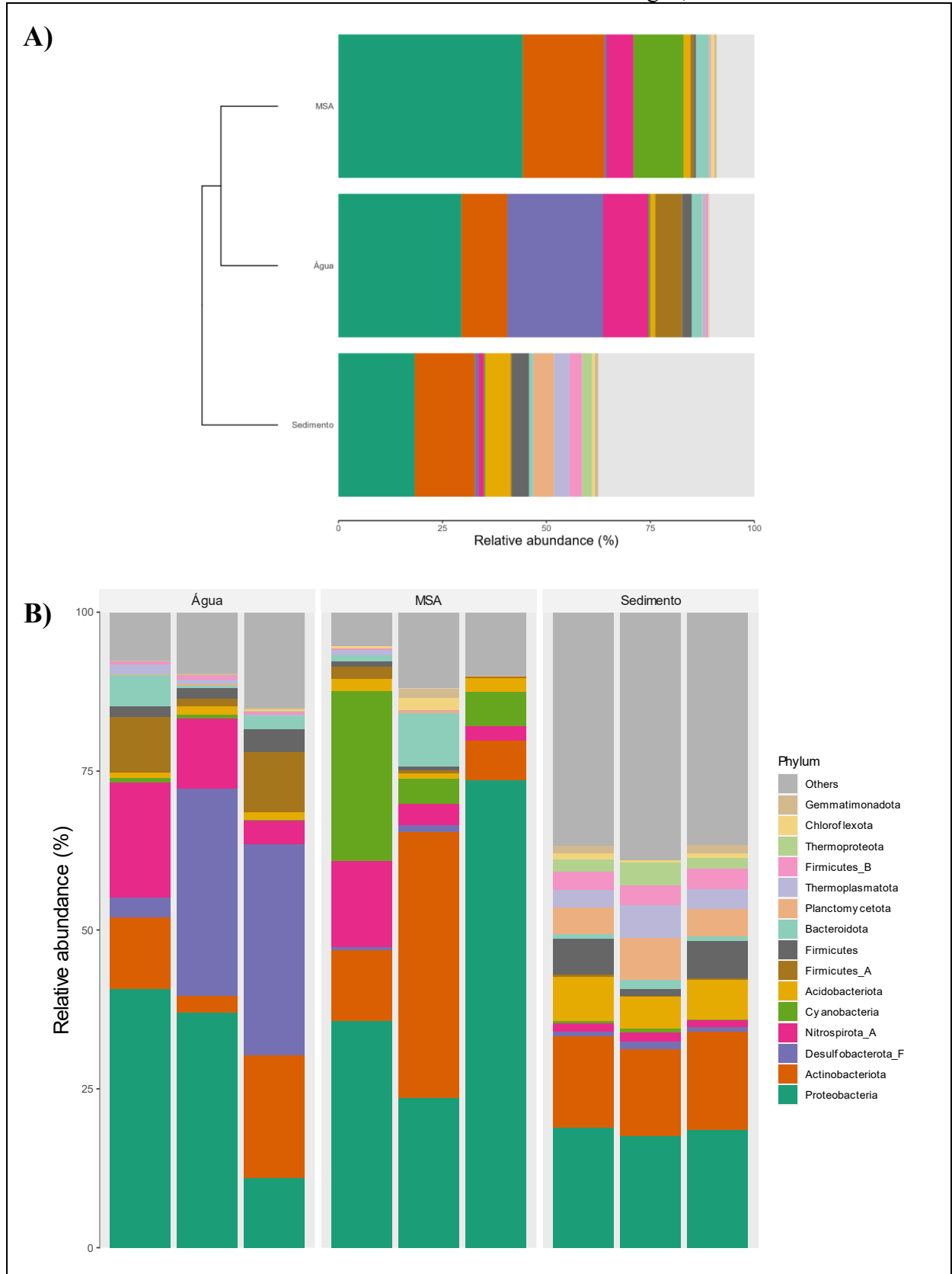
As linhas pontilhadas entre as amostras indicam a coordenada do ponto central entre as amostras.

3.4.5 Composição da comunidade

A composição da comunidade microbiana de procariontes e eucariontes foi avaliada a nível de filós e gêneros contidos nas amostras de água, MSA e sedimento.

A avaliação da composição dos filós procariontes, através da análise de cluster, mostrou que existe uma maior similaridade nas amostras de água e MSA do que com as amostras de sedimento (Figura 19). Os filós dominantes nas amostras foram Proteobacteria, Actinobacteriota, Desulfobacterota_F, Nitrospirota_A, Cyanobacteria, Firmicutes_A, Acidobacteriota, Firmicutes, Bacteroidota, Thermoplasmatota. O filo Proteobacteria foi o mais dominante nas amostras de água e MSA correspondendo à uma média de 40% nas amostras da MSA, sendo que uma das amostras de MSA apresentou cerca de 75% de sua frequência. O segundo filo mais dominante foi o Actinobacteriota que teve a sua maior frequência média em amostras de sedimento. O terceiro mais dominante é o filo Desulfobacterota_F que teve maior frequência em amostras de água. As amostras de sedimento foram as que tiveram maior homogeneidade nos resultados entre as repetições de amostras.

Figura 18 - Composição da comunidade de organismos procariontes (16S), considerando os 15 filós mais ocorrentes das amostras de água, MSA e sedimento

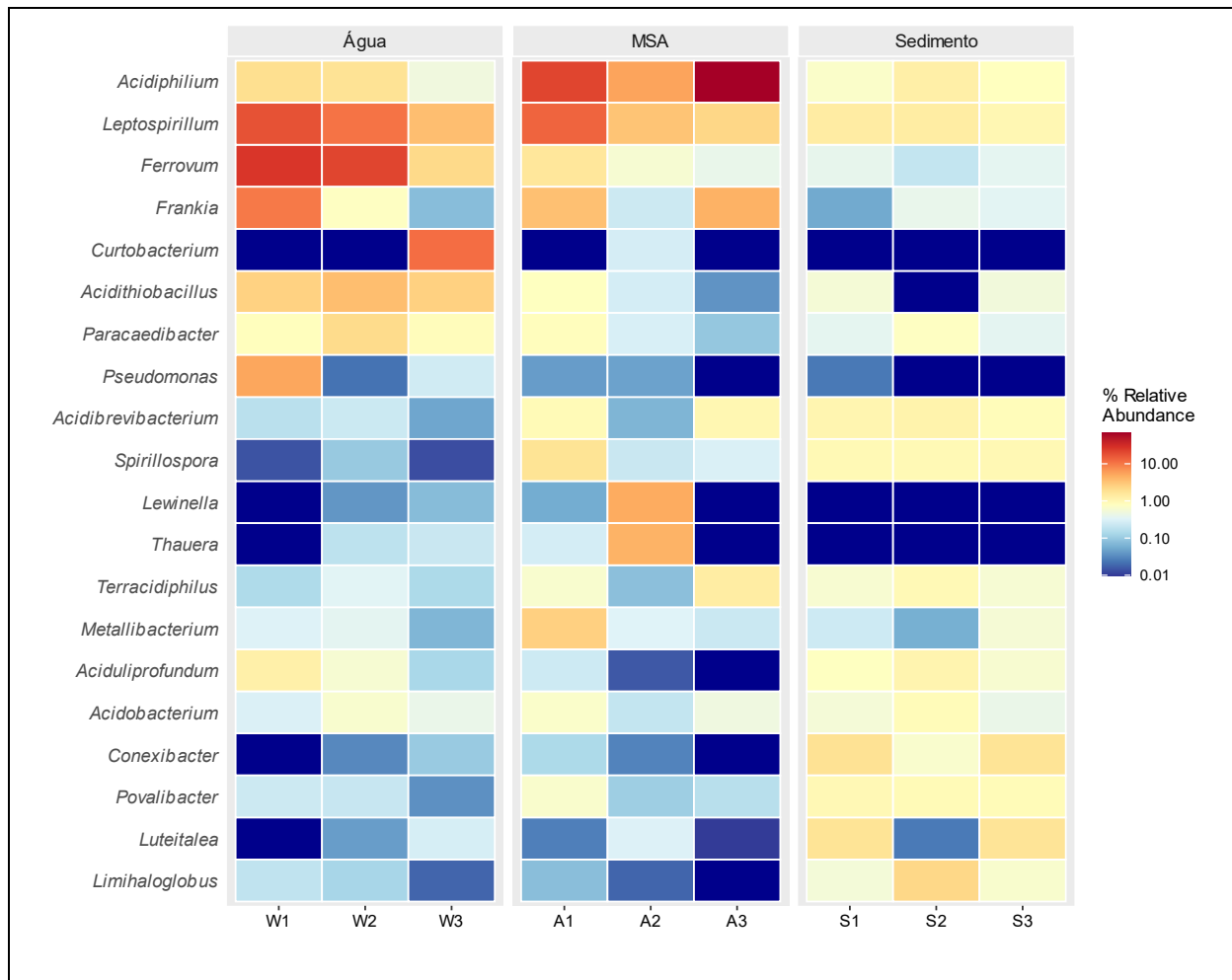


A) Abundância relativa apresentada com a média das três repetições, e agrupado pelo método de Cluster.

B) Abundância relativa de todas amostras.

A avaliação da composição da comunidade de gêneros procariontes é apresentada na figura 20. O gênero *Acidiphilium* apresentou a maior ocorrência, e foi encontrado em todas as amostras, mas teve sua maior frequência na amostra de MSA, sendo que em uma das amostras a sua frequência foi bem alta (cerca de 60%). Outro gênero que apresentou alta ocorrência foi o *Leptospirillum*, com maior ocorrência nas amostras de água e MSA. O gênero *Ferrovum* teve uma alta ocorrência nas amostras de água e bem baixa nas amostras de MSA e sedimento. Os gêneros *Acidithiobacillus* e *Paracaedibacter* apresentaram a sua maior ocorrência nas amostras de água. É possível verificar que no sedimento os grupos procariontes apresentaram uma distribuição mais equilibrada entre os grupos de gêneros.

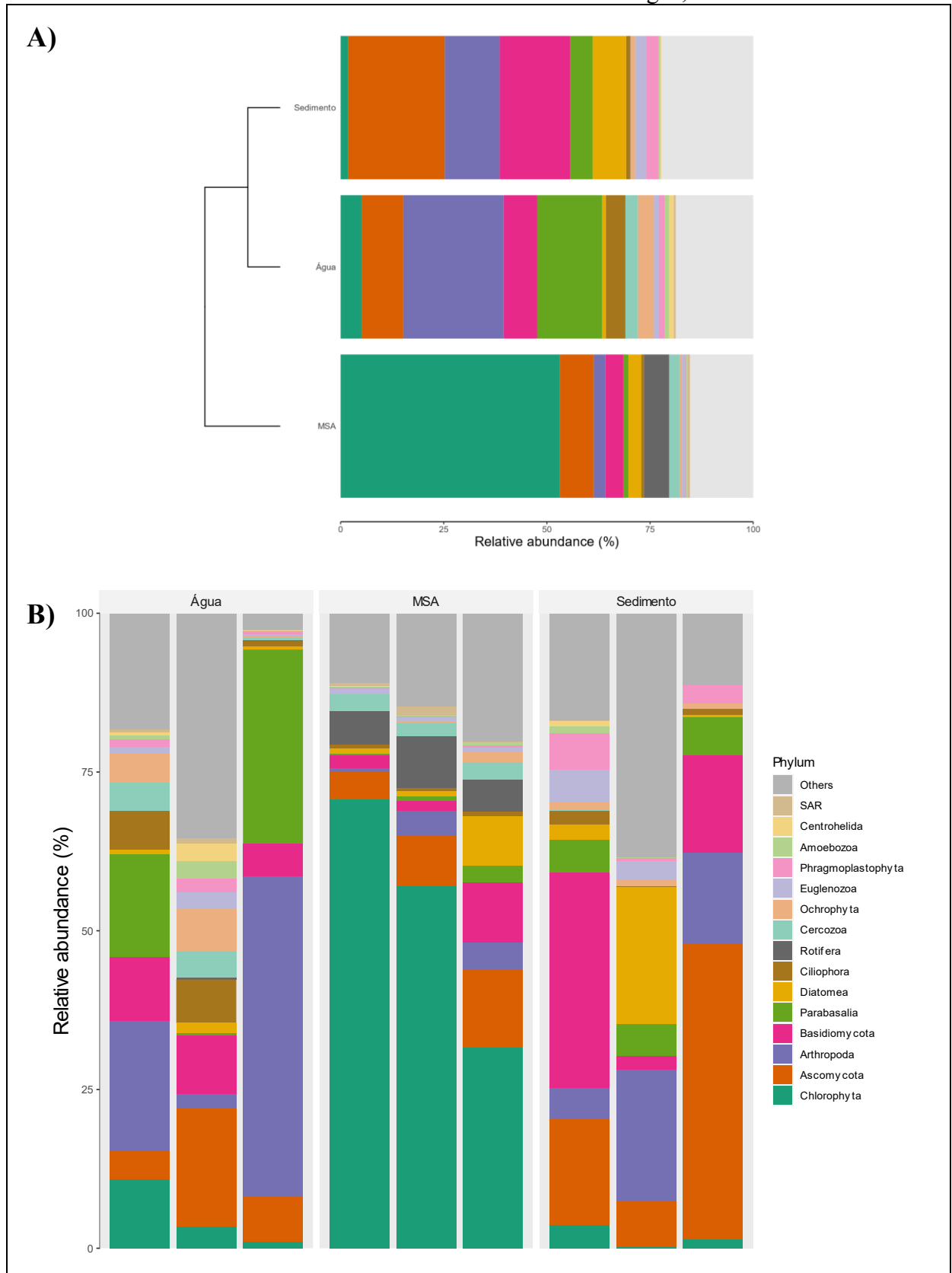
Figura 19 - Composição da comunidade de organismos procariontes (16S) em amostras de água, MSA e sedimento. Frequência de abundância dos 20 gêneros mais ocorrentes



O azul escuro indica taxa que não apresentaram ocorrência na amostra.

A avaliação da composição dos filos eucariontes através da análise de cluster, mostrou que existe uma maior similaridade entre as amostras de água e sedimento, as quais se diferem bastante da amostra de MSA (Figura 21). Os filos dominantes nas amostras foram Chlorophyta, Ascomycota, Arthropoda, Basidiomycota, Parabasalia, Diatomea, Ciliophora, Rotifera, Cercozoa, Ochrophyta. O filo Chlorophyta foi o mais dominante na amostra de MSA, compreendendo uma média de 53% de frequência, sendo que uma amostra chegou a 70% de frequência, com grande parte dessa frequência pela espécie *Pumilosphaera acidophila*. O filo Ascomycota foi o mais dominante na amostra de sedimento, compreendendo um média de 20% de frequência, seguido pelo filo Basidiomycota com cerca de 15% de frequência média. O Filo Ascomycota teve a sua maior frequência através das espécies *Aspergillus penicillioides*, *Aspergillus versicolor*, *Kazachstania humilis*, dos gêneros *Penicillium* e *Cladosporium* e da família de leveduras Saccharomycetaceae e a família Aspergillaceae. Na amostra de água, o filo mais dominante foi o Arthropoda (praticamente ordem Diptera), com frequência média de aproximadamente 26%, seguido pelo filo Parabasalia com cerca de 10% de frequência média.

Figura 20 - Composição da comunidade de organismos eucariontes (18S), considerando os 15 filós mais ocorrentes das amostras de água, MSA e sedimento

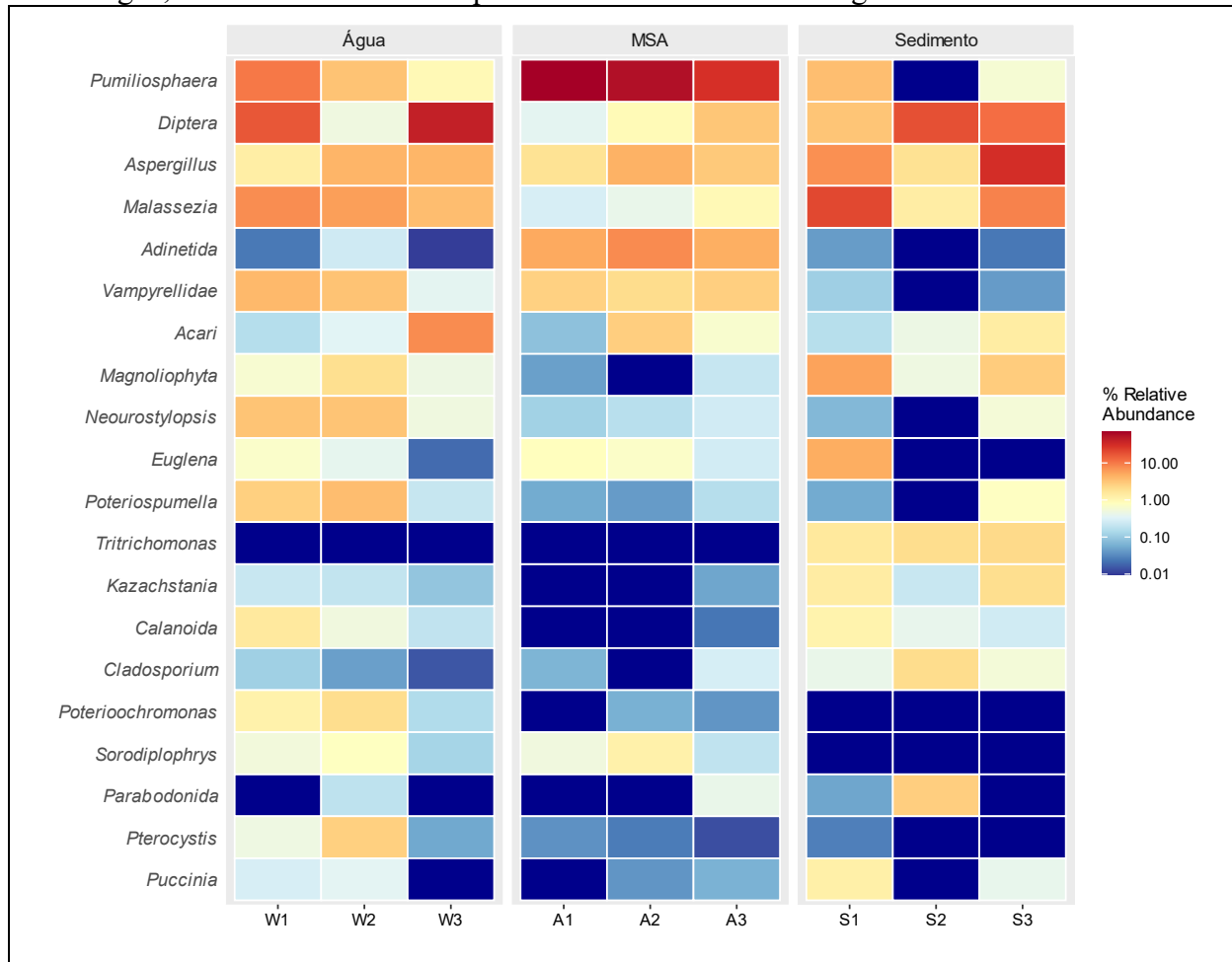


A) Abundância relativa apresentada com a média das três repetições, e agrupado pelo método de Cluster.

B) Abundância relativa de todas amostras.

A composição dos gêneros e demais grupos da comunidade de organismos eucariontes é apresentada na figura 22. Como a resolução do banco taxonômico 18S é bem menor que do 16S, várias amostras foram caracterizadas em níveis taxonômicos mais elevados como Classe, Ordem e Família ao invés de de gênero. O gênero *Pumiliosphaera* apresentou a maior ocorrência nas amostras de MSA, uma média de 57% de frequência, sendo que uma das amostras apresentou cerca de 70% de frequência. As amostras de água, também tiveram uma ocorrência do gênero *Pumiliosphaera* com média de 5% de frequência. Foi encontrada elevada importância do grupo Diptera na água com cerca de 17% de frequência média, e 12% de frequência média no sedimento. Dentro da ordem Diptera a espécie *Drosophila suzukii* foi a mais frequente, seguida pela espécie *Chironomus tentans*. O gênero *Aspergillus* tem ocorrência nas três amostras, sendo que a maior ocorrência média foi no sedimento com cerca de 7%. O gênero *Malassezia* foi encontrado nas amostras de água e sedimento, sendo que a maior ocorrência média foi em sedimento com 9% de frequência média. O grupo de rotíferos Adinetida foi encontrado com uma frequência de 6% nas amostras de MSA. E o grupo de amebóides Vampyrellidae foi encontrado em amostras de água e MSA. Na amostra de água desta mesma localidade analisada em estudo anterior (Capítulo 1 desta tese), a alga do gênero da *Poteriospumella* mostrou elevada frequência. No presente trabalho mesmo foi encontrado novamente, mas com uma frequência menor (média de 3% de frequência).

