

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TESE DE DOUTORADO

**DIVERSIDADE GENÉTICA DA COMUNIDADE MICROBIANA DE
DRENAGEM ÁCIDA DE MINA EM FORMAÇÃO**

ORIENTADA: Julliane Dutra Medeiros
ORIENTADOR: Guilherme Corrêa de Oliveira
CO-ORIENTADOR: Sara Cuadros-Orellana

BELO HORIZONTE
Dezembro de 2016

Julliane Dutra Medeiros

**Diversidade genética da comunidade microbiana de drenagem
ácida de mina em formação**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Genética da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Genética.

Área de Concentração: Genômica e Bioinformática

Orientador: Dr. Guilherme Côrrea de Oliveira

Co-orientadora: Dra. Sara Cuadros-Orellana

043 Medeiros, Julliane Dutra.
Diversidade genética da comunidade microbiana de drenagem ácida de mina em
formação [manuscrito] / Julliane Dutra Medeiros. – 2016.

113 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Guilherme Côrrea de Oliveira. Co-orientadora: Dra. Sara
Cuadros-Orellana.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas.

1. Genética - Teses. 2. Bioinformática - Teses. 3. Drenagem ácida de minas -
Aspectos ambientais. 4. Genômica - Teses. 5. Metagenômica - Teses. 6. Microbiota. I.
Oliveira, Guilherme Côrrea de. II. Cuadros-Orellana, Sara. III. Universidade Federal de
Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570



**"Diversidade genética da comunidade microbiana de drenagem ácida
de mina em formação"**

Julliane Dutra Medeiros

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Guilherme Correa de Oliveira - Orientador
René Rachou - FIOCRUZ

Jacques Robert Nicoli
UEMG

Andréa Maria Amaral Nascimento
UFMG

Glória Regina Franco
UFMG

Ronnie Alves
Vale

Belo Horizonte, 02 de dezembro de 2016.

“Faço parte dos que acham que a Ciência é belíssima.”

Marie Curie

Primeira mulher a ganhar o prêmio Nobel

AGRADECIMENTOS

“A Gratidão é a memória do coração. ”

Agradeço ao meu orientador, Dr. Guilherme Oliveira, por todas as oportunidades que me proporcionou durante esses anos do doutorado, as quais foram essenciais para minha formação. Agradeço também pela tranquilidade com que conduziu minha orientação.

Agradeço à minha co-orientadora, Sara, pela amizade construída, e por ter acompanhado com muita dedicação todas as etapas de desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço aos professores, coordenadores e secretárias da Pós-Graduação em Genética da UFMG. A contribuição de todos foi fundamental para minha formação.

Agradeço aos membros da banca pela disposição em ler meu trabalho e pelas contribuições que serão dadas.

Agradeço à Vale pela bolsa de estudos.

Agradeço aos amigos Laura e Francison, pelas ajudas e todo o conhecimento compartilhado em bioinformática. Também agradeço pelo convívio diário. Vocês foram essenciais!

Agradeço aos amigos Victor e Gabriel, por terem entrado no projeto e contribuído muito para os resultados finais. Agradeço também pelos puxões de orelha, conselhos, apoio e pela amizade.

Agradeço ao BMP (*Brazilian Microbiome Project*) pelo desenvolvimento do *pipeline* de análise das sequências do gene 16S rRNA que facilitou muito a obtenção de alguns resultados desse trabalho.

Agradeço a Ângela, por cuidar da parte financeira desse projeto, sempre nos proporcionando melhores condições de trabalho.

Agradeço a Viviani, minha querida IC'zinha, sua ajuda foi muito importante e compartilhar com você minha experiência foi enriquecedor.

Agradeço a todos que fizeram/fazem parte do antigo Grupo de Genômica e Biologia Computacional/CEBio, agora Grupo de Informática de Biosistemas do Centro de Pesquisa René Rachou. Em especial Assmaa, Fausto, Fabiano, Daniel, Anna, Mari Magalhães, Eliane, Wagner, Juliana, Anderson, Flávio, Paulinha, Mari Oliveira, Larissa, Elisangela, Renata, Sandra, Marina, Felipe e Luís. Vocês foram minha família durante esses quase quatro anos e fizeram tudo mais divertido e simples. Agradeço também a todos os amigos do LPCM pelos momentos compartilhados.

Agradeço às amigas queridas que a pós-graduação me deu, Izinara e Fernanda Sales.

Agradeço ao meu companheiro de jornada, João. Obrigada por sempre me apoiar, acreditar nos meus sonhos e ajudar a conquistá-los. Obrigada pela paciência, por aguentar meus (muitos) momentos de estresse e por ser meu melhor amigo. Amo você!

Agradeço aos meus pais pelo amor incondicional. Por romperem todas as barreiras da distância e se fazerem presentes nos momentos bons e ruins. Agradeço ao meu irmão pelo companheirismo, paciência, amizade e por me ensinar a ser mais tolerante. Agradeço aos meus avós que também sempre acompanharam de perto toda minha trajetória. Amo muito todos vocês.

A todos que apoiaram minha caminhada, meu sincero muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Indústria da Mineração.....	15
1.2. Biomineração.....	16
1.3. Drenagem Ácida de Mina	19
1.3.1. Biorremediação de AMD.....	21
1.4. Estudos Genômicos e Metagenômicos	22
1.4.1. Sistemas CRISPR-Cas.....	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo Geral.....	28
2.2. Objetivos Específicos	28
3. CONTEXTUALIZAÇÃO E ESTRUTURAÇÃO DA TESE	29
4. CAPÍTULO I – Caracterização taxonômica da comunidade microbiana em drenagem ácida de mina	31
4.1. Introdução.....	31
4.2. Metodologia.....	32
4.2.1. Coletas.....	32
4.2.2. Características físico-químicas.....	33
4.2.3. Filtração das amostras de água	33
4.2.4. Extração de DNA	33
4.2.5. Sequenciamento do gene 16S rRNA	34
4.2.6. Análises de bioinformática	36
4.3. Resultados e Discussão.....	37
4.3.1. Metadados	37
4.3.2. Resultado do sequenciamento	41
4.3.3. α -diversidade.....	41
4.3.4. Perfil taxonômico	43
4.3.5. Microbiota core.....	45
4.3.6. Microrganismos com potencial para biolixiviação e biorremediação	50