Figura 21 - Composição da comunidade de organismos eucariontes (18S) em amostras de água, MSA e sedimento. Frequência de abundância dos 20 gêneros mais ocorrentes

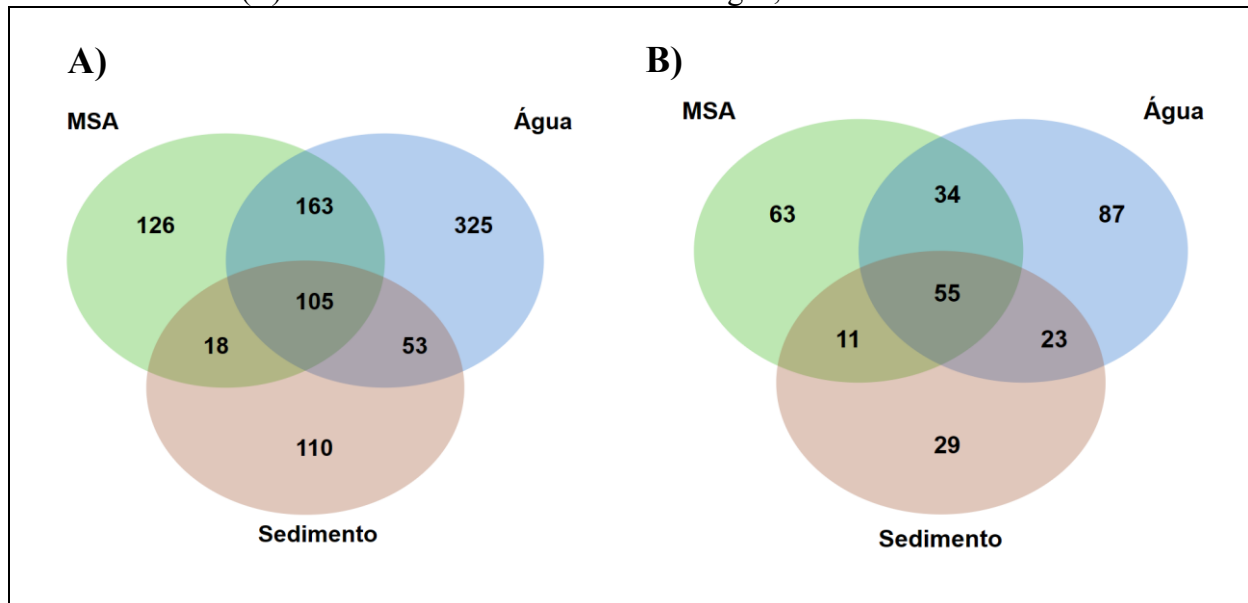


O azul escuro indica taxa que não apresentaram ocorrência na amostra.

3.4.6 Interação entre os microbiomas

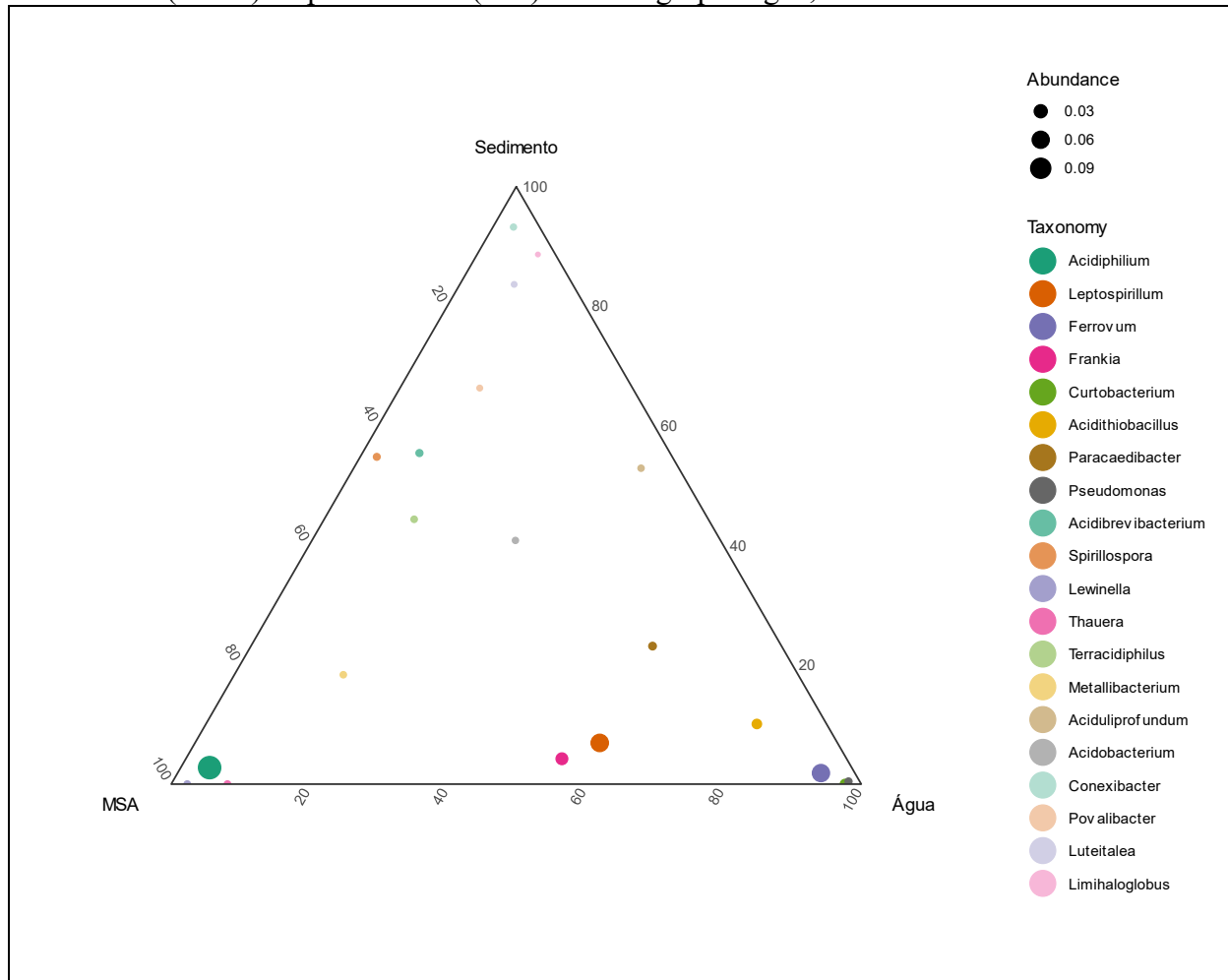
Apesar das amostras de água, MSA e sedimento terem sido coletadas na mesma localidade, elas apresentaram muitas diferenças em suas composições taxonômicas. O diagrama de Venn apresentou para o grupo procariontes, a presença de 382 ASVs exclusivos para amostra de água, 141 ASVs exclusivos para MSA e 130 ASVs exclusivos para sedimento, sendo que apenas 122 ASVs foram compartilhados nas três amostras (Figura 23). O mesmo acontece para os organismos eucariontes, que apresentou 87 ASVs exclusivos para amostras de água, 63 ASVs exclusivos para MSA e 29 ASVs exclusivos para sedimento, com apenas 55 ASVs compartilhados nas três amostras. As amostras de MSA e água compartilharam de forma exclusiva 201 ASVs procariontes e 34 eucariontes entre si.

Figura 22 - Diagrama de Venn demonstrando a quantidade de variantes de sequência de amplicon (ASVs) exclusivas e compartilhadas entre os grupos (A) procariontes 16S e (B) eucariontes 18S das amostras de água, MSA e sedimento



Através da distribuição de ASVs no gráfico ternário foi possível verificar a contribuição que cada táxon possui com as amostras de água, MSA e sedimento (Figura 24). O gênero *Acidiphilium* que possui a maior abundância entre as amostras, apresentou sua maior frequência e contribuição com as amostras de MSA, juntamente com os organismos dos gêneros *Lewinella* e *Thauera*. Os gêneros com maior frequência e contribuição com a amostra de água foram *Ferrovum*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium* e *Acidithiobacillus*. Enquanto os gêneros *Conexibacter*, *Luteitalea* e *Limihaloglobus* apresentam maior contribuição para amostras de sedimento. Os gêneros *Leptospirillum* e *Frankia* compartilharam as suas contribuições com as amostras água e MSA. E o gênero *Acidobacterium* está localizado ao centro do gráfico ternário, indicando que ele possuiu uma contribuição igual para as três amostras.

Figura 23 - Gráfico ternário da distribuição de variante de sequência de amplicon (ASVs) de procariontes (16S) entre os grupos água, MSA e sedimento

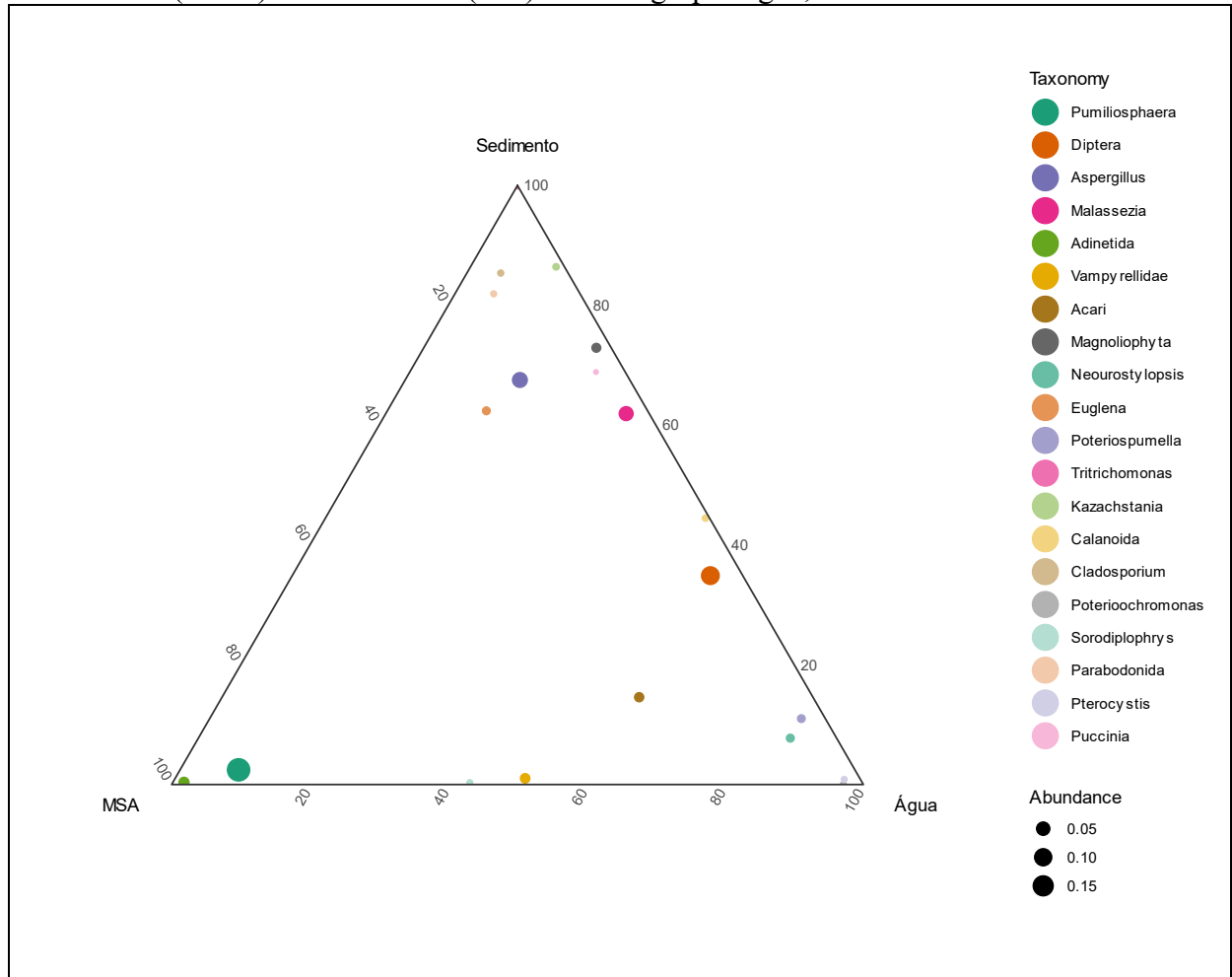


São apresentados os 20 gêneros mais ocorrentes, indicados pelas diferentes cores. O tamanho dos pontos plotados corresponde à frequência dos gêneros representados na escala logarítmica do diâmetro.

Os organismos eucariontes também foram avaliados através da distribuição dos 20 táxa mais ocorrentes no gráfico ternário (Figura 25). O genero *Pumiliosphaera* que foi encontrado nas três categorias de amostra apresentou uma maior contribuição nas amostras de MSA, assim como os rotíferos *Adinetida* que também possui sua maior contribuição nas amostras de MSA. Já as algas *Poterioochromonas* e *Poteriospumella*, os ciliados *Hypotricha* e o amebóide *Pterocystis* apresentaram uma maior contribuição com as amostras de água. E os flagelados unicelulares *Trichomonas* e os fungos *Kazachstania*, *Puccinia* e *Cladosporium*, apresentaram maior contribuição com as amostras de sedimento. Os amebóides *Vampyrellidae* e *Sorodiplophrys* compartilharam a maior contribuição com as amostras de água e MSA. Outro grupo que apresentou alta frequência relativa são os artrópodes *Diptera* com contribuição dividida nas amostras de água e sedimento. Os fungos *Aspergillus* e *Malassezia* e planta

Magnoliophyta apresentaram a sua maior contribuição com as amostras de sedimento, e partilharam uma participação com amostras de água.

Figura 24 - Gráfico ternário da distribuição de variante de sequência de amplicon (ASVs) de eucariontes (18S) entre os grupos água, MSA e sedimento



São apresentados os 20 gêneros mais ocorrentes, indicados pelas diferentes cores. O tamanho dos pontos plotados corresponde à frequência dos gêneros representados na escala logarítmica do diâmetro.

3.5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a composição de microbiomas de comunidades procarióticas e eucarióticas associadas à superfície de algas filamentosas extremófilas, bem como da água e sedimento de entorno, em ambiente de DAM na BCSC, analisando em paralelo algumas variáveis abióticas desses compartimentos ambientais, além de características da biomassa algal. A elevada acidez e concentração de metais das águas e, por consequência, dos sedimentos determina a seleção de espécies extremófilas especialmente adaptadas, as quais são potenciais fontes para biomoléculas de interesse biotecnológico e processos de biorremediação. Apesar do ambiente restritivo da DAM, verificou-se um considerável número de taxa procariontes e eucariontes nos diferentes compartimentos, e diferenças pronunciadas na composição biológica entre os mesmos, sugerindo condicionamentos e relações ecológicas específicas, influenciadas pelas diferentes matrizes ambientais. A elevada concentração de metais na biomassa das algas filamentosas e nos sedimentos também sugere a ocorrência de relações simbióticas para lidar com a toxicidade e promover a precipitação, sedimentação, adsorção e absorção desses metais nos diferentes compartimentos.

3.5.1 Variáveis físico-químicas e químicas

O ambiente avaliado possui características físico-químicas semelhantes a outros lugares do mundo contaminados com DAM. Essas características incluem baixo pH (< 4), alta condutividade, baixa turbidez, baixas concentrações de oxigênio dissolvido e altas concentrações de metais e sulfatos (AYANGBENRO; OLANREWAJU; BABALOLA, 2018; BWAPWA; JAIYEOLA; CHETTY, 2017; DAS et al., 2009). No presente estudo, a DAM avaliada apresentou pH extremamente baixo e concentrações elevadas de Fe e Mn. O baixo pH observado nas áreas de DAM ocorre devido à formação de ácido sulfúrico a partir de sulfato na presença de prótons H⁺ (OYETIBO et al., 2021). Esse processo solubiliza e facilita a mobilidade de metais a partir da matriz geológica (AYANGBENRO; OLANREWAJU; BABALOLA, 2018).

As concentrações de metais encontradas no sedimento e na água foram extremamente elevadas. Para questões de referência a resolução nacional brasileira (Resolução CONAMA n°357/2005) prevê que águas para usos menos restritivos como irrigação, dessedentação de animais e harmonia paisagística devam ter no máximo 5,0 mg/L de Fe e 0,5 mg/L de Mn,

enquanto a *World Health Organization* (WHO) determina que a concentração máxima permitida em água potável é de 0,3 mg/L de Fe e 0,2 mg/L de Mn (HERSCHY, 2012). Neste local, a concentração de Fe extrapolou os limites definidos pela resolução CONAMA n°357/2005 em 32 vezes, e 60 vezes para a concentração de Mn. As altas concentrações de metais e ácidos contidos na DAM são altamente nocivas aos ecossistemas da região, alterando profundamente sua composição e estrutura (OYETIBO et al., 2021). Esses resíduos são lixiviados para importantes rios da região, chegando, inclusive na zona costeira. O comprometimento da qualidade das águas doces é severo, restringindo usos e forçando os municípios de entorno a buscar águas de outras regiões ou bacias. Problemas similares ocorrem na zona costeira, onde o pH original tende a ser levemente alcalino. Grandes descargas desses rios impactados por DAM já geraram impactos extremamente rigorosos em sistemas de maricultura e ecossistemas de franja litorânea.

3.5.2 Caracterização da biomassa algal

O teor de cinzas na biomassa das algas filamentosas foi surpreendentemente elevado (\approx 50%). Normalmente os conteúdos em cinzas para algas verdes variam entre 3 – 20% (FRANK et al., 2013; HOSSAIN; MAHLIA; SAIDUR, 2019). Esse valor elevado bem como a coloração ferrugínea da massa seca e das cinzas já chama a atenção para a possível presença de metais associados, o que foi confirmado pelo percentual de quase 10% de Fe nas cinzas. A biossorção é um processo físico-químico no qual os metais pesados são removidos da água contaminada por troca iônica, complexação de superfície, quelação e coordenação de íons metálicos por materiais adsorventes biológicos (FATHOLLAHI et al., 2021; MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013). Os sítios de ligação de íons metálicos na superfície das algas incluem grupos sulfidríla, hidroxila, fosfato, sulfato, imidazol, amina, carboxila (OYEDEPO TA, 2011). Vários fatores podem afetar a adsorção de metais, como a concentração do metal e da biomassa na solução, o pH, a temperatura, a presença de cátions e ânions, bem como o estágio metabólico do organismo (BWAPWA; JAIYEOLA; CHETTY, 2017).

Uma análise comparativa dos metais analisados no presente estudo revelou que as concentrações de metais acumulados na biomassa de algas (Fe > Mn > Zn > Cu > Ni) está relacionada com a concentração do metal na DAM (Fe > Mn > Zn > Ni > Cu), diferenciando-se apenas para Cu e Ni, onde a alga apresentou uma leve preferência pelo acúmulo de Cu em relação ao Ni. Esses resultados evidenciam que a composição inorgânica das algas filamentosas,

resultante da retenção de metais, está diretamente relacionada às suas concentrações no ambiente. Esses resultados são semelhantes ao trabalho de Freitas et al. (2011) que também observaram a relação entre a concentração de metais na DAM e a retenção de metais na biomassa, no entanto relatam preferência pelo acúmulo de Ni e Cu em relação ao Mn.

Devido à evidente aparência rica em ferro observada na biomassa das algas juntamente com a indicação da formação de óxidos de ferro, é plausível que o processo de retenção ou adsorção de ferro na biomassa esteja, pelo menos em parte, relacionado à liberação de oxigênio durante a fotossíntese das algas. À medida que o oxigênio é liberado pelas algas, o ferro dissolvido é encontrado e reduzido, sendo prontamente oxidado para formar óxidos insolúveis que se acumulam. Em condições estáveis de drenagem, esse processo pode remover quantidades significativas de ferro e outros metais da água, devido à grande quantidade de biomassa presente no local estudado. Observou-se visualmente em campo que a perturbação destas algas filamentosas pode levar à ressuspensão do material retido. Portanto, a remoção de metais parece ocorrer não tanto por absorção, mas sim por uma leve adsorção nas paredes celulares das algas. Isso sugere que, ao considerar a padronização de processos de remoção de metais mediados por essas algas filamentosas, é necessário proceder com cautela. Em resumo, a sorção de metais pelas algas filamentosas é um fenômeno complexo influenciado por diversos fatores. A compreensão desses mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de remoção de metais em soluções contaminadas.

3.5.3 Identificação da alga filamentosa

A identificação da alga filamentosa pelo método molecular do marcador *rbcl*, trouxe um resultado com baixa identidade da sequência avaliada em relação às depositadas no banco de dados do NCBI. Um dos fatos que pode explicar este ocorrido é que esta espécie pode ainda não ter sido sequenciada na região *rbcl*, e portanto, não ter uma referência depositada no banco NCBI, podendo até mesmo se tratar de uma espécie nova para a Ciência. Outra hipótese, pode ser a ocorrência de mais espécies de algas filamentosas que acabam ocasionando um ruído no resultado do sequenciamento, deixando o resultado inconclusivo. Outro aspecto citado na literatura, é a dificuldade de identificação de alguns grupos de algas filamentosas como os aqui estudados, especialmente quando passam por variações extremas nas características ambientais. Isso se deve a processos de poliforfismo em resposta a essas variações, onde uma espécie apresenta morfologias anômalas, podendo dificultar sua identificação e até gerar confusão com

outras espécies (STIBAL; ELSTER, 2005). O presente resultado evidencia que esta alga pode pertencer a classe Zygnematophyceae, ou ao menos dividir características parecidas com essas algas. Uma identidade de 93,20% com a espécie *Zygogonium ericetorum*, mostra que esta alga deve possuir características compartilhadas com esse grupo, não descartando a possibilidade de ser um nova espécie deste gênero *Zygogonium*.

A avaliação do microbioma pela região 18Sv9 realizada com o material aderido a superfície desta alga não apontou sequências para a classe Zygnematophyceae. No entanto, as sequências geradas por este sequenciamento são apenas da região v9 com comprimento médio de 232 pb, com isso alguns táxa não possuem resolução suficiente para serem identificados a níveis de maior resolução, sendo que 7% das sequencias de ASVs foram identificadas apenas a nível Eukarya.

3.5.4 Biodiversidade do microbioma

A maior alpha-diversidade pelo índice de Shannon, evidenciada nas amostras de sedimento em comparação as amostras de água, foi um fator verificado por outros estudos em ambientes de mineração como o estudo de diversidade procariótica na mina de São Domingos, Portugal (CARLIER et al., 2020). No sedimento podem ser gerados micro-nichos com condições físico-químicas distintas, apresentando diferentes minerais e acúmulo de orgânicos que precipitam e vão gerando camadas estratificadas nos sedimentos próximos à interface água-sedimento, enquanto a água apresenta uma condição mais homogênea (CARLIER et al., 2020). O que resulta em uma maior equitatividade dos grupos taxonômicos, e conseqüentemente, em um maior índice de Shannon. O menor índice de Shannon para as amostras de MSA em relação às amostras de água indica a presença de poucas espécies nesse ambiente e com altas densidades populacionais, mostrando certo favorecimento de alguns organismos na interação das algas filamentosas com a microbiota associada à sua superfície. Nesse caso podem haver mecanismos de comunicação e recrutamento, similar aos realizados pelas plantas no processo de liberação de exsudatos radiculares para atração de grupos simbiotes. Esse mesmo tipo de comportamento também foi encontrado, por exemplo, por Califano et al. (2019), que avaliaram o microbioma da alga verde *Ulva rigida* em comparação à água do ambiente onde foi coletada. Evidentemente a grande biomassa da alga filamentosa onde é encontrado o MSA, pode ter influenciado quantitativamente nas leituras.