4.3.7. β -diversidade	51
5. CAPÍTULO II – Single cell sequencing unveils the lifestyle and CRISPR-based population history of <i>Hydrotalea</i> sp. In acid mine drainage	54
Abstract.....	56
Introduction	57
Material and Methods.....	58
Environmental data and metadata.....	58
Single-cell sorting, whole genome amplification, and phylogenetic analysis.....	59
Sequencing, assembly and annotation	59
Comparative analysis and fragment recruitment	60
CRISPR-Cas analysis	61
Cas1 Phylogeny	61
Sequence accession.....	62
Results and Discussion	62
Chemical conditions in AMD	62
Phylogenetic affiliation of single cells and genome statistics	63
Distribution of SAGs in the mine environment.....	64
Genome content analysis.....	65
Microevolutionary history of SAGs based on their CRISPR-cas inventory	67
Concluding remarks.....	71
Acknowledgements	71
Data accessibility.....	71
Author Contributions.....	72
Figures and tables	73
References	92
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
7. REFERÊNCIAS.....	98
8. ANEXOS	105
8.1. Anexo I.....	106
8.2. Anexo II.....	107
8.3. Anexo III.....	108
8.4. Anexo IV	109
8.5. Anexo V	110
8.6. Anexo VI	111
8.7. Anexo VII	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo de oxidação do metal sulfetado calcopirita pela ação de microrganismos oxidadores de ferro e enxofre. B representam as etapas em que as conversões são realizadas por microrganismos. Adaptada de JOHNSON, 2013.....	17
Figura 2 – Representação esquemática de enzimas e proteínas transportadoras de elétrons envolvidas na oxidação do ferro ferroso. Fonte:VALDÉS et al., 2008	18
Figura 3 – Rejeitos da Mina de Sossego - Carajás PA. A) Barragem de rejeitos do processo de flotação, rejeito gerado após o beneficiamento do minério. B) Pilhas de minérios descartados pela operação de lavra antes do beneficiamento.....	20
Figura 4 – Esquema representativo do processo de biorremediação de AMD utilizando microrganismos redutores de sulfato. Adaptada de KLEIN et al., 2014.....	21
Figura 5 – Diferentes abordagens genômicas e metagenômicas para estudo das comunidades microbianas. A-Sequenciamento do gene 16S rRNA. B- Metagenômica shotgun. C- Genômica de célula única (Single Cell Genomics). Adaptado de LASKEN; MCLEAN, 2014.....	24
Figura 6 – Organização de um locus CRISPR–Cas típico de genomas de arqueias e bactérias. Fonte: (AMITAI; SOREK, 2016).	26
Figura 7 – Esquema ilustrativo da construção de bibliotecas de 16S para sequenciamento no MiSeq da Illumina.	35
Figura 8 – Drenagem ácida de mina coletada em Abril de 2013.	40
Figura 9 – Curva de rarefação dos microbiomas analisados. Dados plotados com uma subamostragem de 25000 sequências.	43
Figura 10 – Perfil taxonômico da comunidade microbiana de amostras de água e sedimento de drenagem ácida de mina coletadas em abril 2013 e julho 2014.	44
Figura 11 – Filogenia do gene 16S rRNA das células únicas obtidas pelo pipeline de single cell genomics e das OTUs classificadas como Chitinophagaceae. Em destaque rosa todas as OTUs atribuídas ao gênero Sediminibacterium, em azul o clado com as células únicas pertencentes ao gênero Hydrotalea. O alinhamento das sequências foi realizado com MAFFT e o método filogenético utilizado foi a inferência Bayesiana através do programa MrBayes (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001) como descrito por PYLRO et al., (2012).	50
Figura 12 – OTUs classificadas para as famílias de bactérias redutoras de sulfato nos diferentes ambientes da área de mineração. Cada cor representa uma família de SBR. Os pontos representam as diferentes OTUs. Os valores representados no eixo y são abundância de sequências para cada OTU.	51
Figura 13 – Análise de coordenadas principais (PCoA) das diferentes amostras do ambiente de mineração (drenagem ácida, água e sedimento da barragem de rejeitos) em diferentes períodos do ano. Os círculos cinza representam OTUs.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reação de PCR utilizada na amplificação das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA.	35
Tabela 2 – Reação de PCR utilizada para ligação de índice durante a construção de bibliotecas para sequenciamento na plataforma Illumina.	36
Tabela 3 – Características físico-químicas das amostras de água de drenagem ácida de mina nos períodos de abril de 2013 e julho 2014 e água superficial da barragem de rejeitos em abril 2013 (1M_ABR).	38
Tabela 4 – Análise química da amostra de sedimento de ácida de mina em julho 2014.	39
Tabela 5 – Índices de α -diversidade. Valores calculados para uma subamostragem de 25.000 sequências.	41
Tabela 6 – Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) pertencentes ao microbioma core de drenagem ácida de mina. As OTU's indicadas foram observadas em 100% das amostras desse estudo.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMD** – *Acid mine drainage* – Drenagem ácida de mina
- ANI** – *Average nucleotide identity* – Média da identidade de nucleotídeo
- BLAST** – *Basic Local Alignment Search Tool*
- BMP** – *Brazilian Microbiome Project*
- bp** – *basepair* – par de base
- CDS** – *Coding DNA sequence* – Sequência codificadora de DNA
- CRISPR** – *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* – Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas
- crRNA** – CRISPR RNA
- CTns** – *Conjugative transposons* – Transposons conjugativos
- FISH** – *Fluorescence in situ hybridization* - Hibridização in situ fluorescente
- GEBA** – *Genomic Encyclopaedia of Bacteria and Archaea* – Enciclopédia genômica de Bacteria e Archaea
- HGT** – *Horizontal gene transfer* – Transferência horizontal de gene
- Kb** – Kilobase
- Mb** – Megabase
- MDA** – *Multiple displacement amplification* - Amplificação por deslocamento múltiplo
- OTU** – *Operational taxonomic unit* – Unidade taxonômica operacional
- PCoA** – *Principal Coordinates Analysis* – Análise de coordenadas principais
- PCR** – *Polymerase reaction chain* – Reação em cadeia da polimerase
- PIB** – Produto interno bruto
- ppm** – parte por milhão
- RDP** – *Ribosomal Database Project*
- rRNA** – RNA ribossomal
- SAG** – *Single-amplified genomes* – Genoma de célula única
- SCG** – *Single Cell Genomics* – Genômica de Célula Única
- SRB** – *Sulphate reducing bacteria* – Bactéria redutora de sulfato
- SRP** – *Sulphate reducing prokaryote* – Procarioto redutor de sulfato

RESUMO

Drenagem ácida de mina (AMD) é caracterizada pelo escoamento ácido que tem origem da ação do intemperismo químico de rochas ricas em metais sulfetados, juntamente com o metabolismo quimiolitotrófico de microrganismos especializados que habitam essas rochas. Apesar de serem estudadas a muitas décadas, muito ainda é desconhecido sobre a dinâmica das comunidades microbianas das AMD, especialmente quando se diz respeito aos estágios iniciais de formação dessas drenagens, quando a acidez ainda é moderada. Neste contexto, essa tese foca na aplicação de técnicas de “OMICA” (metagenômica e genômica de célula única) para tentar resolver essa questão ainda em aberto. Em resumo, no primeiro capítulo foi utilizado o sequenciamento do gene 16S rRNA para descrever a microbiota de drenagem ácida no seu estágio inicial de formação. A AMD foi amostrada em dois períodos (abril 2013 e julho 2014) em uma mina de cobre no norte do Brasil. Nós observamos que a drenagem ácida é um ecossistema único dentro do ambiente de mineração. As elevadas concentrações de cobre obtidas no sedimento dessa AMD está provavelmente conduzindo a comunidade microbiana à uma baixa diversidade. Alguns microrganismos apresentaram alta abundância e persistência no ambiente ao longo do tempo, sendo então considerados parte da microbiota central (*core*) das amostras de AMD descritas aqui, entre estes estão: membros do domínio *Archaea*, membros do filo candidato TM7, *Acidithiobacillus*, Chitinophagaceae. A fim de compreender o papel de Chitinophagaceae nesse ambiente, o segundo capítulo dessa tese teve como objetivo analisar os genomas parciais de células únicas isoladas da mesma drenagem ácida descrita no capítulo anterior. As células recuperadas pertencem ao gênero *Hydrotalea*, estreitamente relacionado com a espécie *H. flava*. Algumas análises sugerem que os genomas de célula única obtidos formam dois clados que são representados por diferentes linhagens. Estas células têm o potencial genômico para desnitrificação, resistência à cobre e outros metais. Também foi observado nesses genomas, dois sistemas CRISPR-cas coexistentes. Estes sistemas são conhecidos como imunidade adaptativa herdável dos procariotos. Nós observamos uma heterogeneidade populacional considerando o repertório de CRISPR dessas células. Nossos resultados sugerem que a população de *Hydrotalea* sp. estudada aqui está se ajustando rapidamente à pressão seletiva, em escala de micro-habitat, exercida pela predação de fagos.

ABSTRACT

Acid mine drainage (AMD) is characterized by an acid runoff originated by chemical weathering of metal sulfide-rich rocks together with the chemolithotroph metabolism of some specialized microorganisms inhabiting these minerals. Despite having been studied for many decades, much remains unknown about the microbial community dynamics in AMD sites, especially their composition during their early development, when the acidity is moderate. In this context, this thesis is focused on the application of “OMICs” tools (metagenomics and single cell genomics) to try to solve this issue. In summary, in the first chapter we used the sequencing of 16S rRNA gene to describe the microbiota of AMD in their early stages of formation. The AMD was sampled in two periods (april 2013 and july 2014) from a copper mine in north of Brazil. We observed that acid mine drainage is a unique ecosystem into the mine environment. The high concentration of copper in the sediment of this AMD is probably driving the microbial community to a low diversity. Some microorganisms exhibited a high abundance and persistence in the environment over the time, being part of the core microbiome of AMD samples described here: members of Archaea, candidate division TM7, *Acidithiobacillus* and Chitinophagaceae. Furthermore, to understand the role of Chitinophagaceae in this environment, the second chapter of this thesis aimed to analyze the draft genome assemblies from single cells that were retrieved from the same AMD described above. These cells belong to the genus *Hydrothalea*, and is closely related to *H. flava*. Some analysis suggests that all single-amplified genomes (SAGs) obtained formed two clades that may represent different strains. These cells have the genomic potential for denitrification, copper and other metal resistance. We recovered two co-existing CRISPR-cas systems across SAGs. This system is known as an adaptive and heritable immunity encoded by prokaryotes. We observed heterogeneity in the population regarding their CRISPR repertoire. Our results suggest that the *Hydrothalea* sp. population studied here is adjusting to a quickly changing selective pressure at the microhabitat scale, and a very likely form of this selective pressure is phage predation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Indústria da Mineração

A mineração é um dos setores básicos da economia do Brasil, desde o período colonial. Em 2014, a produção mineral brasileira atingiu US\$ 80,2 bilhões o que correspondeu a 4% do produto interno bruto (PIB) (DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL, 2015). Impulsionado pelo aumento da produção de minério de ferro, a mineração foi o único segmento industrial que apresentou expansão em 2014 (DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL, 2015). Além da indústria de extração, as indústrias de transformação desses minerais também são responsáveis por movimentar um grande volume de capital para economia nacional. O subsolo brasileiro representa um importante depósito de mineral, sendo que os estados do Pará e Minas Gerais se destacam pela presença de inúmeras reservas (IBRAM, 2015). O Brasil também tem importante participação no cenário mundial de produção de alguns minerais, podendo citar nióbio, ferro, alumínio, amianto, grafita natural entre outros (DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL, 2015).

O cobre é um dos metais de maior importância para a indústria moderna. Devido ao fato de ser maleável, reciclável, resistente à corrosão e a altas temperaturas, o cobre é empregado na geração e na transmissão de energia, em fiações, nas construções civis e em praticamente todos equipamentos eletrônicos. Segundo uma estimativa realizada em 2014 (DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL, 2015) as reservas lavráveis brasileiras de cobre eram de 10,84 milhões de toneladas, contando principalmente com as formas sulfetadas desse mineral. Além disso, o Brasil ocupa uma posição considerável no ranking de produção mundial do cobre. Atualmente no Brasil o cobre é extraído apenas através dos processos da mineração tradicional.

As práticas de mineração tradicional consistem de perfuração, explosão, escavação e transporte de rochas para a superfície. Seguido pela moagem em partículas menores, e tratamentos químicos com o intuito de recuperar metais de interesse. Entretanto, os metais representam apenas cerca de 1% do material escavado, o que significa que a energia gasta na britagem e moagem é desperdiçada com 99% de materiais sem valor comercial (JOHNSON, 2015). Além disso, um agravante crítico para a mineração tradicional é a maneira indiscriminada como os rejeitos de mineração são liberados no ambiente. Em resumo, a mineração tradicional é um processo pouco eficiente, custoso e que gera grande impacto ambiental. É nesse contexto que processos biotecnológicos que utilizam microrganismos para aumentar a eficiência de extração e recuperação de metais a partir de minerais, vem sendo uma alternativa estratégica para a indústria da mineração.

1.2. Biomineração

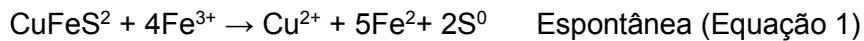
Os procariotos são as formas celulares mais diversas e abundantes na Terra, estima-se teoricamente que existam $4-6 \times 10^{30}$ (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998) ocupando cada possível nicho metabólico e compondo dois dos três domínios da “árvore da vida”, *Bacteria* e *Archaea* (HUG et al., 2016). São seres ubíquos e essenciais para a função e manutenção dos ecossistemas. Muito já foi discutido sobre o papel que exercem no ambiente. Segundo Pomeroy *et al.*, (2007) os microrganismos representam uma grande fração da biomassa em ambientes aquáticos e quando ativos têm altas taxas metabólicas, assim são os responsáveis por dominar o fluxo de energia no planeta. Sabe-se que microrganismos possuem uma estreita relação com os minerais e metais, podendo modificar as características físico-químicas desses elementos e em contrapartida, têm a sua atividade, crescimento e sobrevivência modelada por eles (GADD, 2010). As interações metal-mineral-microrganismos são de importância fundamental para a Geomicrobiologia. Entende-se por Geomicrobiologia a função dos microrganismos nos processos geológicos (COCKELL, 2010). Entre esses processos destacam-se os ciclos biogeoquímicos de elementos, formação de minerais, deterioração mineral (processos que conduzem a formação do solo e sedimento), e as transformações químicas de metais e metaloides. Devido à ação dos microrganismos na deposição e solubilização de metais estes têm sido empregados em processos de biomineração.

A biomineração é compreendida pelo uso de microrganismos para recuperar metais a partir de minerais, em escala industrial. Esse processo biotecnológico é indicado, sobretudo, para o tratamento de minério de baixo teor de metais, resíduos de mineração e matrizes minerais complexas (VALENZUELA et al., 2006). O termo biomineração é usado de maneira generalizada para os processos de biolixiviação e bio-oxidação. A biolixiviação é a conversão de um metal insolúvel (geralmente oriundo de um mineral sulfetado, como por exemplo a calcopirita) para uma forma solúvel. Quando isto acontece, o metal é liberado na forma aquosa. Já o termo bio-oxidação é geralmente utilizado para se referir a processos em que a recuperação de um metal é reforçada pela decomposição microbiana do mineral, neste caso o metal de interesse permanece enriquecido na fase sólida (RAWLINGS, 2002).

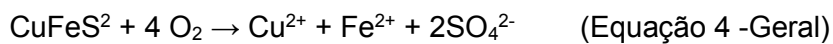
Os microrganismos biomineradores tem características fisiológicas bem definidas. Eles são quimiolitotróficos, isso é, são capazes de utilizar compostos inorgânicos reduzidos como fonte de energia. Os biomineradores utilizam o ferro ferroso (Fe^{2+}) ou fontes de enxofre inorgânico reduzido (ou ambos) como doadores de elétrons. Uma vez que o subproduto da oxidação do enxofre é a formação de ácido sulfúrico, estes organismos também precisam ser acidófilos e crescerem dentro de uma faixa de pH 1-4 (RAWLINGS, 2002). A maioria dos microrganismos biomineradores fazem a fixação do CO_2 . Outra importante característica

desses organismos é a resistência aos metais. Todas essas propriedades comuns aos microrganismos biomineradores explicam como o processo de biolixiviação ocorre quando uma pilha de minério contendo ferro e enxofre é irrigada e aerada. O ar provê a fonte de carbono (CO₂) e o aceptor final de elétrons (O₂), o minério fornece o doador de elétrons (Fe²⁺ e/ou enxofre inorgânico reduzido), e a água é o meio para o crescimento desses microrganismos (RAWLINGS, 2002). O Fe³⁺ originado da oxidação microbiana espontaneamente oxida o minério. O ácido sulfúrico produzido ajuda a corroer o mineral e fazer com que o metal de interesse seja liberado. As reações que compreendem de maneira generalizada a biolixiviação estão descritas abaixo e esquematizadas na Figura 1.

Biolixiviação da calcopirita (HAQ; ULLAH, 2012):



O ferro ferroso (Fe²⁺) gerado nessa reação (equação 1) é rapidamente oxidado por procariotos oxidadores de ferro (equação 2), e mais Fe³⁺ é liberado no meio para que a oxidação espontânea da calcopirita ocorra (equação 1).



Já os procariotos oxidadores de enxofre realizam a redução do SO (equação 3) que facilitará a produção do ácido sulfúrico.