O comportamento da alpha-diversidade dos organismos eucariontes seguiu o mesmo padrão que os procariontes. De um modo geral, para organismos procariontes e eucariontes é possível verificar que o índice de Shannon é alto para amostras do sedimento, no entanto a riqueza do sedimento é menor. O que mostra que no sedimento, ocorre uma distribuição mais uniforme da abundância da população das espécies presentes.

A avaliação da beta-diversidade revela que a estrutura das comunidades das amostras de água, MSA e sedimento são bem distintas, isso mostra que apesar de ocorrerem na mesma localidade e terem contato direto uma com a outra, elas possuem suas particularidades. Por isso, se faz necessário entender como está a composição das comunidades de cada amostra, e entender quais são os grupos dominantes e quais as possíveis interações eles podem realizar com o ambiente.

3.5.5 Composição da comunidade do microbioma

Em ambientes de DAM é muito comum o filo Proteobacteria estabelecer dominância sobre os outros filios, devido a sua plasticidade metabólica, que inclui os oxidantes de Fe e S que crescem sob condições de baixo pH e ricas em metais (GIDDINGS et al., 2020; VILLEGAS-PLAZAS; SANABRIA; JUNCA, 2019). Outro filo que estabelece uma alta dominância é o Acinobacteria que prospera em diversos sedimentos e desenvolveram mecanismos para habitar ambientes ricos em metais (GIDDINGS et al., 2020; KUANG et al., 2013). Membros do filo Nitrospirae participam da oxidação e fixação de amônia em baixo pH e ambiente oligotrófico e, posteriormente, desempenham um papel importante no processo de nitrificação no sedimento das áreas impactadas com DAM (GIDDINGS et al., 2020). O filo Desulfobacterota que teve alta frequência nas amostras de água, é um filo gerado da recente divisão taxonômica (GTDB r95 baseada em genômica) do filo Deltaproteobacteria (WAITE et al., 2020). Desulfobacterota contém várias espécies de BRS, as quais são desejáveis para processos de biorremediação. O filo Cyanobacteria apresentou uma alta frequência nas amostras de MSA, que estão associadas a superfície das algas. Por se tratarem de microrganismos fotossintéticos capazes de fixar nitrogênio, contribuindo de forma importante para a ciclagem de C e N no habitat, a sua ocorrência em ambientes de DAM tem sido relacionada a locais com maior irradiância (MESA et al., 2017), disputando espaço com as algas formadoras do biofilme.

No presente estudo, o gênero *Acidiphilium* foi o mais frequente nas amostras de água, MSA e sedimento. A maioria dos *Acidiphilium* spp. são heterotróficos aeróbicos que utilizam compostos orgânicos para obter carbono e energia, embora muitos possam obter alguma energia extra a partir da oxidação mixotrófica do ferro ferroso (GÓMEZ-VILLEGAS et al., 2022). Além disso, alguns membros do gênero foram descritos como capazes de reduzir Fe^{3+} , respirando ferro em condições anaeróbicas ou microaerofílicas, ou realizar assimilação fotossintética de CO_2 (KISKOVA et al., 2018). Já o gênero *Leptospirillum* inclui diferentes espécies oxidantes de ferro, cujo papel no ambiente ácido tem ganhado cada vez mais reconhecimento (GÓMEZ-VILLEGAS et al., 2022; HUA et al., 2014). Reconstruções metabólicas sugerem que *Leptospirillum* pode realizar a fixação de carbono através do novo ciclo redutivo do ácido tricarboxílico (MONTROYA et al., 2012) e foi encontrado como o principal fixador de nitrogênio em sistemas de DAM (HUA et al., 2014; VILLEGAS-PLAZAS; SANABRIA; JUNCA, 2019). O gênero *Ferrovum* encontrado nas amostras de água é uma bactéria quimioautotrófica oxidante de ferro, estritamente acidófila, aeróbia obrigatória e amplamente distribuída em ambientes extremamente ácidos (pH 2–4) (ZHANG et al., 2021). É um gênero amplamente detectado em ambientes ácidos em todo o mundo por métodos de biologia molecular, mas apenas a cepa do tipo *Ferrovum myxofaciens* P3G foi isolada e caracterizada com sucesso devido ao seu isolamento extremamente difícil (JOHNSON; HALLBERG; HEDRICH, 2014). O gênero *Frankia* encontrado em amostras de água e #sedimento, é comumente encontrado em ambientes de rizosfera de plantas. Trata-se de uma bactéria fixadora de nitrogênio no solo, que possui a capacidade de produzir metalóforos de forma dinâmica e adaptativa para gerenciar o estresse do metal, levando à aquisição e/ou detoxificação (DEICKE et al., 2019). Outro gênero acidófilo encontrado nas amostras de água, que é representante das bactérias oxidantes de enxofre é *Acidithiobacillus*. Tratam-se, em geral, de bactérias Gram-negativas autotróficas estritas, que podem fixar tanto carbono quanto nitrogênio da atmosfera, utilizando compostos de enxofre reduzido como fonte primária de energia e gerando as espécies oxidadas de enxofre correspondentes (WANG et al., 2019). Algumas espécies do gênero também são capazes de oxidar ferro ferroso em ferro férrico ou crescer anaerobicamente, usando ferro férrico comoceptor final de elétrons (WANG et al., 2019). As espécies mais abundantes deste gênero nas amostras do presente estudo foram *A. ferriphilus* e *A. ferrooxidans* que, além de sulfetos e outros compostos sulfurados, são capazes de oxidar ferro ferroso a férrico, sendo importantes contribuintes para os ciclos biogeoquímicos

do ferro e do enxofre (AULD et al., 2013; GÓMEZ-VILLEGAS et al., 2022; WANG et al., 2019).

A participação do Filo Arthropoda foi basicamente pelo grupo Diptera representado pelas espécies *Drosophila suzukii* e *Chironomus tentans*. Não encontrou-se relatos prévios da existência do ciclo de espécies do gênero *Drosophila* em ambientes de DAM. A sua ocorrência pode ser acidental, tendo seu material genético se depositado na área de amostragem, porém não se descarta a hipótese que alguma linhagem extremófila desta espécie possa ter se adaptado a esta condição. Já foi documentado na literatura que no genoma de *Drosophila melanogaster* foram encontrados quatro genes de metalotioneína (*MtnA*, *MtnB*, *MtnC*, *MtnD*), todos induzidos transcricionalmente por metais pesados através do mesmo fator de transcrição responsivo a metais (MTF-1), os quatro genes da metalotioneína exibem papéis distintos, embora sobrepostos, na homeostase dos metais pesados e na prevenção da toxicidade (EGLI et al., 2006). Já as espécies de *Chironomus* podem apresentar adaptações fisiológicas que permitem habitar locais contaminados com metais, através da sua capacidade de ajustar a concentração de metais em seu corpo quando comparadas a outras espécies (LOAYZA-MURO et al., 2014). Espécies de *Chironomus* encontrados em locais de altitudes elevadas e contaminadas com metais contêm mais melanina do que espécies de locais de referência em altitudes mais baixas, o que destaca a importância da melanina como protetor da radiação UV-B e quelante de metais (LOAYZA-MURO et al., 2013). Além disso, descobriu-se que a adaptação genética é uma ferramenta de tolerância a metais em espécies de *Chironomus* de ambientes altamente contaminados (GROENENDIJK et al., 2002). No trabalho de LOAYZA-MURO *et al.* (2013, descobriu-se que apenas uma cepa de *Chironomus* foi capaz de sobreviver nos pontos mais ricos em metais dos Andes, o que indica que a tolerância poderia ter sido desenvolvida como uma resposta aos ambientes naturalmente ácidos e ricos em metais. É possível que a adaptação dessas espécies em ambientes de alta concentração de metais repercuta em crescimento reduzido, visto que a produção de melanina ou esclerotização da cutícula consomem muita energia (LUÍS et al., 2021).

A maior frequência do Filo Chlorophyta nas amostras de MSA se deu pela espécie *Pumilosphaera acidophila*. O gênero *Pumilosphaera* foi recentemente criado em uma subdivisão do gênero *Auxenochlorella* que é um subgênero de *Chlorella*. Essa espécie tem sido anteriormente descrita como *Chlorella protothecoides* var. *acidicola* ou *Auxenochlorella protothecoides* var. *acidicola*, e existem alguns relatos da sua ocorrência em ambientes de DAM (ÑANCUCHEO; JOHNSON, 2012; SHE et al., 2022).

Os filios Ascomycota e Basidiomycota são comumente encontrados em ambientes de mineração (BAKER et al., 2009; LUÍS et al., 2021). A espécie *Aspergillus penicillioides*, que foi a mais frequente no filo Ascomycota é conhecida como um fungo metal tolerante, encontrado em ambientes de mineração. Esta espécie é conhecida por produzir grande quantidade de EPS, capaz de realizar a biossorção de metais pesados como o Pb(II), podendo ser utilizado como agente adsorvente para recuperação de metais (PARIA; PYNE; CHAKRABORTY, 2021). A espécie *Aspergillus versicolor* também já foi encontrada em ambientes de mineração, e teve seus mecanismos de tolerância a metais pesados elucidados (HARPKE et al., 2022). O gênero *Malassezia* (filio Basidiomycota), já foi relatado como organismo presente em ambientes impactados por atividades de mineração de ouro (BONILLA et al., 2018).

A presença de rotíferos Adinetida está praticamente associada as amostras de MSA, o que pode ser favorecido pelo ambiente rico em oxigênio da superfície algal.

3.5.6 Interação entre alga filamentosa e o microbioma

O fato que mais chama a atenção no microbioma associado a superfície da alga é a alta frequência da bactéria do gênero *Acidiphilium* e a espécie de microalga eucarionte *Pumilosphaera acidofila*. *Acidiphilium* é um gênero versátil que pode utilizar muitas fontes de carbono para obtenção de energia. Uma vez que densas populações algais, tendem a exsudar diversos tipos de moléculas orgânicas (produção primária dissolvida), é possível que *Acidiphilium* esteja se beneficiando em uma relação típica de de microbial loop Além disso, esse gênero é capaz de realizar uma estreita relação simbiótica com bactérias quimioautotróficas oxidantes de ferro, como *Ferrovum* e *Acidithiobacillus* que foram encontradas em alta frequência na água (ZHANG et al., 2021). No estudo de Ñancuqueo e Johnson (2012), foi relatado uma interação da espécie *Pumilosphaera acidofila* com *Acidiphilium*, sendo que a espécie *Pumilosphaera acidofila* é capaz de fornecer os monossacarídeos frutose e glicose promovendo o crescimento de *Acidiphilium* que nestas condições realiza a redução de ferro (e sulfato) que são importantes na remediação de águas impactadas por minas. Além disso, existem evidências que a presença do gênero *Acidiphilium* facilita o domínio de outras espécies ao degradar substâncias orgânicas tóxicas (HUA et al., 2014).

Um estudo que avaliou a matéria orgânica dissolvida em um lago de DAM mostrou que as microalgas foram os produtores primários predominantes no sistema e contribuíram

significativamente para a concentração total da matéria orgânica dissolvida na coluna de água, enquanto a quimiodiversidade desta matéria foi correlacionada com a diversidade da comunidade bacteriana (SHE et al., 2022). Este mesmo estudo apresentou potenciais interações entre microalgas-bactérias através da análise de redes de interações, e observou conexões entre os filos bacterianos Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria e os genes da microalga *Pumiliosphaera*. O que novamente reforça a estreita interação encontrada entre os organismos dominantes nas amostras de MSA.

Um dos processos amplamente estudados na literatura é a utilização de sistemas de biorremediação com a BRS, que realizam a redução do sulfato produzindo alcalinidade e simultaneamente a precipitação de sulfetos metálicos da solução (AYANGBENRO; OLANREWAJU; BABALOLA, 2018; BWAPWA; JAIYEOLA; CHETTY, 2017; DAS et al., 2009). O processo de biorremediação da DAM com BRS necessita de requisitos ambientais especiais, como condição anaeróbica, pH alto, doadores de elétrons suficientes e substrato adequado para imobilização (AYANGBENRO; OLANREWAJU; BABALOLA, 2018; DAS et al., 2009). Um dos efeitos importantes das algas filamentosas e microalgas é a formação de biomassa e liberação de produtos extracelulares que servem como fonte de carbono para BRS. O desenvolvimento de tecnologia que utiliza BRS para remediação de DAM geralmente está limitado pelo custo e disponibilidade de uma fonte de carbono (BWAPWA; JAIYEOLA; CHETTY, 2017). A produção primária dissolvida das algas pode apoiar o metabolismo das BRS de uma forma econômica e sustentável (BWAPWA; JAIYEOLA; CHETTY, 2017; DAS et al., 2009). E esta é uma condição que observa-se neste estudo, entre as interações de alga filamentosa, microalgas, bactérias e fungos fornecem conduções para as bactérias do gênero *Acidiphilium* realizarem redução de S.

Além disso, os fungos também são capazes de reduzir as concentrações de metais e, em menor grau, a acidez na DAM. Como já citado o fungo *Aspergillus penicillioides* encontrado na superfície da alga filamentosa nas amostras de MSA, é um grande produtor de EPS, que atua como um bom adsorvente de metais, bem como fonte de carbono para as BRS (PARIA; PYNE; CHAKRABORTY, 2021). No entanto, o papel ecológico dos fungos na DAM precisa ser melhor estudado. Sabe-se que a degradação da matéria orgânica é prejudicada na ausência de invertebrados que destroem ativamente as estruturas maiores da matéria orgânica (trituradores) (DAS et al., 2009). Como pode-se constatar neste estudo, a população de invertebrados em DAM é muito reduzida, e isto, faz com que os fungos desempenhem um papel importante como degradadores primários de matéria orgânica complexa.

O conhecimento gerado por este estudo fornece informações para abordagens promissoras que envolvem a exploração de múltiplos efeitos benéficos das algas filamentosas e microalgas, como a *Pumiliosphaera acidofila* encontrada em grande frequência neste estudo. Entre os benefícios podemos destacar a disponibilização de matéria orgânica e criação de zonas anóxicas, que contribuem para a geração de alcalinidade biogênica, criando um ambiente favorável para as BRS. Além disso, estas algas podem adsorver e imobilizar os metais pesados em sua biomassa (AYANGBENRO; OLANREWAJU; BABALOLA, 2018; BWAPWA; JAIYEOLA; CHETTY, 2017; DAS et al., 2009).

A limitação de nutrientes disponíveis é o principal desafio para o crescimento das algas em águas contaminadas por DAM, por isso, uma abordagem que equilibre a disponibilidade de nutrientes é necessária para alcançar os melhores resultados, visto que o aumento da biomassa das algas é induzido pela disponibilidade de nutrientes (DAS et al., 2009). A coexistência de várias espécies de algas (filamentosas e microalgas) e fungos enriquece efetivamente as fontes de carbono, auxiliando na manutenção da população de BRS em um ambiente predominantemente anaeróbico.

3.6 CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou a capacidade notável de adaptação de organismos às condições extremas de um ambiente impactado pela DAM, caracterizado por elevados níveis de acidez, concentrações significativas de metais pesados e sulfatos. A biomassa composta por algas filamentosas apresentou uma concentração surpreendente de cerca de 10% de massa seca em Fe, o que ressalta seu potencial promissor para processos de remediação ambiental, em especial para remoção de metais. Além disso, este estudo revelou que a composição dos metais nas algas filamentosas está diretamente relacionada às concentrações de metais no ambiente. Os gêneros *Ferrovum*, *Acidithiobacillus* e *Leptospirillum* se apresentaram como os principais micro-organismos responsáveis pela formação da DAM neste ambiente a partir da oxidação de Fe e S.

As variações físico-químicas entre as amostras de água, MSA e sedimento proporcionaram a formação de comunidades procariontes e eucariontes bem distintas entre si. A superfície da alga filamentosa em DAM é um microambiente que favorece o crescimento de alguns micro-organismos específicos em maior abundância, gerando uma menor alpha-diversidade, o que pode ser um mecanismo de atração de determinados grupos que promovem ações simbióticas.

O MSA apresentou em sua composição uma grande frequência da microalga *Pumiliosphera acidofila*, da bactéria *Acidiphilium*, e do fungo *Aspergillus penicillioides* que juntos podem promover os benefícios gerados (fonte de carbono, zonas anóxicas, produção de alcalinidade biogênica e redução de sulfato) para reduzir os impactos da DAM.

4 DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo teve grande contribuição com o conhecimento sobre a DAM global e sobretudo, para a região da BCSC, que teve alguns ambientes explorados.

Primeiramente realizou-se um estudo que organizou as informações relacionadas sobre os mecanismos de adaptação e sobrevivência em ambientes de DAM. As revisões preparadas por este estudo agruparam informações sobre os mecanismos necessários para adaptação em condições adversas apresentadas pelo ambiente de DAM. Agora essas informações encontram-se agrupadas para a comunidade científica fazer o uso dessas informações de aprofundar o conhecimento sobre esses ambientes impactados pela mineração.

A primeira revisão agrupou os mecanismos para obtenção de energia que envolvem majoritariamente os nutrientes enxofre, ferro, carbono e nitrogênio. Os nutrientes como carbono, nitrogênio e fósforo geralmente são limitados em ambientes de DAM, enquanto por outro lado existe uma grande concentração de enxofre e ferro. Portanto, isso faz com que os micro-organismos que conseguem obter energia a partir de enxofre e ferro exerçam dominância nesses ambientes. Cabe ressaltar, que em relação ao enxofre e o ferro existem duas formas de obtenção de energia, a partir das reações de oxidação e de redução. E isso está completamente ligado a geração e a mitigação de DAM, porque a oxidação realiza a geração de DAM, e por outro lado, a redução faz com que o pH aumente e os metais precipitem promovendo assim uma minimização dos efeitos críticos da DAM. Um dos fatores que faz com que prevaleçam as reações de oxidação ou as de redução é a existência de nutrientes e dos micro-organismos necessários para realiza-las. Importante lembrar, algo que foi amplamente discutido na revisão, é que o processo de redução necessita de algum substrato que forneça elétrons, como é o caso do carbono, amplamente utilizado para essa finalidade. O levantamento desse tipo de informação é muito importante para o direcionamento das ações que devem ser tomadas a campo para o entendimento e mitigação das situações encontradas.

A outra revisão realizou um levantamento de mecanismos de adaptação a metais pesados em DAM. Esse conhecimento é muito importante porque os ambientes de mineração apresentam uma quantidade muito alta em concentrações e variedade de metais. Os mecanismos listados nesta revisão são processos biológicos desenvolvidos pelos micro-organismos para sobreviverem nessas condições de DAM. E alguns deles quando bem explorados podem ser utilizados para propor processos de mitigação dos danos da DAM.

E por fim a terceira revisão que agrupou informações relevantes sobre a interação dos micro-organismos com os metais o que é extremamente importante, já que esta interação é diferenciada de um metal para o outro. Os micro-organismos desenvolveram estratégias diferentes para lidar com cada tipo de metal pesado. Embora hajam algumas estratégias compartilhadas, a grande maioria delas é personalizada para cada metal, e por isso é de tamanha relevância ter um estudo que aprofunde a particularidade da interação de cada metal.

Depois de um aprofundamento teórico sobre o ambiente de DAM, seus micro-organismos e mecanismos, realizou-se o estudo à campo. A BCSC apresenta diversos ambientes diferentes em diversos contextos de mineração (SILVA et al., 2013). Existem nesta localidade, minas ativas, minas que foram abandonadas e minas que foram desativadas com o processo de monitoramento, e existem ainda alguns locais impactados por DAM que recebem um monitoramento reduzido. Quando se iniciou esse estudo buscou-se realizar a amostragem em locais com diferentes condições de impacto ambiental pela DAM. Por isso, as áreas estudadas apresentam bastante características distintas. Em algumas delas as características de metais e pH são aproximadas, no entanto, o processo de mineração, a localidade ou ainda a forma com que a mina foi desativada apresenta uma condição diferente. Isso possibilitou a esse estudo uma visão mais abrangente sobre a composição das comunidades microbianas nos ambientes de DAM da BCSC.

Nesta região da BCSC já foram realizados diversos estudos, alguns deles determinando variáveis físico-químicas das formações rochosas e dos processos de mineração (SILVA et al., 2013; SILVA; WOLLENSCHLAGER; OLIVEIRA, 2011). E existem alguns estudos avaliando algumas poucas espécies de bactérias ou de algas (CASTRO-SILVA et al., 2003; FREITAS; SCHNEIDER; SCHWARTZBOLD, 2011; MASSOCATO et al., 2018; SOUZA et al., 2017). Dentro desse contexto este presente estudo trouxe algo inédito para esta localidade, que é a avaliação de uma forma mais profunda sobre a composição das comunidades presentes nesses ambientes, por sequenciamento de meta-taxonomia. Essas informações foram relacionadas com informações abióticas entendendo como funcionam as dinâmicas de povoamento e estabelecimento desses organismos nesses locais. Optou-se nesse estudo avaliar a água e o sedimento e ainda avaliar as comunidades procariontes e eucariontes. A maioria dos estudos encontrados na literatura abordam apenas as comunidades procariontes e vários deles acabam focando em apenas um ambiente, sendo a que a maioria se concentra na água da DAM. Estudar as comunidades eucariontes apresenta alguns desafios, o primeiro deles é que os marcadores disponíveis não são tão abrangentes para a grande quantidade de organismos eucariontes. Por

exemplo, o marcador utilizado nesse estudo o 18sV9, apresenta uma limitação em identificar alguns tipos de organismos. No entanto a utilização dessa abordagem trouxe uma grande quantidade de informações inéditas sobre alguns grupos de organismos encontradas no ambiente de DAM. Em geral a literatura tem poucas abordagens a respeito de organismos eucariontes em ambientes de DAM (LUÍS et al., 2021). Existe um senso comum de que esses ambientes são limitados em sua diversidade de organismos eucariontes. E o presente estudo mostrou a presença de diversos grupos como organismos fotossintéticos (Ochrophyta, Chlorophyta e Cryptophyceae), fungos (Basidiomycota, Ascomycota e Cryptomycota), ciliados (Ciliophora) e protistas (Heterolobosea, Cercozoa). Isso mostra que esses ambientes possuem um arcabouço de organismos eucariontes que podem ser melhor explorados principalmente pensando na revitalização desses ambientes e em processos de biorremediação.