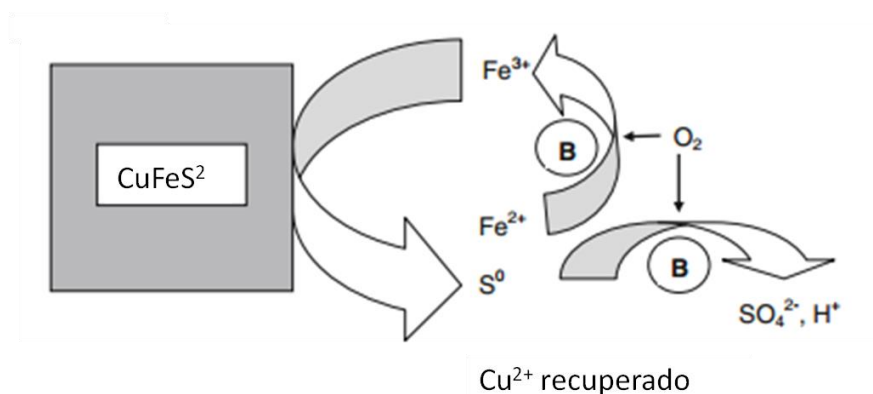


Figura 1 – Processo de oxidação do metal sulfetado calcopirita pela ação de microrganismos oxidadores de ferro e enxofre. B representam as etapas em que as conversões são realizadas por microrganismos. Adaptada de JOHNSON, 2013

Os microrganismos atuantes nos processos de biomineração formam um consórcio heterogêneo, mas muito especializado. A maioria deles pertence aos domínios *Bacteria* e *Archaea*, porém eucariotos unicelulares já foram reportados. Entre os microrganismos mais conhecidos nesses sistemas estão: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *At. thiooxidans*, *At. caldus*, *Acidimicrobium ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *L. ferriphilum*, *Ferrimicrobium acidophilum*, *Acidiphilium acidophilum*, *Thiomonas cuprina*, *Sulfobacillus sp.*, *Alicyclobacillus sp.*, *Sulfolobus sp.*, *Ferroplasma sp.* e *Acidiplasma sp.* (BAKER; BANFIELD, 2003; JOHNSON; KANAO; HEDRICH, 2012; VALENZUELA et al., 2006).

As vias microbianas de oxidação do ferro ainda não foram todas bem elucidadas para os diferentes microrganismos oxidadores de ferro. Especula-se que os mecanismos são diferentes entre microrganismos neutrófilos e acidófilos e até mesmo entre cada um desses grupos. Esses mecanismos foram recentemente revisados por Bonnefoy e Holmes (2012). O modelo da bactéria acidófila oxidadora de ferro mais bem conhecida, a *At. Ferrooxidans*, sugere que há a transferência de elétrons do ferro ferroso via citocromo c e rusticianina A, através do periplasma, para a citocromo aa₃-oxidase na membrana celular interna. Assim, os elétrons são usados para a redução do oxigênio para água (VALDÉS et al., 2008), como ilustrado na Figura 2.

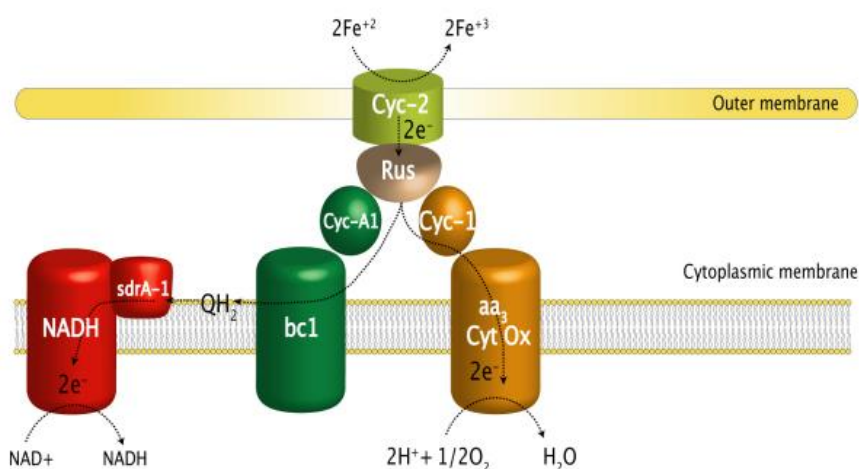


Figura 2 – Representação esquemática de enzimas e proteínas transportadoras de elétrons envolvidas na oxidação do ferro ferroso. Fonte: VALDÉS et al., 2008

Muitas espécies microbianas são tolerantes a elevadas concentrações de metais, pois uma variedade de mecanismos contribui para sua resistência. Esses mecanismos incluem transformações tipo redox, síntese de proteínas e peptídeos que se ligam aos metais, precipitação orgânica ou inorgânica, transporte ativo, efluxo e compartimentalização intracelular ou a adsorção dos metais à superfície celular (biosorção), através da parede celular e outros componentes estruturais (GADD, 2004).

Há um importante debate no meio acadêmico se existe alguma vantagem na importação de consórcio ativo de microrganismos biomineradores sobre a seleção de um consórcio local (RAWLINGS; JOHNSON, 2007). Ainda não há um consenso sobre o assunto mas, sabe-se que a introdução de organismos exógenos em um ambiente pode ocasionar desequilíbrio ecológico. Sendo assim, conhecer a microbiota local dos ambientes de mineração é de grande importância para identificar possíveis microrganismos biomineradores, já que sabe-se que esses microrganismos quimilitotróficos e acidófilos são geralmente abundantes em depósitos de minério (JOHNSON, 2013).

1.3. Drenagem Ácida de Mina

Como descrito anteriormente a oxidação de ferro e enxofre em minerais sulfetados é espontânea e decorrente do metabolismo de microrganismos quimiolitotróficos especializados. Aliado ao intemperismo químico, esses processos podem levar à formação de drenagem ácida de mina (AMD – *acid mine drainage*), que é caracterizada por um escoamento ácido oriundo dos depósitos de minerais sulfetados. Apesar de ser um fenômeno natural do solo, que tem em sua composição esses minerais, se não for devidamente controlada, pode causar efeitos adversos para a qualidade das águas subterrâneas e superficiais através da sua acidificação, das altas concentrações de ferro, sulfato, e níveis elevados de metais tóxicos solúveis (ex. cobre e zinco, dependendo da natureza geoquímica do minério) (JACOBS; VANCE, 2014).

As áreas das minas, na maioria das vezes, são cercadas por pilhas e/ou barragens que contêm minério descartado, material pulverizado ou resíduos do processo de beneficiamento. Esses materiais são conhecidos como rejeitos de mineração (Figura 3). Os rejeitos de mineração, que são gerados pelas técnicas de mineração tradicional, representam importantes fontes de drenagem ácida de mina. A formação da AMD é uma sequência de processos biogeoquímicos e de dissolução mineral. Segundo Dold (2014), pode ser classificada em três passos principais que ocorrem durante a exploração mineral: (1) Durante a fase operacional, há um aumento da área de superfície de minério sulfetados expostas ao ar e à água. A água que escoar do rejeito nesse momento normalmente varia de alcalina para neutra. Um problema ambiental já associado é a presença de altas concentrações de sulfato; (2) Uma vez que as operações relacionadas à mineração naquela área cessam e o rejeito permanece armazenado, a oxidação do sulfeto tem início resultando em uma zona ácida de oxidação; (3) O escoamento de um lixiviado ácido (pH podendo atingir 1) e com metais tóxicos a partir do rejeito é a fase final da evolução de sistemas de drenagem ácida. A formação de sais com múltiplas colorações é um sinal visual desse estágio. Essa etapa pode ser atingida até mesmo muitos anos depois que a mina finalizar suas operações (DOLD, 2014).



Figura 3 – Rejeitos da Mina de Sossego - Carajás PA. A) Barragem de rejeitos do processo de flotação, rejeito gerado após o beneficiamento do minério. B) Pilhas de minérios descartados pela operação de lavra antes do beneficiamento.