Além disso, esse estudo mostrou que as diferenças encontradas nas condições de pH e concentrações de metais e nutrientes foram determinantes para o estabelecimento de determinados grupos de organismos nos ambientes de DAM. Isso quer dizer que a variação dessas condições abióticas faz com que determinados grupos possam se estabelecer e dominar o ambiente avaliado.

As informações apresentadas pelas CCAs mostram de uma forma muito clara o agrupamento de certos grupos taxonômicos com algumas forçantes ambientais, apresentando uma boa porcentagem de explicabilidade para os fenômenos avaliados. Ainda que os níveis de permutação desta análise não apresentaram um nível estatístico desejável, essas análises revelam a tendência de como os micro-organismos se comportam em relação às variáveis abióticas encontradas no ambiente. Como pode-se observar, a variação do pH foi o fator que melhor determinou a composição da comunidade procarionte, enquanto para a comunidade eucarionte, a concentração de nutrientes (TOC e N) e de metais (Ni, Cu, Mn e Zn) apresentaram a melhor explicabilidade sobre a composição da comunidade. Essa informação é de extrema relevância para o conhecimento da comunidade científica, por dois motivos. O primeiro é que foi possível entender que algumas espécies se mostraram indicadoras de ambientes mais impactados pela DAM, enquanto, outras espécies se apresentaram indicadores de um ambiente de transição de DAM, ou seja, quando os ambientes apresentam características mais amenizadas de poluição pelos danos da DAM. E o segundo é porque esse conhecimento pode ser utilizado para propor técnicas e mecanismos de biorremediação levando em consideração as características abióticas do local.

Neste sentido, foram encontrados como bioindicadores de áreas impactadas altamente impactada por DAM os gêneros procariontes, *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Thiomonas*, *Thermogymnomonas* e *Acidobacterium*; e eucariontes a alga *Poteriospumella* (Chrysophyceae), ciliados Hypotricha e fungos LKM11. Para ambientes de transição, com fracas condições de acidez e metais em DAM, os gêneros que possuem indícios como bioindicadores são *Sediminibacterium*, *Gallionella*, *Geothrix* e *Geobacter*.

Outra característica relevante desse estudo é que ele mostrou que existe uma diferença nas diversidades dos micro-organismos encontrados nos sedimentos e na água. Como foi possível verificar, no sedimento existe uma biodiversidade maior através da observação pelo índice de Shannon. O que mostra que a criação de micro camadas de deposição de nutrientes sobre a superfície do sedimento criam microambientes proporcionando diferentes tipos de metabolismos, e portanto, aumentando a alfa-diversidade encontrada nesses ambientes (CARLIER et al., 2020).

Durante as primeiras visitas realizadas nos ambientes das estações estudadas, notou-se na estação #3, uma peculiaridade, que é o estabelecimento de algas filamentosas que cresceu em uma grande biomassa ao longo de um córrego com pH extremamente ácido (2,25). Um outro fato que chamou a atenção foi que nesta localidade plantas do gênero *Eleocharis* estavam com aspecto de morte as margens deste córrego. É conhecido que espécies de *Eleocharis* tem uma adaptação para sobrevivência nesses ambientes (PRIHATINI; SOEMARNO, 2021). Ou seja, o fato delas se apresentarem em processo de morte representa que este local apresentava características bem agressivas de DAM. Isso motivou um estudo mais aprofundado desta estação, gerando assim o segundo capítulo desta tese.

No capítulo 2, buscou-se compreender e caracterizar o potencial de biorremediação do microbioma associado a superfície dessas algas filamentosas. Realizou-se assim um estudo sobre as concentrações de metais na biomassa das algas encontradas nesse córrego e sobre as comunidades procariontes (16S) e eucariontes (18S) relacionadas com o MSA e ambiente. Por isso avaliou-se o microbioma das espécies contidas no MSA e de amostras de água e sedimento desse local avaliado. Desta forma foi possível entender como que estava ocorrendo a dinâmica populacional nesse ambiente como um todo. Em um primeiro momento, encontrou-se uma notável capacidade de retenção de metais nesta biomassa (cerca de 10% de ferro em biomassa seca). Esse fato isoladamente já apresenta um grande potencial de biorremediação, que ocorre naturalmente neste ambiente extremamente ácido (pH 2,25).

O estudo das comunidades procariontes e eucariontes desse ambiente mostrou que o microbioma do MSA apresentou uma alfa-diversidade (índice de Shannon) menor daquelas encontradas nos ambientes de água e sedimento, favorecendo a dominância de algumas espécies específicas. Algo semelhante é visto na rizosfera das plantas, onde essas liberam exsudatos radiculares que recrutam micro-organismos específicos para a realização de funções metabólicas para a planta em troca de nutrientes, formando assim uma relação simbiótica (LI et al., 2021a). Portanto, não se descarta que nesse ambiente possa ter ocorrido algum processo semelhante que esteja recrutando micro-organismos específicos junto à superfície dessas algas filamentosas estabelecendo assim uma relação simbiótica. São necessários alguns estudos mais específicos para aprofundar esta hipótese.

Neste mesmo estudo o ambiente de água apresentou três gêneros procariontes (*Ferrofumum*, *Acidithiobacillus* e *Leptospirillum*) amplamente conhecidos na literatura como oxidantes de Fe e S, em uma alta frequência nas amostras de água e que também compartilhavam uma certa presença nas amostras de MSA (GÓMEZ-VILLEGAS et al., 2022; WANG et al., 2019; ZHANG et al., 2021) Isto sugere que esses micro-organismos são os potenciais responsáveis pela formação da DAM neste ambiente.

O MSA das algas filamentosas apresentou em sua composição uma grande frequência da microalga *Pumiliosphaera acidofila* e da bactéria *Acidiphilium*, já existem na literatura alguns estudos que relatam uma simbiose entre esses organismos onde as microalgas *Pumiliosphaera acidofila* fornecem algum tipo de nutriente para as bactérias *Acidiphilium* favorecendo a sua co-existência (ÑANCUCHEO; JOHNSON, 2012). Outro fato interessante é que as bactérias do gênero *Acidiphilium* são versáteis e realizam tanto a oxidação quanto a redução de sulfato em ambientes de DAM. O que difere a sua preferência por um tipo de metabolismo ou outro são as condições em que ela se encontra. Por exemplo, com a existência de carbono disponível, uma região anóxica, ou seja, ambiente anaeróbico, essas bactérias realizam a redução de sulfato (GÓMEZ-VILLEGAS et al., 2022; ÑANCUCHEO; JOHNSON, 2012). Lembrando que essas reações de redução de sulfato são as reações requeridas para minimizar os ambientes de DAM, pela geração de um aumento no PH das áreas impactadas.

É interessante entender que as bactérias do gênero *Chlorella* já foram amplamente estudadas na literatura como agentes de biorremediação em ambientes de DAM (ALMEIDA et al., 2023). Entendendo que as algas *Pumiliosphaera acidofila* eram classificados como *Chlorella* elas podem apresentar essas mesmas características.

No ambiente do MSA foi encontrado o fungo *Aspergillus penicillioides*, que já foi amplamente destacado na literatura como um grande produtor de EPS realizando assim a imobilização de metais (PARIA; PYNE; CHAKRABORTY, 2021). Além disso, sabe-se que o EPS é uma fonte de carbono para as BRS (DAS et al., 2009).

Isso nos leva a ver um ambiente onde podem ocorrer diversas relações simbióticas entre as algas filamentosas, as microalgas *Pumilosphaera acidofila* a bactéria *Acidiphilium* os fungos *Aspergillus penicillioides*, gerando condições com disponibilidade de carbono, regiões anóxicas e produção de alcalinidade biogênica, promovendo assim a redução de sulfato (DAS et al., 2009). O que mostra que a comunidade do MSA e algas filamentosas como um todo promove um processo de biorremediação natural desse ambiente impactado, sendo importante a sua presença nesta localidade de DAM.

Apesar das algas filamentosas apresentarem grande eficiência na imobilização de metais e aumento do PH nessas localidades, eles apresentam uma desvantagem. A biomassa dessas algas quando morrem, se depositam no sedimento fazendo com que o metal permaneça ainda nesta localidade (NEWSOME; FALAGÁN, 2021). No entanto, se utilizarmos esses biofilmes em um processo de biorremediação onde eles sejam removidos das áreas impactadas, faz com que a gente possa retirar, concentrar e até mesmo recuperar metais em suas estruturas biológicas. Isso abre um leque de aplicações, entre elas, essa biomassa pode uma fonte de suplemento de Fe que pode ser aplicada em diversas ocasiões como por exemplo na agricultura em solos deficientes em Fe.

Além disso um outro fato interessante da presença dessas algas filamentosas nesses ambientes de DAM é que eles apresentam uma grande capilaridade pela extensão de água onde se encontram, criando assim um estrutura capaz de reter uma grande quantidade de folhas que caem das árvores próximas a esta localidade e essas folhas então se depositam nesse local fazendo com que haja a permanência de matéria orgânica nesse ambiente (ver figura 14B e C). Como já comentado anteriormente, a presença de matéria orgânica em ambientes de DAM favorecem algumas reações de redução por micro-organismos redutores de sulfato. Cabe lembrar ainda, que nesse mesmo ambiente as amostras de água apresentaram uma alta frequência do filo Desulfobacterota, que é conhecido por abrigar uma grande quantidade de micro-organismos redutores de sulfato (WAITE et al., 2020). O que mais uma vez corrobora que a presença dessas algas e seu microbioma associado nesta localidade tem proporcionado processos de biorremediação para esta DAM.

Sabe-se que uma das dificuldades encontradas por esses tipos de processos de biorremediação é a velocidade no estabelecimento da biomassa nesses ambientes. As condições extremas impostas pela DAM fazem com que o crescimento dessas algas filamentosas seja reduzido em comparação com outros tipos de algas encontradas em condições normais de água. Portanto, é preciso estabelecer processos de produção dessas biomassas para que então esse processo seja difundido.

Em resumo esse estudo apresenta uma visão abrangente das comunidades procariontes e eucariontes encontradas em ambiente de DAM na BCSC. Evidenciando um processo natural de biorremediação encontrado em uma das estações estudadas, que apresenta um grande potencial de aplicação em uma escala maior para a biorremediação desses locais.

5 CONCLUSÃO GERAL

No **capítulo 1** desta tese foi possível verificar que as diferenças na composição das comunidades podem distinguir os locais altamente contaminados com DAM (pH 2.7-3.6) dos locais com níveis intermediários de contaminação (pH 3.8-4.25), indicando possíveis bioindicadores para a região da BCSC. A presença dos gêneros procariontes, *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Thiomonas*, *Thermogymnomonas* e *Acidobacterium* e os eucariontes *Potriospumella* (Chrysophyceae), ciliados Hypotricha e fungos LKM11 puderam indicar áreas altamente impactadas por DAM. Enquanto que os gêneros procariontes *Sediminibacterium*, *Gallionella*, *Geothrix* e *Geobacter* indicaram ambientes de transição, com níveis intermediários de contaminação por DAM

Além disso a variação do pH foi o fator que melhor determinou a composição da comunidade procarionte, enquanto para a comunidade eucarionte, a concentração de nutrientes (TOC e N) e de metais (Ni, Cu, Mn e Zn) apresentaram a maior influência sobre a composição da comunidade.

Apesar da DAM ser um ambiente restritivo, uma grande diversidade de grupos de organismos eucariontes foram encontrados como os organismos fotossintéticos (Ochrophyta, Chlorophyta e Cryptophyceae), fungos (Basidiomycota, Ascomycota e Cryptomycota), ciliados (Ciliophora) e protistas (Heterolobosea, Cercozoa).

O **capítulo 2**, evidenciou a capacidade notável de adaptação de organismos às condições extremas de um ambiente impactado pela DAM. A biomassa composta por algas filamentosas apresentou uma concentração surpreendente de cerca de 10% de massa seca em Fe, com grande potencial de biorremediação. Além disso, este estudo revelou que a composição inorgânica dos metais desta biomassa está diretamente relacionada às concentrações de metais no ambiente. Os gêneros *Ferrovum*, *Acidithiobacillus* e *Leptospirillum* se apresentaram como os potenciais micro-organismos responsáveis pela formação da DAM neste ambiente a partir da oxidação de Fe e S.

A superfície da alga filamentosa em DAM é um microambiente que favorece o crescimento de alguns micro-organismos específicos em maior abundância, gerando uma menor alpha-diversidade. O MSA possui em sua composição uma grande frequência da microalga *Pumiliosphaera acidofila*, da bactéria *Acidiphilium*, e do fungo *Aspergillus penicillioides* que juntos podem promover os benefícios gerados (fonte de carbono, zonas

anóxicas, produção de alcalinidade biogênica e redução de sulfato) para reduzir os impactos da DAM.

Em resumo, foi possível concluir que os microbiomas procariontes e eucariontes respondem as condições abióticas nos ambientes de mineração, e que alguns taxa podem indicar se o ambiente está altamente impactado ou em nível intermediário. As algas filamentosas com seu microbioma de superfície contendo microalgas, fungos e bactérias proporcionam mecanismos de biorremediação natural para estes ambientes. Estudos futuros utilizando estas algas filamentosas e seu MSA devem ser considerados para explorar novos processos biotecnológicos de tratamentos.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOV, S. M.; STRAUB, D.; TEJADA, J.; GRIMM, L.; SCHÄDLER, F.; BULAEV, A.; THORWARTH, H.; AMILS, R.; KAPPLER, A.; KLEINDIENST, S. Biogeochemical Niches of Fe-Cycling Communities Influencing Heavy Metal Transport along the Rio Tinto, Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 4, p. 1–18, 2021.
- AGUILERA, A. Eukaryotic Organisms in Extreme Acidic Environments, the Río Tinto Case. **Life**, v. 3, n. 3, p. 363–374, 2013.
- AHMANN, D.; ROBERTS, A. L.; KRUMHOLZ, L. R.; MOREL, F. M. M. Microbe grows by reducing arsenic. **Nature**, v. 371, n. 6500, p. 750–750, 1994.
- AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: roles and applications. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196–208, 2014.
- ALHASAWI, A.; AUGER, C.; APPANNA, V. D. P.; CHAHMA, M.; APPANNA, V. D. P. Zinc toxicity and ATP production in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 65–73, 2014.
- ALKORTA, I.; AIZPURUA, A.; RIGA, P.; ALBIZU, I.; AMÉZAGA, I.; GARBISU, C. Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. **Reviews on Environmental Health**, v. 18, n. 1, p. 65–73, 2003.
- ALMEIDA, Â.; COTAS, J.; PEREIRA, L.; CARVALHO, P. Potential Role of *Spirogyra* sp. and *Chlorella* sp. in Bioremediation of Mine Drainage: A Review. **Phycology**, v. 3, n. 1, p. 186–201, 2023.
- AMARAL-ZETTLER, L. A.; MCCLIMENT, E. A.; DUCKLOW, H. W.; HUSE, S. M. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA Genes. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. e6372, 2009.
- AMARAL ZETTLER, L. A.; GÓMEZ, F.; ZETTLER, E.; KEENAN, B. G.; AMILS, R.; SOGIN, M. L. Eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. **Nature**, v. 417, n. 6885, p. 137–137, 2002.
- AMBIADO, K.; BUSTOS, C.; SCHWARZ, A.; BÓRQUEZ, R. Membrane technology applied to acid mine drainage from copper mining. **Water Science and Technology**, v. 75, n. 3, p. 705–715, 2017.
- AMEND, J. P.; SALTIKOV, C.; LU, G. S.; HERNANDEZ, J. Microbial Arsenic Metabolism and Reaction Energetics. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 79, n. 1, p. 391–433, 2014.
- ANDREI, A.; ÖZTÜRK, Y.; KHALFAOUI-HASSANI, B.; RAUCH, J.; MARCKMANN, D.; TRASNEA, P. I.; DALDAL, F.; KOCH, H. G. Cu Homeostasis in Bacteria: The Ins and Outs. **Membranes**, v. 10, n. 9, p. 242, 2020.
- ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUÍÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 215–237, 2003.

ANDRUNIK, M.; WOŁOWIEC, M.; WOJNARSKI, D.; ZELEK-POGUDZ, S.; BAJDA, T. Transformation of Pb, Cd, and Zn Minerals Using Phosphates. **Minerals**, v. 10, n. 4, p. 342, 2020.

ANTSOTEGI-USKOLA, M.; MARKINA-IÑARRAIRAEGUI, A.; UGALDE, U. New insights into copper homeostasis in filamentous fungi. **International Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 65–73, 2020.

APHA. 5310 total organic carbon. In: LIPPS, W. C.; BAXTER, T. E.; BRAUN-HOWLAND, E. (Eds.). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23rd. ed. Washington, DC: APHA Press, 2018. a.

APHA. 3120 metals by plasma emission spectroscopy. In: LIPPS, W. C.; BAXTER, T. E.; BRAUN-HOWLAND, E. (Eds.). **Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater**. 23. ed. Washington DC: APHA Press, 2018. b.

APHA. 4500-N NITROGEN. In: LIPPS, W C; BAXTER, T E; BRAUN-HOWLAND, E. (Ed.). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23rd. ed. Washington, DC: APHA Press, 2018. c.

ARORA, N. K.; VERMA, M. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. **3 Biotech**, v. 7, n. 6, p. 1–9, 2017.

ASSHAUER, K. P.; WEMHEUER, B.; DANIEL, R.; MEINICKE, P. Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 17, p. 2882–2884, 2015.

AULD, R. R.; MYKYTCZUK, N. C. S.; LEDUC, L. G.; MERRITT, T. J. S. Seasonal variation in an acid mine drainage microbial community. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0215>, v. 63, n. 2, p. 137–152, 2017.

AULD, R. R.; MYRE, M.; MYKYTCZUK, N. C. S.; LEDUC, L. G.; MERRITT, T. J. S. Characterization of the microbial acid mine drainage microbial community using culturing and direct sequencing techniques. **Journal of Microbiological Methods**, v. 93, n. 2, p. 108–115, 2013.

AYANGBENRO, A. S.; OLANREWaju, O. S.; BABALOLA, O. O. Sulfate-reducing bacteria as an effective tool for sustainable acid mine bioremediation. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, 2018.

BADGER, M. R.; PRICE, G. D. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 383, p. 609–622, 2003.

BAESEMANN, J. L.; SMITH, R. L.; SILVERSTEIN, J. Denitrification potential in stream sediments impacted by acid mine drainage: Effects of pH, various electron donors, and iron. **Microbial Ecology**, v. 51, n. 2, p. 232–241, 2006.

BAKER, B. J.; TYSON, G. W.; GOOSHERST, L.; BANFIELD, J. F. Insights into the diversity of eukaryotes in acid mine drainage biofilm communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2192–2199, 2009.

BANG, S. W.; CLARK, D. S.; KEASLING, J. D. Engineering hydrogen sulfide production and cadmium removal by expression of the thiosulfate reductase gene (phsABC) from Salmonella

enterica serovar typhimurium in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3939–3944, 2000.

BARKAY, T.; MILLER, S. M.; SUMMERS, A. O. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 355–384, 2003.

BEAUVAIS-FLÜCK, R.; SLAVEYKOVA, V. I.; COSIO, C. Cellular toxicity pathways of inorganic and methyl mercury in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

BENSON, D. A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; OSTELL, J.; PRUITT, K. D.; SAYERS, E. W. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D41–D47, 2018.

BHARTI, R.; GRIMM, D. G. Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 1, p. 178–193, 2021.

BHATTACHARYA, A.; NAIK, S. N.; KHARE, S. K. Harnessing the bio-mineralization ability of urease producing *Serratia marcescens* and *Enterobacter cloacae* EMB19 for remediation of heavy metal cadmium (II). **Journal of Environmental Management**, v. 215, p. 143–152, 2018.

BILAL, M.; RASHEED, T.; SOSA-HERNÁNDEZ, J. E.; RAZA, A.; NABEEL, F.; IQBAL, H. M. N. Biosorption: An Interplay between Marine Algae and Potentially Toxic Elements—A Review. **Marine Drugs**, v. 16, n. 2, p. 65, 2018.

BLENCOWE, D. K.; MORBY, A. P. Zn(II) metabolism in prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 291–311, 2003.

BLINDAUER, C. A. Bacterial metallothioneins: Past, present, and questions for the future. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 1011–1024, 2011.

BLINDAUER, C. A. Advances in the molecular understanding of biological zinc transport. **Chemical Communications**, v. 51, n. 22, p. 4544–4563, 2015.

BOGOMOLNAYA, L. M.; TILVAWALA, R.; ELFENBEIN, J. R.; CIRILLO, J. D.; ANDREWS-POLYMENIS, H. L. Linearized Siderophore Products Secreted via MacAB Efflux Pump Protect *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium from Oxidative Stress. **mBio**, v. 11, n. 3, 2020.

BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, 2019.

BONILLA, J. O.; KURTH, D. G.; CID, F. D.; ULACCO, J. H.; GIL, R. A.; VILLEGAS, L. B. Prokaryotic and eukaryotic community structure affected by the presence of an acid mine drainage from an abandoned gold mine. **Extremophiles**, v. 22, n. 5, p. 699–711, 2018.

BORREMANS, B.; HOBMAN, J. L.; PROVOOST, A.; BROWN, N. L.; VAN DER LELIE, D. Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 19, p. 5651–5658, 2001.

BOUGHANEMI, S.; INFOSSI, P.; GIUDICI-ORTICONI, M. T.; SCHOEPP-COTHENET, B.; GUIRAL, M. Sulfite oxidation by the quinone-reducing molybdenum sulfite dehydrogenase SoeABC from the bacterium *Aquifex aeolicus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** -

Bioenergetics, v. 1861, n. 11, p. 148279, 2020.