O consórcio de microrganismos que catalisam as reações de biomineração são os maiores contribuintes para a geração de AMD, sendo então esses ambientes bons locais para estudar essa comunidade microbiana. A diversidade e habilidades metabólicas da microbiota de drenagem ácida de mina já foram extensamente revisados (BAKER; BANFIELD, 2003; BONNEFOY; HOLMES, 2012; RAWLINGS; JOHNSON, 2007). Os fatores ambientais primários que moldam a microbiota associadas à AMD são pH, temperatura, concentração de metais e outros solutos, carbono e oxigênio dissolvido. Esses fatores, principalmente o pH, são responsáveis por direcionar a diversidade entre diferentes locais com AMD (beta-diversidade). Essas comunidades se caracterizam principalmente por uma baixa riqueza de espécies e pelo predomínio de microrganismos acidofílicos bem adaptados às condições ambientais extremas (BAKER; BANFIELD, 2003; MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015). Entretanto, alguns aspectos sobre a ecologia desses ambientes ainda permanecem desconhecidos: (1) a estrutura e composição da comunidade microbiana durante o processo de formação e manutenção das drenagens ácidas (HUANG; KUANG; SHU, 2016; MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015); (2) adaptação de organismos heterotróficos previamente reportados em AMD (KUANG et al., 2013; PEREIRA; VICENTINI; OTTOBONI, 2014), e como eles influenciam a microbiota quimiolitotrófica em condições extremas. Uma alternativa para responder essas questões é o sequenciamento massivo da comunidade microbiana em drenagem ácida de mina durante seus estágios de formação.

1.3.1. Biorremediação de AMD

Em ambientes industriais a AMD é geralmente controlada pela neutralização de águas residuais utilizando calcário, esse tratamento eleva o pH da água e precipita metais em hidróxidos e carbonatos. Além de ser um tratamento químico e que demanda um certo custo, a taxa de dissolução do calcário é baixa e ele pode formar uma camada impermeável de hidróxido de metal que impede a eficiência do processo (HAMMARSTROM; SIBRELL; BELKIN, 2003). Em contraste a esta abordagem química para remediar águas ácidas, os tratamentos biológicos têm representado importante alternativa.

A biorremediação é um processo biotecnológico que utiliza principalmente microrganismos para descontaminar solos e águas. A restauração dos ambientes pode ser realizada por esses organismos via oxidação, redução, volatilização, imobilização, ligação e outras transformações dos contaminantes (LOVLEY, 2003). Há um crescente interesse na utilização de microrganismos para biorremediar ambientes devido à simplicidade, barato custo e principalmente por ser uma alternativa "ecologicamente mais correta". A redução biológica de sulfato por microrganismos procaríotos proporciona uma abordagem de biorremediação para AMD pois somente processos de redução estão disponíveis para eliminar o sulfato liberado (equação 4) nas águas decorrentes da mineração, devido ao fato de que o sulfato é a forma mais oxidada de enxofre. Além disso esse composto é tóxico, tem forte odor e é corrosivo (KLEIN et al., 2014; MUYZER; STAMS, 2008) (Figura 4).

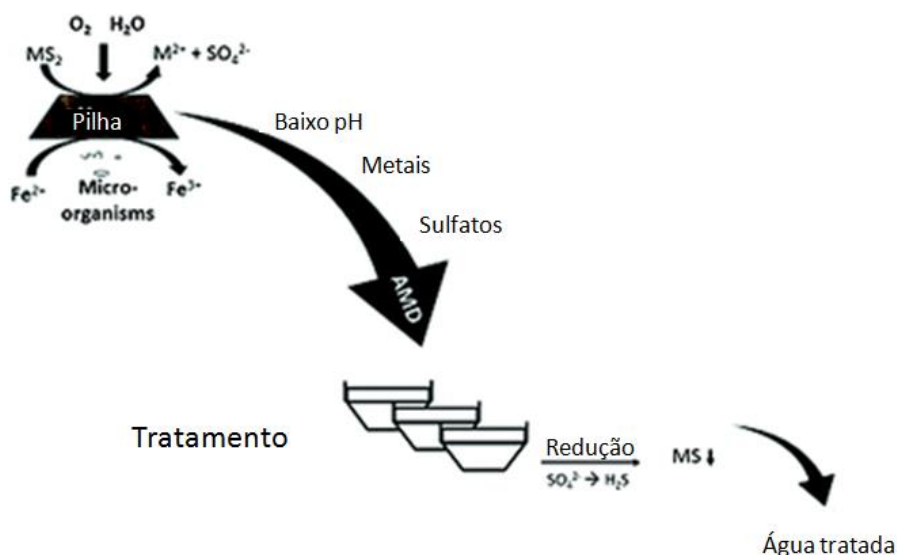
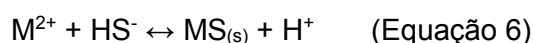
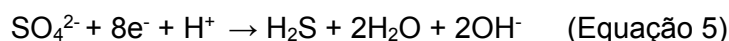


Figura 4 – Esquema representativo do processo de biorremediação de AMD utilizando microrganismos redutores de sulfato. Adaptada de KLEIN et al., 2014.

Essencialmente, esse processo utiliza microrganismos que suprem sua demanda

energética a partir de reações redox, onde o sulfato serve comoceptor final de elétrons. Dessa maneira o sulfato é eliminado das águas residuais da mineração. Além disso, este processo também consome prótons, produzindo alcalinidade e sulfeto de hidrogênio (H₂S ou HS) (equação 5), o que conduz à neutralização do pH ácido. Uma outra vantagem desse processo é a precipitação de metais pesados. Esta aplicação tira proveito das diferenças nas propriedades químicas dos metais. Os metais sulfatados (cádmio, cobalto, cobre, ferro, níquel e zinco) são altamente solúveis, mas os correspondentes sulfetados têm baixa solubilidade. Assim, por redução de sulfato, os metais podem ser precipitados, recuperados e reutilizados (equação 6).

O processo de biorremediação usando microrganismos redutores de sulfato pode ser representado pelas seguintes equações:



*M= metal; MS= sulfeto metálico

Um fator que pode impedir a utilização dos procaríotos redutores de sulfato (SRPs) para remediação de AMD é a sensibilidade que esses microrganismos já demonstraram ao baixo pH. Jong e Parry (2006), observaram que à medida que o pH vai se tornando ácido (abaixo de 3,5) as taxas de redução de sulfato caem progressivamente, porém estes microrganismos permanecem viáveis. Entretanto, em estudo recente, Sánchez-Andrea e colaboradores (2015) isolaram uma nova linhagem de bactérias redutoras de sulfato (SRB) em sedimentos ácidos, a *Desulfosporosinus acididurans* que foi a primeira SRB acidofílica isolada, e a terceira espécie descrita, além de *Desulfosporosinus acidiphilus* e *Thermodesulfobium narugense*.

No Brasil ainda há poucos estudos focados na ecologia e fisiologia microbiana de ambientes de mineração (BERGAMO et al., 2004; PAULINO et al., 2001; PEREIRA; VICENTINI; OTTOBONI, 2014). Assim, o estudo das comunidades microbiana destes ambientes, faz-se necessário para que seu potencial para a biomineração e biorremediação possa ser plenamente entendido e utilizado. Nesse contexto, os estudos genômicos e metagenômicos desempenham um papel importante para o desenvolvimento de inovações biotecnológicas na indústria de mineração.

1.4. Estudos Genômicos e Metagenômicos

Conhecer a comunidade microbiana dos diferentes ambientes e seu papel nos ecossistemas sempre foi um desafio para os microbiologistas. A limitação destes estudos no

passado foi principalmente devido às metodologias usadas. Inicialmente apenas métodos baseados no cultivo e isolamento de microrganismos eram disponíveis. Esses estudos de microbiologia clássica forneceram indispensável conhecimento sobre a fisiologia de organismos específicos. Entretanto, a grande maioria dos microrganismos ainda não foram obtidos em cultura pura e apenas recentemente tomou-se conhecimento da sua presença nos ambientes. Dessa maneira a real composição e diversidade da comunidade microbiana dos diversos ecossistemas eram subestimadas. No final da década de 80, com a descrição da técnica de PCR (MULLIS; FALOONA, 1987) e com os demais avanços na biologia molecular, os estudos da comunidade microbiana ganharam um impulso.