BRAUD, A.; GEOFFROY, V.; HOEGY, F.; MISLIN, G. L. A.; SCHALK, I. J. Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 3, p. 419–425, 2010.

BRAUD, A.; HOEGY, F.; JEZEQUEL, K.; LEBEAU, T.; SCHALK, I. J. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine–iron uptake pathway. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 1079–1091, 2009.

BRAVO, A. G.; COSIO, C.; AMOUROUX, D.; ZOPFI, J.; CHEVALLEY, P. A.; SPANGENBERG, J. E.; UNGUREANU, V. G.; DOMINIK, J. Extremely elevated methyl mercury levels in water, sediment and organisms in a Romanian reservoir affected by release of mercury from a chlor-alkali plant. **Water Research**, v. 49, p. 391–405, 2014.

BRIDOU, R.; MONPERRUS, M.; GONZALEZ, P. R.; GUYONEAUD, R.; AMOUROUX, D. Simultaneous determination of mercury methylation and demethylation capacities of various sulfate-reducing bacteria using species-specific isotopic tracers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 337–344, 2011.

BRINK, H. G.; HÖRSTMANN, C.; PEENS, J. Microbial Pb(II)-precipitation: the influence of oxygen on Pb(II)-removal from aqueous environment and the resulting precipitate identity. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 17, n. 1, p. 409–420, 2020.

BRUMFIELD, K. D.; HUQ, A.; COLWELL, R. R.; OLDS, J. L.; LEDDY, M. B. Microbial resolution of whole genome shotgun and 16S amplicon metagenomic sequencing using publicly available NEON data. **PLoS ONE**, v. 15, n. 2, p. 1–21, 2020.

BURNS, J. L.; DICHRISTINA, T. J. Anaerobic respiration of elemental sulfur and thiosulfate by *Shewanella oneidensis* MR-1 requires *psrA*, a homolog of the *phsA* gene of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 16, p. 5209–5217, 2009.

BWAPWA, J. K.; JAIYEOLA, A. T.; CHETTY, R. Bioremediation of acid mine drainage using algae strains: A review. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 24, p. 62–70, 2017.

CAIN, A.; VANNELA, R.; WOO, L. K. Cyanobacteria as a biosorbent for mercuric ion. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6578–6586, 2008.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN, A. W.; JOHNSON, A. J. A.; HOLMES, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

CAMPBELL, B. J.; GARY, S. C. Abundance of reverse tricarboxylic acid cycle genes in free-living microorganisms at deep-sea hydrothermal vents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 6282–6289, 2004.

CAMPBELL, D. R.; CHAPMAN, K. E.; WALDRON, K. J.; TOTTEY, S.; KENDALL, S.; CAVALLARO, G.; ANDREINI, C.; HINDS, J.; STOKER, N. G.; ROBINSON, N. J.; CAVET, J. S. Mycobacterial Cells Have Dual Nickel-Cobalt Sensors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 44, p. 32298–32310, 2007.

CANNON, G. C.; BAKER, S. H.; SOYER, F.; JOHNSON, D. R.; BRADBURNE, C. E.; MEHLMAN, J. L.; DAVIES, P. S.; JIANG, Q. L.; HEINHORST, S.; SHIVELY, J. M. Organization of Carboxysome Genes in the Thiobacilli. **Current Microbiology** 2003 46:2, v. 46, n. 2, p. 0115–0119, 2003.

CÁRDENAS, J. P.; VALDÉS, J.; QUATRINI, R.; DUARTE, F.; HOLMES, D. S. Lessons from the genomes of extremely acidophilic bacteria and archaea with special emphasis on bioleaching microorganisms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 88, n. 3, p. 605–620, 2010.

CARLIER, J. D.; ETTAMIMI, S.; COX, C. J.; HAMMANI, K.; GHAZAL, H.; COSTA, M. C. Prokaryotic diversity in stream sediments affected by acid mine drainage. **Extremophiles**, v. 24, n. 6, p. 809–819, 2020.

CASTRO-SILVA, M. A.; DE SOUZA LIMA, A. O.; GERCHENSKI, A. V.; JAQUES, D. B.; RODRIGUES, A. L.; DE SOUZA, P. L.; RÖRIG, L. R. Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. SUPPL. 1, p. 45–47, 2003.

CHAKRAVARTY, R.; BANERJEE, P. C. Morphological changes in an acidophilic bacterium induced by heavy metals. **Extremophiles**, v. 12, n. 2, p. 279–284, 2008.

CHAN, L. K.; MORGAN-KISS, R. M.; HANSON, T. E. Functional analysis of three sulfide:Quinone oxidoreductase homologs in *Chlorobaculum tepidum*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 3, p. 1026–1034, 2009.

CHANDRANGSU, P.; RENSING, C.; HELMANN, J. D. Metal homeostasis and resistance in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 338–350, 2017.

CHANG, J.; SHI, Y.; SI, G.; YANG, Q.; DONG, J.; CHEN, J. The bioremediation potentials and mercury(II)-resistant mechanisms of a novel fungus *Penicillium* spp. DC-F11 isolated from contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 396, p. 122638, 2020.

CHAREYRE, S.; MANDIN, P. Bacterial Iron Homeostasis Regulation by sRNAs. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 2, 2018.

CHATTERJEE, S.; KUMARI, S.; RATH, S.; PRIYADARSHANEE, M.; DAS, S. Diversity, structure and regulation of microbial metallothionein: metal resistance and possible applications in sequestration of toxic metals. **Metallomics**, v. 12, n. 11, p. 1637–1655, 2020.

CHEN, D.; FENG, Q.; LI, W.; SONG, Y.; ZHAO, C. Effects of acid drainage from abandoned coal mines on the microbial community of Shandi River sediment, Shanxi Province. **International Journal of Coal Science and Technology**, v. 8, n. 4, p. 756–766, 2021.

CHEUNG, K. H.; GU, J. D. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, n. 1, p. 8–15, 2007.

CHOE, S. I.; GRAVELAT, F. N.; ABDALLAH, Q. Al; LEE, M. J.; GIBBS, B. F.; SHEPPARD, D. C. Role of *Aspergillus niger* acra in arsenic resistance and its use as the basis for an arsenic biosensor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 11, p. 3855–3863, 2012.

CHOI, S. C.; CHASE, T.; BARTHA, R. Metabolic Pathways Leading to Mercury Methylation

in *Desulfovibrio desulfuricans* LS. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 4072, 1994.

CHOUDHARY, M.; KUMAR, R.; DATTA, A.; NEHRA, V.; GARG, N. Bioremediation of Heavy Metals by Microbes. In: **Bioremediation of Salt Affected Soils: An Indian Perspective**. [s.l.: s.n.]. p. 233–255.

CHOUDHURY, B. U.; MALANG, A.; WEBSTER, R.; MOHAPATRA, K. P.; VERMA, B. C.; KUMAR, M.; DAS, A.; ISLAM, M.; HAZARIKA, S. Acid drainage from coal mining: Effect on paddy soil and productivity of rice. **Science of the Total Environment**, v. 583, n. August 2018, p. 344–351, 2017.

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D. M.; SUN, Y.; BROWN, C. T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic acids research**, v. 42, v. 2013/11/27, n. Database issue, p. D633–D642, 2014.

COOPER, A. J. L. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, n. 1, p. 187–222, 1983.

CRAW, D.; RUFAUT, C. Geochemical and mineralogical controls on mine tailings rehabilitation and vegetation, Otago Schist, New Zealand. **New Zealand Journal of Geology and Geophysics**, v. 60, n. 3, p. 176–187, 2017.

CUÉLLAR-CRUZ, M.; LUCIO-HERNÁNDEZ, D.; MARTÍNEZ-ÁNGELES, I.; DEMITRI, N.; POLENTARUTTI, M.; ROSALES-HOZ, M. J.; MORENO, A. Biosynthesis of micro- and nanocrystals of Pb (II), Hg (II) and Cd (II) sulfides in four *Candida* species: a comparative study of in vivo and in vitro approaches. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 405–424, 2017.

CULLEN, W. R. Chemical mechanism of arsenic biomethylation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 4, p. 457–461, 2014.

CUPPETT, J. D.; DUNCAN, S. E.; DIETRICH, A. M. Evaluation of Copper Speciation and Water Quality Factors That Affect Aqueous Copper Tasting Response. **Chemical Senses**, v. 31, n. 7, p. 689–697, 2006.

DANTAS, J. M.; BRAUSEMANN, A.; EINSLE, O.; SALGUEIRO, C. A. NMR studies of the interaction between inner membrane-associated and periplasmic cytochromes from *Geobacter sulfurreducens*. **FEBS Letters**, v. 591, n. 12, p. 1657–1666, 2017.

DAS, A.; MISHRA, A. K.; ROY, P. Anaerobic growth on elemental sulfur using dissimilar iron reduction by autotrophic *Thiobacillus ferrooxidans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 97, n. 1–2, p. 167–172, 1992.

DAS, B. K.; ROY, A.; KOSCHORRECK, M.; MANDAL, S. M.; WENDT-POTTHOFF, K.; BHATTACHARYA, J. Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization. **Water Research**, v. 43, n. 4, p. 883–894, 2009.

DAS, S.; MISHRA, J.; DAS, S. K.; PANDEY, S.; RAO, D. S.; CHAKRABORTY, A.; SUDARSHAN, M.; DAS, N.; THATOI, H. Investigation on mechanism of Cr(VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil. **Chemosphere**, v. 96, p. 112–121, 2014.

DASH, H. R.; DAS, S. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 75, p. 207–213, 2012.

DAVIDSON, A. L.; DASSA, E.; ORELLE, C.; CHEN, J. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 2, p. 317–364, 2008.

DEICKE, M.; MOHR, J. F.; ROY, S.; HERZSPRUNG, P.; BELLENGER, J. P.; WICHARD, T. Metallophore profiling of nitrogen-fixing: *Frankia* spp. to understand metal management in the rhizosphere of actinorhizal plants. **Metallomics**, v. 11, n. 4, p. 810–821, 2019.

DEPLANCKE, B.; HRISTOVA, K. R.; OAKLEY, H. A.; MCCRACKEN, V. J.; AMINOV, R.; MACKIE, R. I.; GASKLNS, H. R. Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2166–2174, 2000.

DEPPENMEIER, U.; MÜLLER, V. Life close to the thermodynamic limit: How methanogenic archaea conserve energy. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 45, p. 123–152, 2008.

DESANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E. L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSEN, G. L. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069–5072, 2006.

DEVARS, S.; AVILÉS, C.; CERVANTES, C.; MORENO-SÁNCHEZ, R. Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. **Archives of Microbiology**, v. 174, n. 3, p. 175–180, 2000.

DHAL, B.; THATOI, H.; DAS, N.; PANDEY, B. D. Reduction of hexavalent chromium by *Bacillus* sp. isolated from chromite mine soils and characterization of reduced product. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 11, p. 1471–1479, 2010.

DOBRINSKI, K. P.; LONGO, D. L.; SCOTT, K. M. The carbon-concentrating mechanism of the hydrothermal vent chemolithoautotroph *Thiomicrospira crunogena*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 16, p. 5761–5766, 2005.

DOLD, B. Evolution of Acid Mine Drainage Formation in Sulphidic Mine Tailings. **Minerals**, v. 4, n. 3, p. 621–641, 2014.

DONG, L.; TONG, X.; LI, X.; ZHOU, J.; WANG, S.; LIU, B. Some developments and new insights of environmental problems and deep mining strategy for cleaner production in mines. **Journal of Cleaner Production**, v. 210, p. 1562–1578, 2019.

DOUGLAS, G. M.; MAFFEI, V. J.; ZANEVELD, J. R.; YURGEL, S. N.; BROWN, J. R.; TAYLOR, C. M.; HUTTENHOWER, C.; LANGILLE, M. G. I.; BIOTECHNOL, N. PICRUST2 for prediction of metagenome functions HHS Public Access Author manuscript. **Nature Biotechnology**, v. 38, p. 669–688, 2020.

DUZS, Á.; TÓTH, A.; NÉMETH, B.; BALOGH, T.; KÓS, P. B.; RÁKHELY, G. A novel enzyme of type VI sulfide:quinone oxidoreductases in purple sulfur photosynthetic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 12, p. 5133–5147, 2018.

EGLI, D.; DOMÈNECH, J.; SELVARAJ, A.; BALAMURUGAN, K.; HUA, H.; CAPDEVILA, M.; GEORGIEV, O.; SCHAFFNER, W.; ATRIAN, S. The four members of the

Drosophila metallothionein family exhibit distinct yet overlapping roles in heavy metal homeostasis and detoxification. **Genes to Cells**, v. 11, n. 6, p. 647–658, 2006.

EHLERT, K.; MIKUTTA, C.; KRETZSCHMAR, R. Effects of manganese oxide on arsenic reduction and leaching from contaminated floodplain soil. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 17, p. 9251–9261, 2016.

EL-SHANSHOURY, A. E. R. R.; ELSILK, S. E.; ATEYA, P. S.; EBEID, E. M. Synthesis of lead nanoparticles by *Enterobacter* sp. and avirulent *Bacillus anthracis* PS2010. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1803–1810, 2012.

EL-SHEIKH, A. H.; SHUDAYFAT, A. M.; FASFOUS, I. I. Preparation of magnetic biosorbents based on cypress wood that was pretreated by heating or TiO₂ deposition. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 105–113, 2019.

EMERSON, D.; FLEMING, E. J.; MCBETH, J. M. Iron-oxidizing bacteria: An environmental and genomic perspective. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, p. 561–583, 2010.

ETTAMIMI, S.; CARLIER, J. D.; COX, C. J.; ELAMINE, Y.; HAMMANI, K.; GHAZAL, H.; COSTA, M. C. A meta-taxonomic investigation of the prokaryotic diversity of water bodies impacted by acid mine drainage from the São Domingos mine in southern Portugal. **Extremophiles**, v. 23, n. 6, p. 821–834, 2019.

FASHOLA, M. O.; NGOLE-JEME, V. M.; BABALOLA, O. O. Heavy Metal Pollution from Gold Mines: Environmental Effects and Bacterial Strategies for Resistance. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 11, p. 1047, 2016.

FATHOLLAHI, A.; KHASTEGANAN, N.; COUPE, S. J.; NEWMAN, A. P. A meta-analysis of metal biosorption by suspended bacteria from three phyla. **Chemosphere**, v. 268, p. 129290, 2021.

FEKIH, I. Ben; ZHANG, C.; LI, Y. P.; ZHAO, Y.; ALWATHNANI, H. A.; SAQUIB, Q.; RENSING, C.; CERVANTES, C. Distribution of arsenic resistance genes in prokaryotes. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, p. 2473, 2018.

FIKE, D. A.; BRADLEY, A. S.; ROSE, C. V. Rethinking the Ancient Sulfur Cycle. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 43, p. 593–622, 2015.

FILLAT, M. F. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 546, p. 41–52, 2014.

FINSTER, K. W.; KJELDSEN, K. U.; KUBE, M.; REINHARDT, R.; MUSSMANN, M.; AMANN, R.; SCHREIBER, L. Complete genome sequence of *Desulfocapsa sulfexigens*, a marine deltaproteobacterium specialized in disproportionating inorganic sulfur compounds. **Standards in Genomic Sciences** 2013 8:1, v. 8, n. 1, p. 58, 2013.

FISCHEL, M. H. H.; FISCHEL, J. S.; LAFFERTY, B. J.; SPARKS, D. L. The influence of environmental conditions on kinetics of arsenite oxidation by manganese-oxides. **Geochemical Transactions**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2015.

FITRIYANTO, N. A.; NAKAMURA, M.; MUTO, S.; KATO, K.; YABE, T.; IWAMA, T.; KAWAI, K.; PERTIWININGRUM, A. Ce³⁺-induced exopolysaccharide production by *Bradyrhizobium* sp. MAFF211645. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 2, p. 146–152, 2011.

FLOUTY, R.; ESTEPHANE, G. Bioaccumulation and biosorption of copper and lead by a unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* in single and binary metal systems: A comparative study. **Journal of Environmental Management**, v. 111, p. 106–114, 2012.

FOMINA, M.; HILLIER, S.; CHARNOCK, J. M.; MELVILLE, K.; ALEXANDER, I. J.; GADD, G. M. Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 371–381, 2005.

FRANK, E. D.; ELGOWAINY, A.; HAN, J.; WANG, Z. Life cycle comparison of hydrothermal liquefaction and lipid extraction pathways to renewable diesel from algae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, n. 1, p. 137–158, 2013.

FRANKS, D. M.; BOGER, D. V.; CÔTE, C. M.; MULLIGAN, D. R. Sustainable development principles for the disposal of mining and mineral processing wastes. **Resources Policy**, v. 36, n. 2, p. 114–122, 2011.

FREEDMAN, Z.; ZHU, C.; BARKAY, T. Mercury resistance and mercuric reductase activities and expression among chemotrophic thermophilic aquificae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6568–6575, 2012.

FREITAS, A. P. P.; SCHNEIDER, I. A. H.; SCHWARTZBOLD, A. Biosorption of heavy metals by algal communities in water streams affected by the acid mine drainage in the coal-mining region of Santa Catarina state, Brazil. **Minerals Engineering**, v. 24, n. 11, p. 1215–1218, 2011.

FRIEDRICH, C. G.; BARDISCHEWSKY, F.; ROTHER, D.; QUENTMEIER, A.; FISCHER, J. Prokaryotic sulfur oxidation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 253–259, 2005.

FRIEDRICH, C. G.; DAGMAR, R.; FRANK, B.; ARMIN, Q.; JÖRG, F.; FRIEDRICH, C. G.; ROTHER, D.; BARDISCHEWSKY, F.; QUENTMEIER, A.; FISCHER, J. Oxidation of Reduced Inorganic Sulfur Compounds by Bacteria: Emergence of a Common Mechanism? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2873–2882, 2001.

GAONKAR, T.; BHOSLE, S. Effect of metals on a siderophore producing bacterial isolate and its implications on microbial assisted bioremediation of metal contaminated soils. **Chemosphere**, v. 93, n. 9, p. 1835–1843, 2013.

GARBINSKI, L. D.; ROSEN, B. P.; CHEN, J. Pathways of arsenic uptake and efflux. **Environment International**, v. 126, p. 585–597, 2019.

GEORGE, S. E.; WAN, Y. Advances in characterizing microbial community change and resistance upon exposure to lead contamination: Implications for ecological risk assessment. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 21, p. 2223–2270, 2020.

GERWIEN, F.; SKRAHINA, V.; KASPER, L.; HUBE, B.; BRUNKE, S. Metals in fungal virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 1, p. 1–21, 2018.

GIDDINGS, L. A.; CHLIPALA, G.; KUNSTMAN, K.; GREEN, S.; MORILLO, K.; BHAVE, K.; PETERSON, H.; DRISCOLL, H.; MAIENSCHNIG, M. Characterization of an acid rock drainage microbiome and transcriptome at the Ely Copper Mine Superfund site. **PLoS ONE**, v. 15, n. 8 August, p. 1–25, 2020.

GILBERT, J. A.; FIELD, D.; HUANG, Y.; EDWARDS, R.; LI, W.; GILNA, P.; JOINT, I. Detection of Large Numbers of Novel Sequences in the Metatranscriptomes of Complex Marine Microbial Communities. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, p. e3042, 2008.

GOLTSMAN, D. S. A.; DENEFF, V. J.; SINGER, S. W.; VERBERKMOES, N. C.; LEFSRUD, M.; MUELLER, R. S.; DICK, G. J.; SUN, C. L.; WHEELER, K. E.; ZEMLA, A.; BAKER, B. J.; HAUSER, L.; LAND, M.; SHAH, M. B.; THELEN, M. P.; HETTICH, R. L.; BANFIELD, J. F. Community genomic and proteomic analyses of chemoautotrophic iron-oxidizing “*Leptospirillum rubarum*” (Group II) and “*Leptospirillum ferrodiazotrophum*” (Group III) bacteria in acid mine drainage biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 13, p. 4599–4615, 2009.

GÓMEZ-VILLEGAS, P.; GUERRERO, J. L.; PÉREZ-RODRIGUEZ, M.; BOLÍVAR, J. P.; MORILLO, A.; VIGARA, J.; LÉON, R. Exploring the microbial community inhabiting the phosphogypsum stacks of Huelva (SW SPAIN) by a high throughput 16S/18S rDNA sequencing approach. **Aquatic Toxicology**, v. 245, p. 106103, 2022.

GONZÁLEZ-TORIL, E.; ÁGUILERA, Á.; SOUZA-EGIPSY, V.; PAMO, E. L.; ESPAÑA, J. S.; AMILS, R. Geomicrobiology of La Zarza-Perrunal acid mine effluent (Iberian Pyritic Belt, Spain). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 8, p. 2685–2694, 2011.

GORDON, E. H. J.; PIKE, A. D.; HILL, A. E.; CUTHBERTSON, P. M.; CHAPMAN, S. K.; REID, G. A. Identification and characterization of a novel cytochrome c3 from *Shewanella frigidimarina* that is involved in Fe(III) respiration. **Biochemical Journal**, v. 349, n. 1, p. 153–158, 2000.

GOVARTHANAN, M.; PARK, S. H.; PARK, Y. J.; MYUNG, H.; KRISHNAMURTHY, R. R.; LEE, S. H.; LOVANH, N.; KAMALA-KANNAN, S.; OH, B. T. Lead biotransformation potential of allochthonous *Bacillus* sp. SKK11 with sesame oil cake extract in mine soil. **RSC Advances**, v. 5, n. 67, p. 54564–54570, 2015.

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

GRÉGOIRE, D. S.; POULAIN, A. J. A physiological role for HgII during phototrophic growth. **Nature Geoscience**, v. 9, n. 2, p. 121–125, 2016.

GRIMM, F.; FRANZ, B.; DAHL, C. Regulation of dissimilatory sulfur oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. MAR, p. 51, 2011.

GROENENDIJK, D.; LÜCKER, S. M. G.; PLANS, M.; KRAAK, M. H. S.; ADMIRAAL, W. Dynamics of metal adaptation in riverine chironomids. **Environmental Pollution**, v. 117, n. 1, p. 101–109, 2002.

GUPTA, A.; SAHA, A.; SAR, P. Thermoplasmata and Nitrososphaeria as dominant archaeal members in acid mine drainage sediment of Malanjkhanda Copper Project, India. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 4, p. 1833–1841, 2021.

GUPTA, P.; DIWAN, B. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. **Biotechnology Reports**, v. 13, 2017.

HAAS, H. Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. **Natural**

Product Reports, v. 31, n. 10, p. 1266–1276, 2014.

HAESE, R. R. The Biogeochemistry of Iron. **Marine Geochemistry**, p. 241–270, 2006.

HALL, J. D.; FUCIKOVA, K.; LO, C.; LEWIS, L. A.; KAROL, K. G. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. **Cryptogamie, Algologie**, v. 31, n. 4, p. 529–555, 2010.

HALLBERG, K. B. New perspectives in acid mine drainage microbiology. **Hydrometallurgy**, v. 104, n. 3–4, p. 448–453, 2010.

HANNAUER, M.; BRAUD, A.; HOEGY, F.; RONOT, P.; BOOS, A.; SCHALK, I. J. The PvdRT-OpmQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 1696–1708, 2012.

HARPKE, M.; PIETSCHMANN, S.; UEBERSCHAAR, N.; KRÜGER, T.; KNIEMEYER, O.; BRAKHAGE, A. A.; NIETZSCHE, S.; KOTHE, E. Salt and Metal Tolerance Involves Formation of Guttation Droplets in Species of the *Aspergillus versicolor* Complex. **Genes**, v. 13, n. 9, p. 1631, 2022.

HE, Z.; XIAO, S.; XIE, X.; ZHONG, H.; HU, Y.; LI, Q.; GAO, F.; LI, G.; LIU, J.; QIU, G. Molecular diversity of microbial community in acid mine drainages of Yunfu sulfide mine. **Extremophiles**, v. 11, n. 2, p. 305–314, 2007.

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

HERNÁNDEZ-ELIGIO, A.; PAT-ESPADAS, A. M.; VEGA-ALVARADO, L.; HUERTA-AMPARÁN, M.; CERVANTES, F. J.; JUÁREZ, K. Global transcriptional analysis of *Geobacter sulfurreducens* under palladium reducing conditions reveals new key cytochromes involved. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 9, p. 4059–4069, 2020.

HERNLEM, B. J.; VANE, L. M.; SAYLES, G. D. The application of siderophores for metal recovery and waste remediation: examination of correlations for prediction of metal affinities. **Water Research**, v. 33, n. 4, p. 951–960, 1999.

HERSCHY, R. W. **Water quality for drinking: WHO guidelines**. [s.l.] : World Health Organization, 2012.

HESSE, E.; O'BRIEN, S.; TROMAS, N.; BAYER, F.; LUJÁN, A. M.; VAN VEEN, E. M.; HODGSON, D. J.; BUCKLING, A. Ecological selection of siderophore-producing microbial taxa in response to heavy metal contamination. **Ecology Letters**, v. 21, n. 1, p. 117–127, 2018.

HOEFT, S. E.; BLUM, J. S.; STOLZ, J. F.; TABITA, F. R.; WITTE, B.; KING, G. M.; SANTINI, J. M.; OREMLAND, R. S. *Alkalilimnicola ehrlichii* sp. nov., a novel, arsenite-oxidizing haloalkaliphilic gammaproteobacterium capable of chemoautotrophic or heterotrophic growth with nitrate or oxygen as the electron acceptor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 504–512, 2007.

HOSSAIN, N.; MAHLIA, T. M. I.; SAIDUR, R. Latest development in microalgae-biofuel production with nano-additives. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2019.

HSIAO, J. C.; MCGRATH, A. P.; KIELMANN, L.; KALIMUTHU, P.; DARAIN, F.;

BERNHARDT, P. V.; HARMER, J.; LEE, M.; MEYERS, K.; MAHER, M. J.; KAPPLER, U. The central active site arginine in sulfite oxidizing enzymes alters kinetic properties by controlling electron transfer and redox interactions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1859, n. 1, p. 19–27, 2018.

HUA, Z. S.; HAN, Y. J.; CHEN, L. X.; LIU, J.; HU, M.; LI, S. J.; KUANG, J. L.; CHAIN, P. S.; HUANG, L. N.; SHU, W. S. Ecological roles of dominant and rare prokaryotes in acid mine drainage revealed by metagenomics and metatranscriptomics. **The ISME Journal**, v. 9, n. 6, p. 1280–1294, 2014.

HUANG, C. C.; NARITA, M.; YAMAGATA, T.; ITOH, Y.; ENDO, G. Structure analysis of a class II transposon encoding the mercury resistance of the Gram-positive bacterium *Bacillus megaterium* MB1, a strain isolated from Minamata Bay, Japan. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 361–369, 1999.

HUANG, J. H. Impact of microorganisms on arsenic biogeochemistry: A review. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 225, n. 2, p. 1–25, 2014.

HUBER, R.; SACHER, M.; VOLLMANN, A.; HUBER, H.; ROSE, D. Respiration of Arsenate and Selenate by Hyperthermophilic Archaea. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 305–314, 2000.

HUDSON-EDWARDS, K. A.; JAMIESON, H. E.; LOTTERMOSER, B. G. Mine Wastes: Past, Present, Future. **Elements**, v. 7, n. 6, p. 375–380, 2011.

HUGHES, T. A.; GRAY, N. F. Remoción de acidez y de metales de drenajes ácidos de minas usando aguas residuales municipales y barros activados. **Mine Water and the Environment**, v. 32, n. 3, p. 170–184, 2013.

HÜGLER, M.; SIEVERT, S. M. Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. **Annual review of marine science**, v. 3, p. 261–289, 2011.

HYNNINEN, A.; TOUZÉ, T.; PITKÄNEN, L.; MENGIN-LECREULX, D.; VIRTA, M. An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 384–394, 2009.

ILBERT, M.; BONNEFOY, V. Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1827, n. 2, p. 161–175, 2013.

ILYAS, S.; CHI, R.; LEE, J. Fungal Bioleaching of Metals From Mine Tailing. **Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review**, v. 34, n. 3, p. 185–194, 2013.

ITOH, T.; YOSHIKAWA, N.; TAKASHINA, T. *Thermogymnomonas acidicola* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic, cell wall-less archaeon in order Thermoplasmatales, isolated from a solfataric soil in Hakone, Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 2557–2561, 2007.

JENNER, L. P.; KURTH, J. M.; HELMONT, S. Van; SOKOL, K. P.; REISNER, E.; DAHL, C.; BRADLEY, J. M.; BUTT, J. N.; CHEESMAN, M. R. Heme ligation and redox chemistry in two bacterial thiosulfate dehydrogenase (TsdA) enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 47, p. 18002–18014, 2019.

JIANG, Q. Q.; BAKKEN, L. R. Comparison of *Nitrosospira* strains isolated from terrestrial environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, n. 2, p. 171–186, 1999.

JIANG, Z.; SUN, Y.; GUAN, H.; SUN, D.; FANG, S.; MA, X.; WANG, Z.; LI, Z.; ZHANG, C.; GE, Y. Contributions of polysaccharides to arsenate resistance in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 229, p. 113091, 2022.

JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B.; HEDRICH, S. Uncovering a Microbial Enigma: Isolation and Characterization of the Streamer-Generating, Iron-Oxidizing, Acidophilic Bacterium “*Ferrovum myxofaciens*”. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 672–680, 2014.

JOHNSTONE, T. C.; NOLAN, E. M. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 14, p. 6320–6339, 2015.

JOHO, M.; INOUE, M.; TOHOYAMA, H.; MURAYAMA, T. Nickel resistance mechanisms in yeasts and other fungi. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 164–168, 1995.

KANG, C. H.; OH, S. J.; SHIN, Y. J.; HAN, S. H.; NAM, I. H.; SO, J. S. Bioremediation of lead by ureolytic bacteria isolated from soil at abandoned metal mines in South Korea. **Ecological Engineering**, v. 74, p. 402–407, 2015.

KAPPLER, U. Bacterial sulfite-oxidizing enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1807, n. 1, p. 1–10, 2011.

KAWANO, Y.; ONISHI, F.; SHIROYAMA, M.; MIURA, M.; TANAKA, N.; OSHIRO, S.; NONAKA, G.; NAKANISHI, T.; OHTSU, I. Improved fermentative l-cysteine overproduction by enhancing a newly identified thiosulfate assimilation pathway in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 18, p. 6879–6889, 2017.

KERN, M.; KLOTZ, M. G.; SIMON, J. The *Wolinella succinogenes* mcc gene cluster encodes an unconventional respiratory sulphite reduction system. **Molecular Microbiology**, v. 82, n. 6, p. 1515–1530, 2011.

KERPER, L. E.; HINKLE, P. M. Cellular Uptake of Lead Is Activated by Depletion of Intracellular Calcium Stores. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 13, p. 8346–8352, 1997.

KERTESZ, M. A. Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 3–4, p. 279–290, 2001.

KHAN, Z.; REHMAN, A.; HUSSAIN, S. Z.; NISAR, M. A.; ZULFIQAR, S.; SHAKOORI, A. R. Cadmium resistance and uptake by bacterium, *Salmonella enterica* 43C, isolated from industrial effluent. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 1–16, 2016.

KIMBROUGH, D. E.; COHEN, Y.; WINER, A. M.; CREELMAN, L.; MABUNI, C. A Critical Assessment of Chromium in the Environment. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 1–46, 1999.

KISKOVÁ, J.; PERHÁČOVÁ, Z.; VLČKO, L.; SEDLÁKOVÁ, J.; KVASNOVÁ, S.; PRISTAŠ, P. The Bacterial Population of Neutral Mine Drainage Water of Elizabeth’s Shaft (Slovinky, Slovakia). **Current Microbiology**, v. 75, n. 8, p. 988–996, 2018.

KOCH, T.; DAHL, C. A novel bacterial sulfur oxidation pathway provides a new link between the cycles of organic and inorganic sulfur compounds. **The ISME Journal** 2018 12:10, v. 12, n. 10, p. 2479–2491, 2018.

KONHAUSER. **Diversity-of-bacterial-iron-mineralization_1998_Earth-Science-Reviews.pdf**, 1998.

KONHAUSER, K. **Introduction to Geomicrobiology**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2007.

KREWULAK, K. D.; VOGEL, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1778, n. 9, p. 1781–1804, 2008.

KUANG, J.-L.; HUANG, L.-N.; CHEN, L.-X.; HUA, Z.-S.; LI, S.-J.; HU, M.; LI, J.-T.; SHU, W.-S. Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage. **The ISME Journal**, v. 7, n. 5, p. 1038–1050, 2013.

KÜGLER, S.; COOPER, R. E.; BOESSNECK, J.; KÜSEL, K.; WICHARD, T. Rhizobactin B is the preferred siderophore by a novel *Pseudomonas* isolate to obtain iron from dissolved organic matter in peatlands. **BioMetals**, v. 33, n. 6, p. 415–433, 2020.

KUMAR, M. A.; ANANDAPANDIAN, K. T. K.; PARTHIBAN, K. Production and characterization of exopolysaccharides (EPS) from biofilm forming marine bacterium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 259–265, 2011.

KURTH, C.; KAGE, H.; NETT, M. Siderophores as molecular tools in medical and environmental applications. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 14, n. 35, p. 8212–8227, 2016.

LAFFERTY, B. J.; LOEPPERT, R. H. Methyl arsenic adsorption and desorption behavior on iron oxides. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 7, p. 2120–2127, 2005.

LARA, E.; MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P. The Environmental Clade LKM11 and *Rozella* Form the Deepest Branching Clade of Fungi. **Protist**, v. 161, n. 1, p. 116–121, 2010.

LARSON, L. N.; SÁNCHEZ-ESPAÑA, J.; KALEY, B.; SHENG, Y.; BIBBY, K.; BURGOS, W. D. Thermodynamic controls on the kinetics of microbial low-pH Fe(II) oxidation. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 16, p. 9246–9254, 2014.

LATTUADA, R. M.; MENEZES, C. T. B.; PAVEI, P. T.; PERALBA, M. C. R.; DOS SANTOS, J. H. Z. Determination of metals by total reflection X-ray fluorescence and evaluation of toxicity of a river impacted by coal mining in the south of Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, n. 2–3, p. 531–537, 2009.

LE PAPE, P.; BATTAGLIA-BRUNET, F.; PARMENTIER, M.; JOULIAN, C.; GASSAUD, C.; FERNANDEZ-ROJO, L.; GUIGNER, J. M.; IKOGOU, M.; STETTEN, L.; OLIVI, L.; CASIOT, C.; MORIN, G. Complete removal of arsenic and zinc from a heavily contaminated acid mine drainage via an indigenous SRB consortium. **Journal of Hazardous Materials**, v. 321, p. 764–772, 2017.

LEGATZKI, A.; GRASS, G.; ANTON, A.; RENSING, C.; NIES, D. H. Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 15, p. 4354–4361, 2003.

LELLO, P. Di; LAFRANCE-VANASSE, J.; OMICHINSKI, J. G. The Organomercurial Lyase MerB. **Handbook of Metalloproteins**, 2010.

LETT, M. C.; MULLER, D.; LIÈVREMONT, D.; SILVER, S.; SANTINI, J. Unified

Nomenclature for Genes Involved in Prokaryotic Aerobic Arsenite Oxidation. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 2, p. 207–208, 2011.

LEVICÁN, G.; UGALDE, J. A.; EHRENFELD, N.; MAASS, A.; PARADA, P. Comparative genomic analysis of carbon and nitrogen assimilation mechanisms in three indigenous bioleaching bacteria: predictions and validations. **BMC Genomics**, v. 9, p. 581, 2008.

LI, J.; WANG, C.; LIANG, W.; LIU, S. Rhizosphere Microbiome: The Emerging Barrier in Plant-Pathogen Interactions. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 772420, 2021. a.

LI, L.; LIU, Z.; ZHANG, M.; MENG, D.; LIU, X.; WANG, P.; LI, X.; JIANG, Z.; ZHONG, S.; JIANG, C.; YIN, H. Insights into the Metabolism and Evolution of the Genus *Acidiphilium*, a Typical Acidophile in Acid Mine Drainage. **mSystems**, v. 5, n. 6, 2020.

LI, L.; ZENG, X.; WILLIAMS, P. N.; GAO, X.; ZHANG, L.; ZHANG, J.; SHAN, H.; SU, S. Arsenic resistance in fungi conferred by extracellular bonding and vacuole-septa compartmentalization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 401, p. 123370, 2021. b.

LI, Y.; ZAMBLE, D. B. Nickel Homeostasis and Nickel Regulation: An Overview. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 10, p. 4617–4643, 2009.

LIAMLEAM, W.; ANNACHHATRE, A. P. Electron donors for biological sulfate reduction. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 5, p. 452–463, 2007.

LIANG, X.; CSETENYI, L.; GADD, G. M. Lead Bioprecipitation by Yeasts Utilizing Organic Phosphorus Substrates. **Geomicrobiology Journal**, v. 33, n. 3–4, p. 294–307, 2016.

LIANG, X.; KIERANS, M.; CECI, A.; HILLIER, S.; GADD, G. M. Phosphatase-mediated bioprecipitation of lead by soil fungi. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 219–231, 2016.

LIES, D. P.; HERNANDEZ, M. E.; KAPPLER, A.; MIELKE, R. E.; GRALNICK, J. A.; NEWMAN, D. K. *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4414–4426, 2005.

LIN, Y. F.; WALMSLEY, A. R.; ROSEN, B. P. An arsenic metallochaperone for an arsenic detoxification pump. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 42, p. 15617–15622, 2006.

LINDBERG, S. E.; BROOKS, S.; LIN, C. J.; SCOTT, K. J.; LANDIS, M. S.; STEVENS, R. K.; GOODSITE, M.; RICHTER, A. Dynamic Oxidation of Gaseous Mercury in the Arctic Troposphere at Polar Sunrise. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 6, p. 1245–1256, 2002.

LIU, C.; CUI, Y.; LI, X.; YAO, M. microeco: an R package for data mining in microbial community ecology. **FEMS microbiology ecology**, v. 97, n. 2, 2021. a.

LIU, D.; WANG, Y.; WANG, X.; OU, D.; LING, N.; ZHANG, J.; WU, Q.; YE, Y. Role of the multiple efflux pump protein TolC on growth, morphology, and biofilm formation under nitric oxide stress in *Cronobacter malonaticus*. **JDS Communications**, v. 2, n. 3, p. 98–103, 2021. b.

LIU, T.; NAKASHIMA, S.; HIROSE, K.; UEMURA, Y.; SHIBASAKA, M.; KATSUHARA, M.; KASAMO, K. A metallothionein and CPx-ATPase handle heavy-metal tolerance in the

filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. **FEBS Letters**, v. 542, n. 1–3, p. 159–163, 2003.

LIU, Y.; BEER, L. L.; WHITMAN, W. B. Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 2632–2644, 2012.

LIU, Y.; FREDRICKSON, J. K.; ZACHARA, J. M.; SHI, L. Direct involvement of ombB, omaB, and omcB genes in extracellular reduction of Fe(III) by *Geobacter sulfurreducens* PCA. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. OCT, 2015.

LIU, Y.; WHITMAN, W. B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, p. 171–189, 2008.

LOAYZA-MURO, R. A.; DE BAAT, M. L.; PALOMINO, E. J.; KUPERUS, P.; KRAAK, M. H. S.; ADMIRAAL, W.; BREEUWER, J. A. J. Metals and altitude drive genetic diversity of chironomids in Andean streams. **Freshwater Biology**, v. 59, n. 1, p. 56–63, 2014.

LOAYZA-MURO, R. A.; MARTICORENA-RUIZ, J. K.; PALOMINO, E. J.; MERRITT, C.; DE BAAT, M. L.; GEMERT, M. Van; VERWEIJ, R. A.; KRAAK, M. H. S.; ADMIRAAL, W. Persistence of chironomids in metal polluted andean high altitude streams: Does melanin play a role? **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 601–607, 2013.

LÓPEZ-ARCHILLA, A. I.; MARIN, I.; AMILS, R. Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: The Tinto River, Spain. **Microbial Ecology**, v. 41, n. 1, p. 20–35, 2001.

LOREDO, J.; PEREIRA, A.; ORDÓÑEZ, A. Untreated abandoned mercury mining works in a scenic area of Asturias (Spain). **Environment International**, v. 29, n. 4, p. 481–491, 2003.

LOVLEY, D. Dissimilatory Fe(III)- and Mn(IV)-Reducing Prokaryotes. **The Prokaryotes**, p. 635–658, 2006.

LOVLEY, D. R.; HOLMES, D. E.; NEVIN, K. P. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. **Advances in Microbial Physiology**, v. 49, p. 219–286, 2004.

LOVLEY, D. R.; STOLZ, J. F.; NORD, G. L.; PHILLIPS, E. J. P. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. **Nature**, v. 330, n. 6145, p. 252–254, 1987.

LU, X.; LIU, Y.; JOHS, A.; ZHAO, L.; WANG, T.; YANG, Z.; LIN, H.; ELIAS, D. A.; PIERCE, E. M.; LIANG, L.; BARKAY, T.; GU, B. Anaerobic Mercury Methylation and Demethylation by *Geobacter bemidjiensis* Bem. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 8, p. 4366–4373, 2016.

LU, Z. H.; COBINE, P.; DAMERON, C. T.; SOLIOZ, M. How cells handle copper: A view from microbes. **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, v. 12, n. 4, p. 347–360, 1999.

LUÍS, A. T.; CÓRDOBA, F.; ANTUNES, C.; LOAYZA-MURO, R.; GRANDE, J. A.; SILVA, B.; DIAZ-CURIEL, J.; DA SILVA, E. F. Extremely Acidic Eukaryotic (Micro) Organisms: Life in Acid Mine Drainage Polluted Environments—Mini-Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2022, Vol. 19, Page 376, v. 19, n. 1, p. 376, 2021.

- LUKHELE, T.; SELVARAJAN, R.; NYONI, H.; MAMBA, B. B.; MSAGATI, T. A. M. Diversity and functional profile of bacterial communities at Lancaster acid mine drainage dam, South Africa as revealed by 16S rRNA gene high-throughput sequencing analysis. **Extremophiles**, v. 23, n. 6, p. 719–734, 2019.
- LUO, J. F.; LIN, W. T.; GUO, Y. Functional genes based analysis of sulfur-oxidizing bacteria community in sulfide removing bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 2, p. 769–778, 2011.
- MA, K.; WEISS, R.; ADAMS, M. W. W. Characterization of hydrogenase II from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and assessment of its role in sulfur reduction. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 7, p. 1864–1871, 2000.
- MA, M.; DU, H.; WANG, D. Mercury methylation by anaerobic microorganisms: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 20, p. 1893–1936, 2019.
- MA, Z.; JACOBSEN, F. E.; GIEDROC, D. P. Coordination Chemistry of Bacterial Metal Transport and Sensing. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 10, p. 4644–4681, 2009.
- MACIASZCZYK-DZIUBINSKA, E.; MIGOCKA, M.; WAWRZYCKA, D.; MARKOWSKA, K.; WYSOCKI, R. Multiple cysteine residues are necessary for sorting and transport activity of the arsenite permease Acr3p from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1838, n. 3, p. 747–755, 2014.
- MACOMBER, L.; HAUSINGER, R. P. Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. **Metalomics**, v. 3, n. 11, p. 1153–1162, 2011.
- MALASARN, D.; SALTIKOV, C. W.; CAMPBELL, K. M.; SANTINI, J. M.; HERING, J. G.; NEWMAN, D. K. arrA is a reliable marker for As(V) respiration. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 455, 2004.
- MALVANKAR, N. S.; TUOMINEN, M. T.; LOVLEY, D. R. Lack of cytochrome involvement in long-range electron transport through conductive biofilms and nanowires of *Geobacter sulfurreducens*. **Energy & Environmental Science**, v. 5, n. 9, p. 8651–8659, 2012.
- MARIETOU, A.; RØY, H.; JØRGENSEN, B. B.; KJELDSEN, K. U. Sulfate transporters in dissimilatory sulfate reducing microorganisms: A comparative genomics analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAR, p. 309, 2018.
- MASSOCATO, T. F.; RAMOS, J. C.; BASCUÑAN, V. L. F.; SIMIONI, C.; RÖRIG, L. R.; BONOMI BARUFI, J. Tolerance of *Ulothrix* sp. LAFIC 010 (Chlorophyta) against high concentration of metals from acid mine drainage. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 157, p. 227–234, 2018.
- MATHIVANAN, K.; CHANDIRIKA, J. U.; VINOCHKANNA, A.; YIN, H.; LIU, X.; MENG, D. **Bacterial adaptive strategies to cope with metal toxicity in the contaminated environment – A review**, Academic Press, 2021.
- MATSUNAGA, T.; OKAMURA, Y.; FUKUDA, Y.; WAHYUDI, A. T.; MURASE, Y.; TAKEYAMA, H. Complete genome sequence of the facultative anaerobic magnetotactic bacterium *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. **DNA Research**, v. 12, n. 3, p. 157–166, 2005.
- MAUS, V.; GILJUM, S.; GUTSCHLHOFER, J.; DA SILVA, D. M.; PROBST, M.; GASS, S.