A Genômica é uma das áreas que experimentaram maior avanço nas duas últimas décadas. Em 1995, os dois primeiros genomas de bactérias foram sequenciados, as patogênicas: *Haemophilus influenzae* (FLEISCHMANN et al., 1995) e *Mycoplasma genitalium* (FRASER et al., 1995). Em 2006, Binnewies e colaboradores publicaram uma revisão sobre o impacto de uma década dos estudos genômicos em bactérias e o principal ponto discutido pelos autores foi de que a diversidade genética dos microrganismos é muito maior do que se imaginava. Dentro dessa uma década muito conhecimento sobre a estrutura do genoma foi adquirido: *operons*, duplicação de genes, conservação da ordem dos genes, elementos genéticos móveis, vias metabólicas, ilhas genômicas, ilhas de patogenicidade, transferência horizontal de genes. Porém, todo esse conhecimento era acerca de bactérias com importância médica. Poucos estudos focaram em genomas de microrganismos ambientais. Foi nesse contexto, em que a necessidade de entender de maneira mais ampla os ecossistemas culminou com o desenvolvimento de plataformas de sequenciamento de nova geração e diminuição dos custos de geração de dados, que uma nova vertente nos estudos genômicos tomou a frente, a metagenômica.

A metagenômica tem como princípio responder a duas questões: Quais os microrganismos estão no ambiente? E, qual a função eles estão desempenhando? A sua definição básica é a análise, independente de cultivo, do genoma de todos os organismos presentes em um ambiente particular. Os estudos de metagenômica têm como primeira etapa a extração de DNA total da comunidade microbiana de um ou mais ambientes, posteriormente podem seguir duas estratégias metodológicas. A primeira, baseia-se na amplificação por PCR de um gene de interesse (por exemplo, o gene 16S rRNA de procariotos) e posterior sequenciamento dos produtos de amplificação, proporcionando uma análise das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e de sua variabilidade dentro de uma determinada comunidade (Figura 5A). Para a estratégia de análise de gene marcador, foi sugerido recentemente o uso do termo Microbiota (MARCHESI; RAVEL, 2015). A segunda abordagem é resultado do sequenciamento *shotgun*, o DNA metagenômico total é sequenciado, possibilitando a caracterização taxonômica e funcional da comunidade (Figura 5B) (GILBERT;

DUPONT, 2011). Através dos estudos metagenômicos *shotgun* podem-se identificar genes comuns ou específicos do ambiente, genomas favorecidos na comunidade, novos genes, novas moléculas, e entender questões ecológicas e evolutivas (SIMON; DANIEL, 2011). Hoje, existem mais de 20.000 projetos de metagenômica publicamente disponíveis e muitos *terabytes* de dados de sequenciamento já foram produzidos. A vasta gama de ambientes estudados inclui água oceânica, água doce, solo de diferentes tipos sob diferentes condições, interação microrganismos-planta, microbioma de inúmeros animais e grandes projetos envolvendo o microbioma humano (LAND et al., 2015).

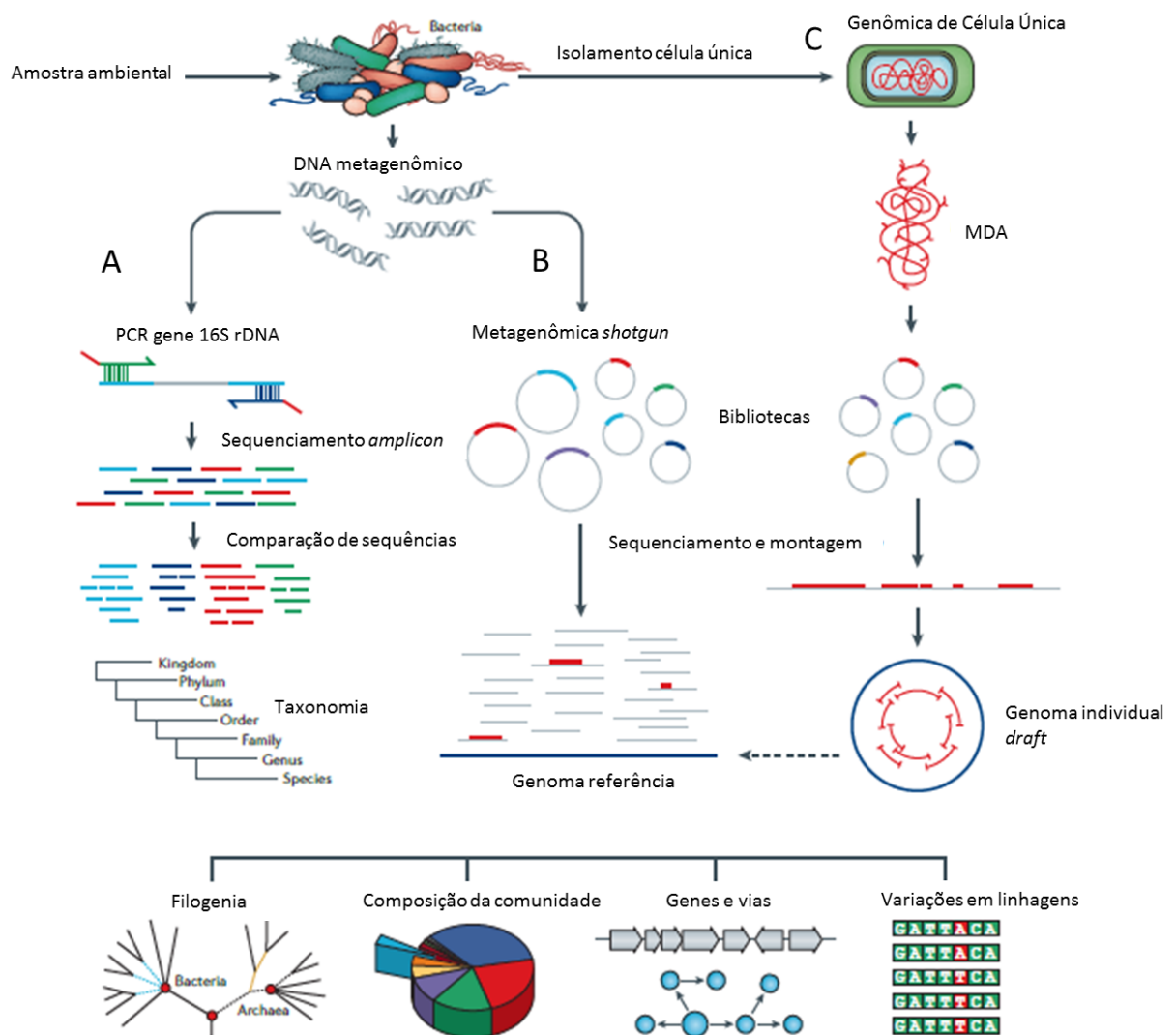


Figura 5 – Diferentes abordagens genômicas e metagenômicas para estudo das comunidades microbianas. A- Sequenciamento do gene 16S rRNA. B- Metagenômica *shotgun*. C- Genômica de célula única (*Single Cell Genomics*). Adaptado de LASKEN; MCLEAN, 2014.

Com o crescente número de ambientes profundamente sequenciados usando metodologias de nova geração, a diversidade estimada para *Bacteria* e *Archaea* continua aumentando, com um número predito para milhões de espécies. De acordo com filogenia

baseada no gene 16S rRNA, essas espécies estão distribuídas em 60 táxons (filos e divisões) dos domínios *Bacteria* e *Archaea*, sendo que metade deles não possuem representantes cultiváveis (filos candidatos) (HUGENHOLTZ; KYRPIDES, 2009). Os isolados microbianos são uma representatividade muito enviesada desse número de espécies, já que 88% deles pertencem à quatro filos bacterianos, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes (RINKE et al., 2013). Os genomas depositados nos bancos de dados ainda refletem esse viés do cultivo, mesmo com todos os dados metagenômicos disponíveis. Recentemente, o projeto GEBA (*Genomic Encyclopaedia of Bacteria and Archaea*) tenta maximizar a cobertura da diversidade representada pelos isolados microbianos através do sequenciamento dos seus genomas (WU et al., 2009). Porém, os filos candidatos não são explorados nesse projeto, e têm sido referidos como a matéria escura microbiana (*microbial dark matter*).