L. B.; LUCKENEDER, S.; LIEBER, M.; MCCALLUM, I. A global-scale data set of mining areas. **Scientific Data**, v. 7, n. 1, 2020.

MAYNAUD, G.; BRUNEL, B.; YASHIRO, E.; MERGEAY, M.; CLEYET-MAREL, J. C.; LE QUÉRÉ, A. CadA of *Mesorhizobium metallidurans* isolated from a zinc-rich mining soil is a PIB-2-type ATPase involved in cadmium and zinc resistance. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 3, p. 175–189, 2014.

MCDEVITT, C. A.; OGUNNIYI, A. D.; VALKOV, E.; LAWRENCE, M. C.; KOBE, B.; MCEWAN, A. G.; PATON, J. C. A Molecular Mechanism for Bacterial Susceptibility to Zinc. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 11, p. e1002357, 2011.

MÉNDEZ-GARCÍA, C.; PELÁEZ, A. I.; MESA, V.; SÁNCHEZ, J.; GOLYSHINA, O. V.; FERRER, M. **Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats**, Frontiers Media S.A., 2015.

MESA, V.; GALLEGRO, J. L. R.; GONZÁLEZ-GIL, R.; LAUGA, B.; SÁNCHEZ, J.; MÉNDEZ-GARCÍA, C.; PELÁEZ, A. I. Bacterial, archaeal, and eukaryotic diversity across distinct microhabitats in an acid mine drainage. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. SEP, 2017.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K.; WITEK-KROWIAK, A. State of the art for the biosorption process - A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 6, p. 1389–1416, 2013.

MICHOPOULOS, P.; BALOUTSOS, G.; ECONOMOU, A.; NIKOLIS, N.; BAKEAS, E. B.; THOMAIDIS, N. S. Biogeochemistry of lead in an urban forest in Athens, Greece. **Biogeochemistry** 2005 73:2, v. 73, n. 2, p. 345–357, 2005.

MIKHAYLINA, A.; KSIBE, A. Z.; SCANLAN, D. J.; BLINDAUER, C. A. Bacterial zinc uptake regulator proteins and their regulons. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 4, p. 983–1001, 2018.

MOHITE, B. V.; KOLI, S. H.; PATIL, S. V. Heavy Metal Stress and Its Consequences on Exopolysaccharide (EPS)-Producing *Pantoea* agglomerans. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 186, n. 1, p. 199–216, 2018.

MONTOYA, L.; CELIS, L. B.; RAZO-FLORES, E.; ALPUCHE-SOLÍS, Á. G. Distribution of CO₂ fixation and acetate mineralization pathways in microorganisms from extremophilic anaerobic biotopes. **Extremophiles**, v. 16, n. 6, p. 805–817, 2012.

MÜLLER, A. L.; KJELDSEN, K. U.; RATTEL, T.; PESTER, M.; LOY, A. Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi)sulfite reductases. **The ISME Journal** 2015 9:5, v. 9, n. 5, p. 1152–1165, 2015.

MULROONEY, S. B.; HAUSINGER, R. P. Nickel uptake and utilization by microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 239–261, 2003.

MUNYAI, R.; OGOLA, H. J. O.; MODISE, D. M. Microbial Community Diversity Dynamics in Acid Mine Drainage and Acid Mine Drainage-Polluted Soils: Implication on Mining Water Irrigation Agricultural Sustainability. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 321, 2021.

MURTHY, S.; BALI, G.; SARANGI, S. K. Effect of lead on metallothionein concentration in lead-resistant bacteria *Bacillus cereus* isolated from industrial effluent. **African Journal of**

Biotechnology, v. 10, n. 71, p. 15966–15972, 2011.

NAIK, M. M.; DUBEY, S. K. Lead-enhanced siderophore production and alteration in cell morphology in a Pb-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain 4EA. **Current Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 409–414, 2011.

NAIK, M. M.; PANDEY, A.; DUBEY, S. K. *Pseudomonas aeruginosa* strain WI-1 from Mandovi estuary possesses metallothionein to alleviate lead toxicity and promotes plant growth. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 79, p. 129–133, 2012.

ÑANCUCHEO, I.; JOHNSON, D. B. Acidophilic algae isolated from mine-impacted environments and their roles in sustaining heterotrophic acidophiles. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. SEP, p. 325–325, 2012.

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, n. April, p. 1–10, 2019.

NEFF, A. N.; DENICOLA, D. M.; MALTMAN, C. Passive Treatment for Acid Mine Drainage Partially Restores Microbial Community Structure in Different Stream Habitats. **Water**, v. 13, n. 22, p. 3300, 2021.

NEUBAUER, S. C.; EMERSON, D.; MEGONIGAL, J. P. Life at the energetic edge: Kinetics of circumneutral iron oxidation by lithotrophic iron-oxidizing bacteria isolated from the wetland-plant rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3988–3995, 2002.

NEWSOME, L.; FALAGÁN, C. The Microbiology of Metal Mine Waste: Bioremediation Applications and Implications for Planetary Health. **GeoHealth**, v. 5, n. 10, 2021.

NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 6, p. 730–750, 1999.

NIES, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 313–339, 2003.

NIYOGI, D. K.; LEWIS JR., W. M.; MCKNIGHT, D. M. Effects of Stress from Mine Drainage on Diversity, Biomass, and Function of Primary Producers in Mountain Streams. **Ecosystems**, v. 5, p. 554–567, 2002.

NOVIS, P. M. Taxonomy of Klebsormidium (Klebsormidiales, Charophyceae) in New Zealand streams and the significance of low-pH habitats. <https://doi.org/10.2216/04-70.1>, v. 45, n. 3, p. 293–301, 2019.

NOVIS, P. M.; HARDING, J. S. Extreme Acidophiles. In: SECKBACH, J. (Ed.). **Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 443–463.

NRIAGU, J. O. the Science of the Total Environment Mechanistic steps in the photoreduction of mercury in natural waters. **The Science of the Total Environment**, v. 154, p. 1–8, 1994.

O'BRIEN, S.; HODGSON, D. J.; BUCKLING, A. Social evolution of toxic metal bioremediation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1787, 2014.

- O'LEARY, N. A. et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D733–D745, 2016.
- OHMURA, N.; SASAKI, K.; MATSUMOTO, N.; SAIKI, H. Anaerobic respiration using Fe³⁺, S₀, and H₂ in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 8, p. 2081–2087, 2002.
- ONG, C. Y.; WALKER, M. J.; MCEWAN, A. G. Zinc disrupts central carbon metabolism and capsule biosynthesis in *Streptococcus pyogenes*. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 10799, 2015.
- ORELL, A.; NAVARRO, C. A.; ARANCIBIA, R.; MOBAREC, J. C.; JEREZ, C. A. Life in blue: Copper resistance mechanisms of bacteria and Archaea used in industrial biomining of minerals. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 839–848, 2010.
- OREMLAND, R. S.; CULBERTSON, C. W.; WINFREY, M. R. Methylmercury Decomposition in Sediments and Bacterial Cultures: Involvement of Methanogens and Sulfate Reducers in Oxidative Demethylation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 130–137, 1991.
- OSBORN, A. M.; BRUCE, K. D.; STRIKE, P.; RITCHIE, D. A. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, n. 4, p. 239–262, 1997.
- OSÓRIO, F. H. T.; SILVA, L. F. O.; PIANCINI, L. D. S.; AZEVEDO, A. C. B.; LIEBEL, S.; YAMAMOTO, F. Y.; PHILIPPI, V. P.; OLIVEIRA, M. L. S.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; FILIPAK NETO, F.; CESTARI, M. M.; DA SILVA DE ASSIS, H. C.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 15, p. 9145–9160, 2014.
- OYEDEPO TA. Science Journal of Pure & Applied Chemistry Biosorption of Lead (II) and Copper (II) Metal Ions on *Calotropis procera* (Ait.). 2011.
- OYETIBO, G. O.; ENAHORO, J. A.; IKWUBUZO, C. A.; UKWUOMA, C. S. Microbiome of highly polluted coal mine drainage from Onyeama, Nigeria, and its potential for sequestering toxic heavy metals. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 17496, 2021.
- OYETIBO, G. O.; MIYAUCHI, K.; SUZUKI, H.; ENDO, G. Mercury removal during growth of mercury tolerant and self-aggregating *Yarrowia* spp. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.
- PAGE, W. J.; KWON, E.; CORNISH, A. S.; TINDALE, A. E. The *csbX* gene of *Azotobacter vinelandii* encodes an MFS efflux pump required for catecholate siderophore export. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, n. 2, p. 211–216, 2003.
- PAL, A.; PAUL, A. K. Optimization of Cultural Conditions for Production of Extracellular Polymeric Substances (EPS) by Serpentine Rhizobacterium *Cupriavidus pauculus* KPS 201. **Journal of Polymers**, v. 2013, 2013.
- PARIA, K.; PYNE, S.; CHAKRABORTY, S. K. Optimization of heavy metal (lead) remedial activities of fungi *Aspergillus penicillioides* (F12) through extra cellular polymeric substances. **Chemosphere**, v. 286, n. P3, p. 131874, 2021.
- PARK, D.; YUN, Y.-S.; PARK, J. M. The past, present, and future trends of biosorption.

Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 15, n. 1, p. 86–102, 2010.

PARRO, V.; MORENO-PAZ, M. Gene function analysis in environmental isolates: The nif regulon of the strict iron oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 13, p. 7883–7888, 2003.

PEL, J.; LEUNG, A.; CHOI, W. W. Y.; DESPOTOVIC, M.; LLOYD UNG, W.; SHIBAHARA, G.; GELINAS, L.; MARZIALI, A. Rapid and highly-specific generation of targeted DNA sequencing libraries enabled by linking capture probes with universal primers. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0208283, 2018.

PEPPER, I. L.; GENTRY, T. J. Microorganisms Found in the Environment. **Environmental Microbiology: Third Edition**, p. 9–36, 2015.

PIETRO-SOUZA, W.; DE CAMPOS PEREIRA, F.; MELLO, I. S.; STACHACK, F. F. F.; TEREZO, A. J.; CUNHA, C. N. Da; WHITE, J. F.; LI, H.; SOARES, M. A. Mercury resistance and bioremediation mediated by endophytic fungi. **Chemosphere**, v. 240, p. 124874, 2020.

PILLE DA SILVA, E.; DUTRA DE ARMAS, R.; ADEMAR AVELAR FERREIRA, P.; LAURENTINO DANTAS, M. K.; GIACHINI, A. J.; ROCHA-NICOLEITE, E.; GONZÁLEZ, A. H.; FONSÊCA SOUSA SOARES, C. R. Soil attributes in coal mining areas under recovery with bracinga (*Mimosa scabrella*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 497–504, 2019.

PIRBADIAN, S.; BARCHINGER, S. E.; LEUNG, K. M.; BYUN, H. S.; JANGIR, Y.; BOUHENNI, R. A.; REED, S. B.; ROMINE, M. F.; SAFFARINI, D. A.; SHI, L.; GORBY, Y. A.; GOLBECK, J. H.; EL-NAGGAR, M. Y. *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 35, p. 12883–12888, 2014.

POLJSAK, B.; PÓCSI, I.; RASPOR, P.; PESTI, M. Interference of chromium with biological systems in yeasts and fungi: a review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 21–36, 2010.

PRICE, G. D.; WOODGER, F. J.; BADGER, M. R.; HOWITT, S. M.; TUCKER, L. Identification of a SulP-type bicarbonate transporter in marine cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 52, p. 18228–18233, 2004.

PRIHATINI, N. S.; SOEMARNO. Potential of Purun tikus (*Eleocharis dulcis* (Burm. F.) Trin. ex Hensch) to restore the Iron (Fe) contaminated acid mine drainage by using constructed wetland. **Phytorestitution of Abandoned Mining and Oil Drilling Sites**, p. 409–438, 2021.

PRIYADARSHANEE, M.; DAS, S. Biosorption and removal of toxic heavy metals by metal tolerating bacteria for bioremediation of metal contamination: A comprehensive review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 104686, 2021.

PURWANTINI, E.; TORTO-ALALIBO, T.; LOMAX, J.; SETUBAL, J. C.; TYLER, B. M.; MUKHOPADHYAY, B. Genetic resources for methane production from biomass described with the Gene Ontology. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. DEC, 2014.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.;

- PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 2013.
- QUINCE, C.; WALKER, A. W.; SIMPSON, J. T.; LOMAN, N. J.; SEGATA, N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 833–844, 2017.
- RAJENDRAN, P.; MUTHUKRISHNAN, J.; GUNASEKARAN, P. Microbes in heavy metal remediation. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 41, n. 9, p. 935–944, 2003.
- RAMBABU, K.; BANAT, F.; PHAM, Q. M.; HO, S. H.; REN, N. Q.; SHOW, P. L. **Biological remediation of acid mine drainage: Review of past trends and current outlook**, Editorial Board, Research of Environmental Sciences, 2020.
- RAMÍREZ-DÍAZ, M. I.; DÍAZ-PÉREZ, C.; VARGAS, E.; RIVEROS-ROSAS, H.; CAMPOS-GARCÍA, J.; CERVANTES, C. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. **BioMetals**, v. 21, n. 3, p. 321–332, 2008.
- RANGEL, W. de M.; SCHNEIDER, J.; SOARES, C. R. F. S.; ARMAS, R. D. De; FERREIRA, P. A. A.; GIACHINI, A. J.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. de S. **Phytoremediation**. Volume 3 ed. Cham: Springer International Publishing, 2016.
- RASHID, M. I.; MUJAWAR, L. H.; SHAHZAD, T.; ALMEELBI, T.; ISMAIL, I. M. I.; OVES, M. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. **Microbiological Research**, v. 183, p. 26–41, 2016.
- REHAN, M.; S. ALSOHIM, A. Bioremediation of Heavy Metals. In: RIAZ, A. S. A. E.-H. S.-N. E.-M. A. M.-T. E.-R. F. E.-R. D. E.-S. (Ed.). **Environmental Chemistry and Recent Pollution Control Approaches**. Rijeka: IntechOpen, 2019. p. Ch. 8.
- RENIERO, D.; GALLI, E.; BARBIERI, P. Cloning and comparison of mercury- and organomercurial-resistance determinants from a *Pseudomonas stutzeri* plasmid. **Gene**, v. 166, n. 1, p. 77–82, 1995.
- RINKLEBE, J.; SHAHEEN, S. M. Redox chemistry of nickel in soils and sediments: A review. **Chemosphere**, v. 179, p. 265–278, 2017.
- RIZVI, A.; AHMED, B.; ZAIDI, A.; KHAN, M. S. Bioreduction of toxicity influenced by bioactive molecules secreted under metal stress by *Azotobacter chroococcum*. **Ecotoxicology**, v. 28, n. 3, p. 302–322, 2019.
- ROANE, T. M.; PEPPER, I. L.; GENTRY, T. J. **Microorganisms and Metal Pollutants**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2015.
- RODRIGUE, A.; EFFANTIN, G.; MANDRAND-BERTHELOT, M.-A. Identification of *rcnA* (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 8, p. 2912–6, 2005.
- RODRIGUEZ-FREIRE, L.; SIERRA-ALVAREZ, R.; ROOT, R.; CHOROVER, J.; FIELD, J. A. Biomineralization of arsenate to arsenic sulfides is greatly enhanced at mildly acidic conditions. **Water Research**, v. 66, p. 242–253, 2014.
- ROSEN, B. P. Biochemistry of arsenic detoxification. **FEBS Letters**, v. 529, n. 1, p. 86–92, 2002.

ROWE, J. L.; STARNES, G. L.; CHIVERS, P. T. Complex transcriptional control links NikABCDE-dependent nickel transport with hydrogenase expression in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 18, p. 6317–6323, 2005.

SAHA, R.; SAHA, N.; DONOFRIO, R. S.; BESTERVELT, L. L. Microbial siderophores: a mini review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 303–317, 2013.

SAITO, K. Sulfur Assimilatory Metabolism. The Long and Smelling Road. **Plant Physiology**, v. 136, n. 1, p. 2443–2450, 2004.

SALTIKOV, C. W.; NEWMAN, D. K. Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 19, p. 10983–10988, 2003.

SÁNCHEZ-ANDREA, I.; SANZ, J. L.; BIJMANS, M. F. M.; STAMS, A. J. M. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. **Journal of Hazardous Materials**, v. 269, p. 98–109, 2014.

SANDY, M.; BUTLER, A. Microbial Iron Acquisition: Marine and Terrestrial Siderophores. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 10, p. 4580–4595, 2009.

SANTOS, A. A.; VENCESLAU, S. S.; GREIN, F.; LEAVITT, W. D.; DAHL, C.; JOHNSTON, D. T.; PEREIRA, I. A. C. A protein trisulfide couples dissimilatory sulfate reduction to energy conservation. **Science**, v. 350, n. 6267, p. 1541–1545, 2015.

SAYER, J. A.; COTTER-HOWELLS, J. D.; WATSON, C.; MILLIER, S.; GADD, G. M. Lead mineral transformation by fungi. **Current Biology**, v. 9, n. 13, p. 691–694, 1999.

SCHALK, I. J.; HANNAUER, M.; BRAUD, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 2844–2854, 2011.

SCHEFFEL, A.; SCHÜLER, D. Magnetosomes in Magnetotactic Bacteria. In: **Complex Intracellular Structures in Prokaryotes**. [s.l.] : Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. p. 167–191.

SCHRÖDER, I.; JOHNSON, E.; DE VRIES, S. Microbial ferric iron reductases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 427–447, 2003.

SCHWALB, C.; CHAPMAN, S. K.; REID, G. A. The tetraheme cytochrome CymA is required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis*. **Biochemistry**, v. 42, n. 31, p. 9491–9497, 2003.

SEEGER, M. A.; SCHIEFNER, A.; EICHER, T.; VERREY, F.; DIEDERICH, K.; POS, K. M. Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1295–1298, 2006.

SEH-BARDAN, B. J.; OTHMAN, R.; WAHID, S. A.; HUSIN, A.; SADEGH-ZADEH, F. Bioleaching of Heavy Metals from Mine Tailings by *Aspergillus fumigatus*. **Bioremediation Journal**, v. 16, n. 2, p. 57–65, 2012.

SELLER, P.; KELLY, C. A.; RUDD, J. W. M.; MACHUTCHON, A. R. Photodegradation of methylmercury in lakes. **Nature**, v. 380, n. 6576, p. 694–697, 1996.

SHAMIM, S. Biosorption of Heavy Metals. **Biosorption**, 2018.

SHE, Z.; PAN, X.; WANG, J.; SHAO, R.; WANG, G.; WANG, S.; YUE, Z. Vertical environmental gradient drives prokaryotic microbial community assembly and species coexistence in a stratified acid mine drainage lake. **Water Research**, v. 206, p. 117739, 2021.

SHE, Z.; WANG, J.; HE, C.; PAN, X.; SHI, Q.; SHAO, R.; LI, Y.; YUE, Z. New Insights into Microbial Interactions with Dissolved Organic Matter in Acid Mine Drainage with the Integration of Microbial Community and Chemical Composition Analysis. **ACS Environmental Science and Technology Water**, v. 2, n. 2, p. 278–287, 2022.

SHEN, Y.; BUICK, R.; CANFIELD, D. E. Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archaean era. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 77–81, 2001.

SHI, K.; LI, C.; RENSING, C.; DAI, X.; FAN, X.; WANG, G. Efflux transporter ArsK is responsible for bacterial resistance to arsenite, antimonite, trivalent roxarsone, and methylarsenite. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 24, p. 1842–1860, 2018.

SHIVELY, J. M.; VAN KEULEN, G.; MEIJER, W. G. Something from almost nothing: Carbon Dioxide Fixation in Chemoautotrophs. **Annual Review of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 191–230, 1998.

SILVA, L. F. O.; FDEZ- ORTIZ DE VALLEJUELO, S.; MARTINEZ-ARKARAZO, I.; CASTRO, K.; OLIVEIRA, M. L. S.; SAMPAIO, C. H.; DE BRUM, I. A. S.; DE LEÃO, F. B.; TAFFAREL, S. R.; MADARIAGA, J. M. Study of environmental pollution and mineralogical characterization of sediment rivers from Brazilian coal mining acid drainage. **Science of The Total Environment**, v. 447, p. 169–178, 2013.

SILVA, L. F. O.; WOLLENSCHLAGER, M.; OLIVEIRA, M. L. S. A preliminary study of coal mining drainage and environmental health in the Santa Catarina region, Brazil. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 33, n. 1, p. 55–65, 2011.

SIMATE, G. S.; NDLOVU, S. Acid mine drainage: Challenges and opportunities. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 3, p. 1785–1803, 2014.

SINGH, S. K.; GRASS, G.; RENSING, C.; MONTFORT, W. R. Cuprous oxidase activity of CueO from Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 22, p. 7815–7817, 2004.

SINHA, A.; KHARE, S. K. Mercury bioaccumulation and simultaneous nanoparticle synthesis by Enterobacter sp. cells. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 4281–4284, 2011.

SMITH, A. D.; LOGEMAN, B. L.; THIELE, D. J. Copper Acquisition and Utilization in Fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 597–623, 2017.

SMITH, T.; PITTS, K.; MCGARVEY, J. A.; SUMMERS, A. O. Bacterial oxidation of mercury metal vapor, Hg(0). **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1328–32, 1998.

SOLIOZ, M.; STOYANOV, J. V. Copper homeostasis in Enterococcus hirae. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 183–195, 2003.

SOUZA, L. S.; SIMIONI, C.; BOUZON, Z. L.; SCHNEIDER, R. C. S.; GRESSLER, P.; MIOTTO, M. C.; ROSSI, M. J.; RÖRIG, L. R. Morphological and ultrastructural characterization of the acidophilic and lipid-producer strain Chlamydomonas acidophila LAFIC-004 (Chlorophyta) under different culture conditions. **Protoplasma**, v. 254, n. 3, p. 1385–1398, 2017.

STIBAL, M.; ELSTER, J. Growth and morphology variation as a response to changing environmental factors in two Arctic species of *Raphidonema* (Trebouxiophyceae) from snow and soil. **Polar Biology**, v. 28, n. 7, p. 558–567, 2005.

STOPPEL, R. D.; MEYER, M.; SCHLEGEL, H. G. The nickel resistance determinant cloned from the enterobacterium *Klebsiella oxytoca*: conjugational transfer, expression, regulation and DNA homologies to various nickel-resistant bacteria. **Biometals**, v. 8, n. 1, p. 70–79, 1995.

STROSNIDER, W. H. J.; NAIRN, R. W.; PEER, R. A. M.; WINFREY, B. K. Passive co-treatment of Zn-rich acid mine drainage and raw municipal wastewater. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 125, p. 110–116, 2013.

TAGHAVI, S.; LESAULNIER, C.; MONCHY, S.; WATTIEZ, R.; MERGEAY, M.; LELIE, D. Lead(II) resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34: Interplay between plasmid and chromosomally-located functions. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 96, n. 2 SPEC. ISS., p. 171–182, 2009.

TAKAHASHI, S.; TOMITA, J.; NISHIOKA, K.; HISADA, T.; NISHIJIMA, M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

THATOI, H.; DAS, S.; MISHRA, J.; RATH, B. P.; DAS, N. Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 146, p. 383–399, 2014.

THAUER, R. K.; KASTER, A.-K.; SEEDORF, H.; BUCKEL, W.; HEDDERICH, R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 579–591, 2008.

THORUP, C.; SCHRAMM, A.; FINDLAY, A. J.; FINSTER, K. W.; SCHREIBER, L. Disguised as a Sulfate Reducer: Growth of the Deltaproteobacterium *Desulfurivibrio alkaliphilus* by Sulfide Oxidation with Nitrate. **mBio**, v. 8, n. 4, 2017.

TJADEN, B.; PLAGENS, A.; DÖRR, C.; SIEBERS, B.; HENSEL, R. Phosphoenolpyruvate synthetase and pyruvate, phosphate dikinase of *Thermoproteus tenax*: key pieces in the puzzle of archaeal carbohydrate metabolism. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 287–298, 2006.

TOUATI, D. Iron and Oxidative Stress in Bacteria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, n. 1, p. 1–6, 2000.

TOURNA, M.; MACLEAN, P.; CONDRON, L.; O'CALLAGHAN, M.; WAKELIN, S. A. Links between sulphur oxidation and sulphur-oxidising bacteria abundance and diversity in soil microcosms based on *soxB* functional gene analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 88, n. 3, p. 538–549, 2014.

TOYODA, K.; YOSHIZAWA, Y.; ARAI, H.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. The role of two CbbRs in the transcriptional regulation of three ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes in *Hydrogenovibrio marinus* strain MH-110. **Microbiology**, v. 151, n. 11, p. 3615–3625, 2005.

TRIPATHI, N.; SINGH, R. S.; HILLS, C. D. Reclamation of Mine-Impacted Land for Ecosystem Recovery. **Reclamation of Mine-Impacted Land for Ecosystem Recovery**, 2016.

TSALLAGOV, S. I.; SOROKIN, D. Y.; TIKHONOVA, T. V.; POPOV, V. O.; MUYZER, G.

Comparative genomics of *Thiohalobacter thiocyanaticus* HRh1T and *guyarkeriasp.* SCN-R1, halophilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing gammaproteobacteria capable of using thiocyanate as energy source. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, p. 898, 2019.

TYSON, G. W.; LO, I.; BAKER, B. J.; ALLEN, E. E.; HUGENHOLTZ, P.; BANFIELD, J. F. Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferro Diazotrophum* sp. nov. from an acidophilic microbial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 6319–6324, 2005.

U.S. EPA. **Method 3051A (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Oils**. Washington, DC.

VALDÉS, J.; PEDROSO, I.; QUATRINI, R.; DODSON, R. J.; TETTELIN, H.; BLAKE, R.; EISEN, J. A.; HOLMES, D. S. Acidithiobacillus ferrooxidans metabolism: From genome sequence to industrial applications. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 1–24, 2008.

VALENCIA, A.; MUGGE, R.; SCHOORMANS, J. P. L.; SCHIFFERSTEIN, H. N. J. Distinctive Characteristics of Smart PSSs 1. p. 852–863, 2013.

VALIX, M.; USAI, F.; MALIK, R. Fungal bio-leaching of low grade laterite ores. **Minerals Engineering**, v. 14, n. 2, p. 197–203, 2001.

VEGA, B. O. A.; LOBINA, D. V. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal**. [s.l.] : Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, 2007.

VERB, R. G.; VIS, M. L. Macroalgal communities from an acid mine drainage impacted watershed. **Aquatic Botany**, v. 71, n. 2, p. 93–107, 2001.

VERMA, S.; VERMA, P. K.; MEHER, A. K.; DWIVEDI, S.; BANSIWAL, A. K.; PANDE, V.; SRIVASTAVA, P. K.; VERMA, P. C.; TRIPATHI, R. D.; CHAKRABARTY, D. A novel arsenic methyltransferase gene of *Westerdykella aurantiaca* isolated from arsenic contaminated soil: phylogenetic, physiological, and biochemical studies and its role in arsenic bioremediation. **Metallomics**, v. 8, n. 3, p. 344–353, 2016.

VILLEGAS-PLAZAS, M.; SANABRIA, J.; JUNCA, H. A composite taxonomical and functional framework of microbiomes under acid mine drainage bioremediation systems. **Journal of Environmental Management**, v. 251, p. 109581, 2019.

VOLANT, A.; HÉRY, M.; DESOEUVRE, A.; CASIOT, C.; MORIN, G.; BERTIN, P. N.; BRUNEEL, O. Spatial Distribution of Eukaryotic Communities Using High-Throughput Sequencing Along a Pollution Gradient in the Arsenic-Rich Creek Sediments of Carnoulès Mine, France. **Microbial Ecology**, v. 72, n. 3, p. 608–620, 2016.

VON CANSTEIN, H.; OGAWA, J.; SHIMIZU, S.; LLOYD, J. R. Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 615–623, 2008.

WAITE, D. W.; CHUVOCHINA, M.; PELIKAN, C.; PARKS, D. H.; YILMAZ, P.; WAGNER, M.; LOY, A.; NAGANUMA, T.; NAKAI, R.; WHITMAN, W. B.; HAHN, M. W.; KUEVER, J.; HUGENHOLTZ, P. Proposal to reclassify the proteobacterial classes *deltaproteobacteria* and *oligoflexia*, and the phylum *thermodesulfobacteria* into four phyla reflecting major functional capabilities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5972–6016, 2020.

WALTERS, K. E.; MARTINY, J. B. H. Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. **PLoS ONE**, v. 15, n. 9 September, p. 1–17, 2020.

WANG, P. C.; TODA, K.; OHTAKE, H.; KUSAKA, I.; YABE, I. Membrane-bound respiratory system of *Enterobacter cloacae* strain HO1 grown anaerobically with chromate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 78, n. 1, p. 11–15, 1991.

WANG, R.; LIN, J. Q.; LIU, X. M.; PANG, X.; ZHANG, C. J.; YANG, C. L.; GAO, X. Y.; LIN, C. M.; LI, Y. Q.; LI, Y.; LIN, J. Q.; CHEN, L. X. Sulfur oxidation in the acidophilic autotrophic *Acidithiobacillus* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JAN, p. 1–20, 2019.

WATTAM, A. R.; ABRAHAM, D.; DALAY, O.; DISZ, T. L.; DRISCOLL, T.; GABBARD, J. L.; GILLESPIE, J. J.; GOUGH, R.; HIX, D.; KENYON, R.; MACHI, D.; MAO, C.; NORDBERG, E. K.; OLSON, R.; OVERBEEK, R.; PUSCH, G. D.; SHUKLA, M.; SCHULMAN, J.; STEVENS, R. L.; SULLIVAN, D. E.; VONSTEIN, V.; WARREN, A.; WILL, R.; WILSON, M. J. C.; YOO, H. S.; ZHANG, C.; ZHANG, Y.; SOBRAL, B. W. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D581–D591, 2014.

WEISSE, T.; MOSER, M.; SCHEFFEL, U.; STADLER, P.; BERENDONK, T.; WEITHOFF, G.; BERGER, H. Systematics and species-specific response to pH of *Oxytricha acidotolerans* sp. nov. and *Urosomoida* sp. (Ciliophora, Hypotricha) from acid mining lakes. **European Journal of Protistology**, v. 49, n. 2, p. 255–271, 2013.

WELCH, S. A.; ULLMAN, W. J. The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 57, n. 12, p. 2725–2736, 1993.

WISE, S. S.; ELMORE, L. W.; HOLT, S. E.; LITTLE, J. E.; ANTONUCCI, P. G.; BRYANT, B. H.; WISE, J. P. No Title. v. 255, p. 103–112, 2004.

WU, B.; LIU, F.; FANG, W.; YANG, T.; CHEN, G. H.; HE, Z.; WANG, S. Microbial sulfur metabolism and environmental implications. **Science of the Total Environment journal**, v. 778, p. 146085, 2021.

WU, G.; LI, N.; MAO, Y.; ZHOU, G.; GAO, H. Endogenous generation of hydrogen sulfide and its regulation in *Shewanella oneidensis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. APR, p. 374, 2015.

XIE, J.; HE, Z.; LIU, X.; LIU, X.; VAN NOSTRAND, J. D.; DENG, Y.; WU, L.; ZHOU, J.; QIU, G. GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of microbial communities in acid mine drainage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 991–999, 2011.

XING, S. C.; CHEN, J. Y.; LV, N.; MI, J. D.; CHEN, W. L.; LIANG, J. B.; LIAO, X. Di. Biosorption of lead (Pb²⁺) by the vegetative and decay cells and spores of *Bacillus coagulans* R11 isolated from lead mine soil. **Chemosphere**, v. 211, p. 804–816, 2018.

XU, R.; LI, B.; XIAO, E.; YOUNG, L. Y.; SUN, X.; KONG, T.; DONG, Y.; WANG, Q.; YANG, Z.; CHEN, L.; SUN, W. Uncovering microbial responses to sharp geochemical gradients in a terrace contaminated by acid mine drainage. **Environmental Pollution**, v. 261, p. 114226, 2020.

YALCIN, S. E.; MALVANKAR, N. S. The blind men and the filament: Understanding structures and functions of microbial nanowires. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.

59, p. 193–201, 2020.

YIN, K.; WANG, Q.; LV, M.; CHEN, L. Microorganism remediation strategies towards heavy metals. **Chemical Engineering Journal**, v. 360, p. 1553–1563, 2019.

YIN, Y.; ALLEN, H. E.; LI, Y.; HUANG, C. P.; SANDERS, P. F. Adsorption of Mercury(II) by Soil: Effects of pH, Chloride, and Organic Matter. **Journal of Environmental Quality**, v. 25, n. 4, p. 837–844, 1996.

YUSUF, M.; FARIDUDDIN, Q.; HAYAT, S.; AHMAD, A. Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, n. 1, p. 1–17, 2011.

ZHANG, J.; MA, T.; FENG, L.; YAN, Y.; ABASS, O. K.; WANG, Z.; CAI, H. Arsenic behavior in different biogeochemical zonations approximately along the groundwater flow path in Datong Basin, northern China. **Science of The Total Environment**, v. 584–585, p. 458–468, 2017.

ZHANG, Q.; BANDA, J. F.; DONG, H. H.; HAO, C.; GUO, D.; MAO, W.; MA, L.; DONG, H. H. Responses of Acidophilic Communities in Different Acid Mine Drainages to Environmental Conditions in Nanshan Mine, Anhui Province, China. **Geomicrobiology Journal**, v. 38, n. 8, p. 686–697, 2021.

ZHANG, Y.; RODIONOV, D. A.; GELFAND, M. S.; GLADYSHEV, V. N. Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B12 utilization. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 1–26, 2009.

APÊNDICE A – Fotos das estações de coleta

Figura S1. Estação #1 – Língua do Dragão



Figura S2. Estação #2 – BM0574

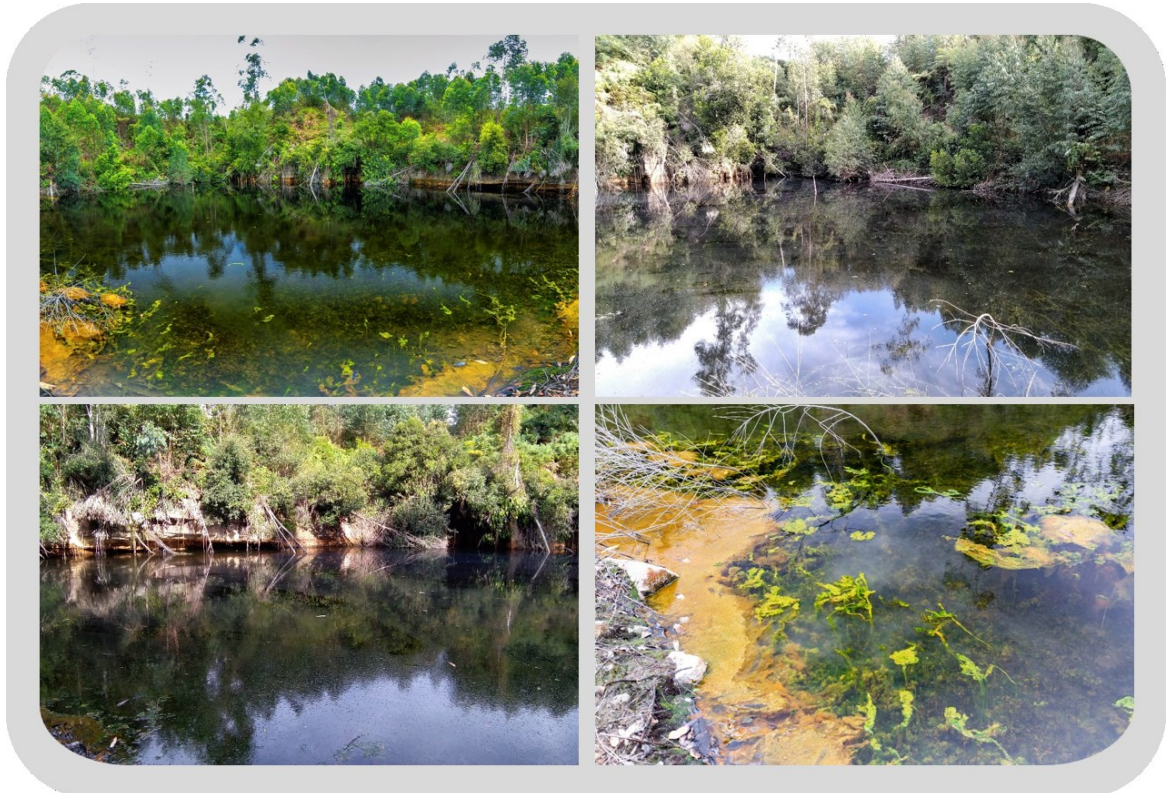


Figura S3. Estação #3 – Cabeleira



Figura S4. Estação #4 – BM0639



Figura S5. Estação #5 – Junção dos rios Sangão e Mãe Luzia



Apêndice B - Dados das análises Correspondência Canônica

Tabela S1. Dados de eigenvalue e permutação para as análises multivariadas de Correspondência Canônica das amostras procariontes (16S) em água

Axis	<i>Eigenvalue</i>		<i>Permutation</i>	
	Eigenvalue	%	Eigenval	p
1	0,63311	48,04	0,6331	0,583
2	0,27857	21,14	0,2786	0,944
3	0,26135	19,83	0,2614	0,869
4	0,14496	11	0,145	0,102

Tabela S2. Dados de eigenvalue e permutação para as análises multivariadas de Correspondência Canônica das amostras procariontes (16S) em sedimento

Axis	<i>Eigenvalue</i>		<i>Permutation</i>	
	Eigenvalue	%	Eigenval	p
1	0,64483	59,61	0,6331	0,583
2	0,2145	19,83	0,2786	0,944
3	0,19885	18,38	0,2614	0,869
4	0,023596	2,181	0,145	0,102

Tabela S3. Dados de eigenvalue e permutação para as análises multivariadas de Correspondência Canônica das amostras procariontes (18S) em água

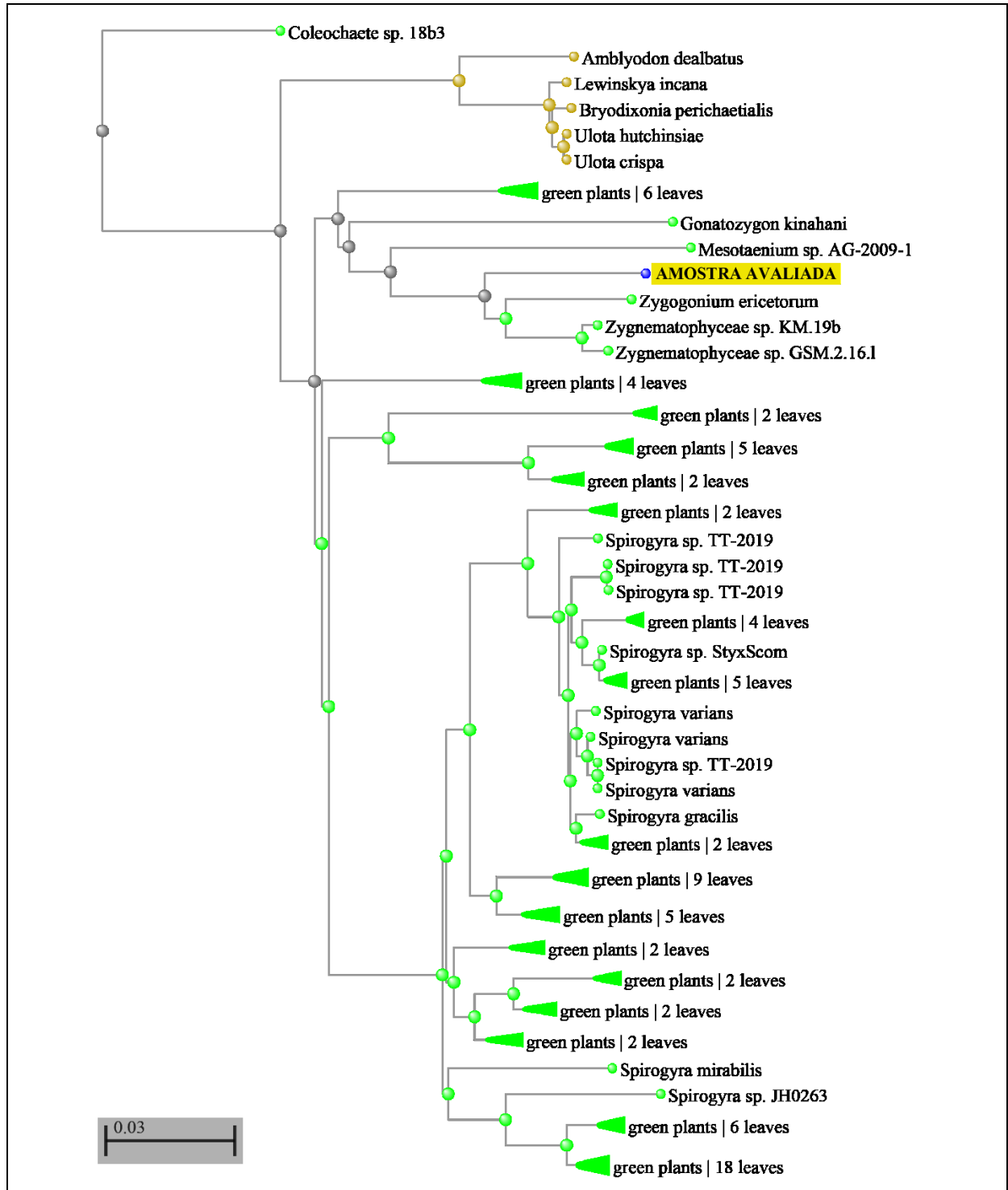
Axis	<i>Eigenvalue</i>		<i>Permutation</i>	
	Eigenvalue	%	Eigenval	p
1	0,63784	40,78	0,6331	0,583
2	0,44811	28,65	0,2786	0,944
3	0,3964	25,34	0,2614	0,869
4	0,081775	5,228	0,145	0,102

Tabela S4. Dados de eigenvalue e permutação para as análises multivariadas de Correspondência Canônica das amostras procariontes (18S) em sedimento

Axis	<i>Eigenvalue</i>		<i>Permutation</i>	
	Eigenvalue	%	Eigenval	p
1	0,3114	32,25	0,6331	0,583
2	0,27889	28,88	0,2786	0,944
3	0,20275	21	0,2614	0,869
4	0,1726	17,87	0,145	0,102

Apêndice C - Árvore filogenética da identificação molecular

Figura S6. Árvore filogenética dos taxóons alinhados com a sequência da alga filamentosa através da ferramenta BLAST do banco NCBI.



Método da árvore: *Neighbor Joining*. Máximo de sequências diferentes: 0.75.