Os dados metagenômicos já possibilitaram a recuperação de genomas *drafts* e até mesmo completos de organismos pertencentes a esses filos candidatos (ALBERTSEN et al., 2013). Entretanto, essa metodologia se limita pela possibilidade de montar inequivocamente organismos quiméricos (BROWN, 2015), especialmente à medida que a complexidade e diversidade da comunidade microbiana aumenta. Além disso, inferências sobre a diversidade intrapopulacional de linhagens de microrganismos em determinado ambiente não podem ser feitas. Nesse contexto, estudos vem sendo realizados afim de criar novas metodologias que superam essas limitações.

O método da amplificação por deslocamento múltiplo (MDA) (DEAN et al., 2002) permite a amplificação de um único genoma bacteriano por mais de 1 bilhão de vezes (RAGHUNATHAN et al., 2005), o que facilita a amplificação do DNA de uma célula única e evita a necessidade de cultivo para o sequenciamento do genoma de um organismo. Essa metodologia acoplada à triagem celular (*sorting*) realizada por citometria de fluxo, permite que uma célula única seja separada de uma amostra ambiental, tenha seu DNA amplificado e esteja pronta para ser sequenciada. Juntos, a MDA, o *sorting*, o sequenciamento de nova geração e a bioinformática podem render genomas bacterianos parciais de alta qualidade. Essa metodologia é conhecida como Genômica de Célula Única (*Single Cell Genomics- SCG*) (Figura 5C) e em 2013 foi considerada a metodologia do ano (LASKEN; MCLEAN, 2014).

Como o sequenciamento de célula única não exige o cultivo prévio, este método tem o potencial para contribuir com muitos genomas da matéria escura microbiana. Rinke e colaboradores (2013), realizaram o primeiro grande estudo utilizando esse método em nove diferentes ambientes (incluindo água doce, oceânica, sedimentos, bioreatores) e conseguiram identificar membros de 29 novos filos candidatos, além disso identificaram inesperadas características metabólicas (RINKE et al., 2013). A genômica de célula única, pode também fortalecer significativamente os estudos de pangenoma, revelando variações intraespecíficas,

diversidade no *pool* genético e genes essenciais (LASKEN, 2012; LASKEN; MCLEAN, 2014). As análises desses genomas, podem fornecer evidências sobre a evolução das comunidades microbianas (MARTIJN et al., 2015).

1.4.1. Sistemas CRISPR-Cas

O Sistema CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated protein), ou seja, Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas- Proteínas associadas à CRISPR, é considerado o mecanismo de imunidade adaptativa dos procaríotos, que age protegendo as células contra invasão de elementos genéticos exógenos. O arranjo do CRISPR é composto por pequenas regiões repetidas intercaladas por espaçadores (Figura 6). Esses espaçadores são pedaços de DNA que primariamente derivaram de vírus, plasmídeos e/ou *transposons* (MAKAROVA et al., 2011; RATH et al., 2015). Dessa maneira, os espaçadores representam registros cronológicos dos elementos que infectaram as células procaríotas ou seus ancestrais. A análise comparativa de regiões genômicas contendo *locus* CRISPR-Cas permite a avaliação da dinâmica de adaptação bacteriana bem como provê informações sobre a história das suas populações (KARAH et al., 2015; SOLA, 2015). Entretanto, conhecer a estrutura e os tipos desses sistemas é essencial para realizar qualquer inferência.

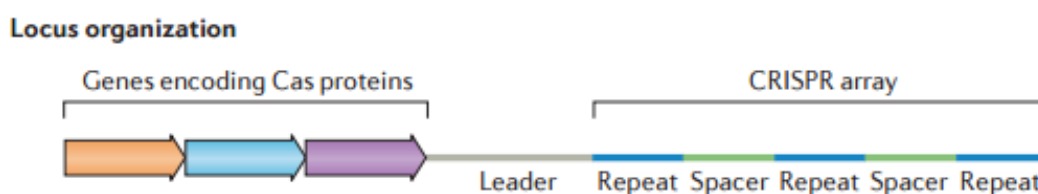


Figura 6 – Organização de um *locus* CRISPR–Cas típico de genomas de arqueias e bactérias. Fonte: (AMITAI; SOREK, 2016).

O *locus* CRISPR-cas é formado pelo arranjo CRISPR com as repetições e os espaçadores, genes codificadores de proteínas Cas e região líder (Figura 6). O tamanho e número de sequências espaçadoras e repetições variam entre CRISPR no mesmo e em diferentes genomas. As repetições têm entre 21-48bp e os espaçadores entre 26-72bp. O número de espaçadores dentro de um *locus* pode variar de poucos a centenas (RATH et al., 2015). Os genomas podem ter um ou múltiplos CRISPR *loci*, podendo co-existir no mesmo genoma diferentes tipos. As proteínas Cas são codificadas em *operons* adjacentes ao arranjo CRISPR, elas contêm domínios relacionados à nucleases, helicases, polimerases e ligação ao RNA e têm função essencial nos três estágios do processo de imunidade adaptativa (MAKAROVA et al., 2011), que serão discutidos a seguir. Outra característica associada aos

CRISPR *loci* é a presença de uma região conservada, denominada líder, localizada imediatamente ao lado do arranjo CRISPR que contém um promotor e indica a direção do sentido da transcrição (RATH et al., 2015). Dessa maneira o arranjo tem a ponta proximal (*leader-end*) e distal ao líder (*trailer-end*). Novos espaçadores são incorporados na ponta *leader-end* do arranjo, que é a primeira região a ser transcrita, enquanto os espaçadores mais antigos permanecem na ponta *trailer-end* (AMITAI; SOREK, 2016).

De maneira geral, o processo de defesa nos procariontos, mediado por CRISPR-Cas pode ser dividido em três estágios (RATH et al., 2015). O primeiro, conhecido como adaptação, diz respeito à incorporação de novos espaçadores no arranjo CRISPR. É nessa etapa que se envolvem as proteínas Cas1 e Cas2 que são universais para os diferentes tipos de CRISPR-Cas. No segundo estágio, a expressão, o sistema se ativa pela expressão dos genes *cas* e pela transcrição do arranjo CRISPR em um longo RNA precursor CRISPR (pre-crRNA). O pre-crRNA é processado, com auxílio das Cas e fatores acessórios, em crRNA maduros. A interferência é o último estágio, em que ácidos nucleicos exógenos (que tem complementariedade com os crRNAs) são reconhecidos e clivados, novamente pela ação das proteínas Cas (RATH et al., 2015).

A divisão dos sistemas CRISPR-Cas em diferentes tipos foi proposta por Makarova e colaboradores (2011) e recentemente atualizada em (MAKAROVA et al., 2015; WRIGHT; NUÑEZ; DOUDNA, 2016). Atualmente, têm-se três tipos bem descritos (CRISPR-Cas Tipo I-III) além de outros três recentemente identificados (Tipo IV-VI) e arquiteturas que não puderam ser classificadas. Cada tipo tem várias subdivisões dentro deles, sendo que existem proteínas Cas que são consideradas assinatura do grupo. Por exemplo, *cas9* codifica uma proteína com múltiplos domínios que combina funções da fase de adaptação com a formação do complexo crRNA-DNA alvo levando a sua clivagem. Essa proteína é considerada assinatura do CRISPR-Cas Tipo II (MAKAROVA et al., 2015).

De acordo com Sun e colaboradores (2016), o repertório de espaçadores, dos arranjos CRISPR, de indivíduos co-existentes podem ser comparados, garantido informações acerca da evolução recente desses organismos e populações. Por exemplo, sequências conservadas de espaçadores bem como conservação da ordem em que esses espaçadores são encontrados no arranjo CRISPR, podem indicar origem e derivação de uma população ancestral comum (TYSON; BANFIELD, 2008) ou transferência horizontal desse *locus*. Além disso, distinção entre *loci* de indivíduos clonais podem sugerir ação de forças de pressão seletivas no ambiente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Esse trabalho tem como objetivo conhecer a composição e diversidade genética de comunidades microbianas em drenagem ácida de mina nos estágios iniciais de formação.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Determinar o perfil taxonômico da comunidade microbiana presente em drenagem ácida de mina em formação, através do sequenciamento de *amplicons* do gene 16S rRNA;
- ✓ Identificar microrganismos com o potencial biotecnológico para a os processos de biomineração e biorremediação;
- ✓ Reconstruir genomas parciais de microrganismos de drenagem ácida de mina através de *Single Cell Genomics*;
- ✓ Compreender o papel ecológico de células únicas isoladas de drenagem ácida de mina em formação através de *Single Cell Genomics*;

3. CONTEXTUALIZAÇÃO E ESTRUTURAÇÃO DA TESE

A tese de doutorado descrita aqui é parte de um projeto maior intitulado “Genômica para soluções e inovações biotecnológicas”, coordenado pelo Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira sendo uma parceria entre a empresa Vale e o Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ/MG. O objetivo principal desse projeto é estudar as comunidades microbianas de ambientes de mineração usando ferramentas de genômica, buscando microrganismos e/ou enzimas com potencial biotecnológico. As minas estudadas nesse projeto foram Mina de Salobo e Sossego, localizadas no complexo minerário de Carajás, no Estado do Pará, sendo estas as principais produtoras de cobre do país de propriedade da empresa Vale S.A.

Durante o projeto foram realizadas coletas nos meses de Outubro 2012, Abril 2013, Dezembro 2013, Julho 2014, Julho 2015, Abril 2016 em ambas as minas. Foram coletados água e sedimento de diversos pontos: Barragem de rejeito de Sossego, lagoa que recebe rejeitos da mineração da calcopirita a mais de 10 anos e que se estima já foram despejados nessa barragem aproximadamente 90 milhões de toneladas de rejeito; Drenagem ácida de mina em diferentes pontos; Espuma de flotação; Cavas e pilhas. O presente trabalho tem como objeto de estudo apenas as amostras de drenagem ácida de mina (mina de Sossego). Porém, a fim de comparar a comunidade microbiana de AMD com alguns outros ambientes de mineração serão utilizados dados também produzidos no projeto amplo e que foram o foco da tese de doutorado em Bioinformática da aluna Laura Rabelo Leite. É importante considerar que eu participei da grande maioria das coletas e fui a responsável pelos experimentos de biologia molecular (extrações de DNA e construções de bibliotecas para sequenciamento de 16S rDNA), além das análises de dados que serão discutidas a seguir.

Os resultados obtidos nesse trabalho estão estruturados em dois capítulos. O primeiro capítulo intitulado “**Caracterização taxonômica da comunidade microbiana em drenagem ácida de mina**” é um artigo em processo de preparação, que retrata a composição e estrutura das comunidades microbianas em estágios iniciais de AMD através do sequenciamento do gene 16S rRNA. O segundo capítulo intitulado “***Single cell sequencing unveils the lifestyle and CRISPR-based population history of *Hydrotalea* sp. in acid mine drainage***” é um manuscrito aceito para publicação na revista *Molecular Ecology*. Esse manuscrito trata-se de uma análise comparativa do genoma de seis células únicas obtidas de amostras de drenagem ácida de mina. Na seção de anexos também estão manuscritos já publicados de minha autoria e colaboração que estão relacionados com o presente trabalho. ANEXO I – “***Draft Genome Sequence of *Hydrotalea flava* Strain CCUG 51397^T***”. Esse artigo descreve o genoma de *Hydrotalea flava*, usado como referência para as análises dos genomas de células únicas descritos no Capítulo 2. ANEXO II- “***Taxonomic and functional diversity of microbial community from a mining environment***”. Esse *meeting abstract* discute brevemente a

comunidade microbiana de drenagem ácida e barragem de rejeitos da mina de Sossego. ANEXO III- ***“Draft genome sequence of “Acidibacillus ferrooxidans” ITV01, a novel acidophilic firmicute isolated from a chalcopyrite mine drainage site in Brazil”***. Esse artigo descreve o genoma de uma nova bactéria acidofílica isolada na mesma drenagem ácida de mina em formação descrita nesse trabalho. ANEXO IV- ***“Assessment of fungal diversity in the environment using metagenomics: a decade in review”***. Essa revisão retrata o conhecimento atual sobre a diversidade de fungos, os principais avanços metodológicos que ocorreram ao longo da última década, principalmente com o surgimento da metagenômica, e as perspectivas para essa área. Além destes, outros trabalhos também já publicados e em fase de preparação que eu atuei como colaboradora durante o período do doutorado estão listados no ANEXO V, VI e VII.

4. CAPÍTULO I – Caracterização taxonômica da comunidade microbiana em drenagem ácida de mina

4.1. Introdução

A mineração é um dos motores da economia do Brasil. Em 2014, a produção mineral brasileira atingiu 4% do produto interno bruto, sendo que o cobre é um dos importantes metais produzido no país. Atualmente, o cobre é extraído apenas através dos processos da mineração tradicional. Sabe-se que essas técnicas são pouco eficientes, custosas e que geram grande impacto ambiental. Nesse contexto, os processos biotecnológicos que utilizam microrganismos para aumentar a eficiência de extração e recuperação de metais a partir de minerais, vem sendo uma alternativa estratégica para a indústria da mineração. A biomineração é compreendida pelo uso de microrganismos acidófilos e quimiolitotróficos capazes de oxidar ferro e enxofre, industrialmente, para recuperar metais a partir de minerais. A biomineração é indicada, sobretudo, para o tratamento de minério de baixo teor de metais, resíduos de mineração e matrizes minerais complexas. Os microrganismos atuantes nos processos de biomineração são geralmente encontrados em ambientes extremos (pH inferior a 3) formando um consórcio heterogêneo, mas muito especializado.

Uma das questões mais críticas em ambientes de mineração é a geração de drenagem ácida de mina (AMD), que apesar de ser um fenômeno natural do solo, se não for devidamente controlada, polui o ambiente com ácidos, sulfatos e metais. A diversidade e habilidades metabólicas dos microrganismos mais abundantes em drenagens ácidas bem estabelecidas já foram extensamente revisados. Porém, a estrutura e composição das comunidades microbianas que contribuem para os estágios iniciais de formação e manutenção das drenagens ácidas ainda permanecem desconhecido. No Brasil ainda há poucos estudos focados na ecologia e fisiologia microbiana de ambientes de mineração. Sendo que conhecer a microbiota local desse ecossistema é de grande importância para identificar microrganismos que tem o potencial para atuarem nos processos de biomineração e biorremediação. Nesse contexto, a metagenômica (sequenciamento de *amplicon* e *shotgun*) é uma valiosa ferramenta que pode ajudar a compreender melhor a diversidade microbiana desses ambientes. Assim, esse capítulo busca conhecer a diversidade taxonômica da microbiota de drenagem ácida de mina nos estágios iniciais de formação, bem como identificar microrganismos com o potencial biotecnológico para a indústria de mineração.

4.2. Metodologia

4.2.1. Coletas

Foram realizadas coletas na mina de cobre de Sossego, nos meses Abril 2013 e Julho de 2014 de amostras de drenagem ácida de mina. Essa drenagem ácida de mina é proveniente de uma pilha de baixo teor de minério calcopirita que é composto por sulfeto de cobre e ferro (CuFeS₂). É considerada uma drenagem em estágio inicial de formação já que suas águas são moderadamente ácidas (pH próximo de 5) porém com altas concentrações de sulfato. Em Abril de 2013, foram coletados três amostras únicas em pontos distintos ao longo do curso da drenagem. Aproximadamente 3L de água foram bombeados com o auxílio de uma bomba de porão. Em Julho de 2014, foram coletados aproximadamente 50L de água da AMD em duplicata. O ponto de drenagem amostrada foi o mesmo de uma das amostras de abril de 2013. Também foi amostrado sedimento nesse mesmo ponto de drenagem ácida de mina.

As amostras coletadas nesse estudo serão identificadas como:

- Água de drenagem ácida de Mina de abril de 2013: AMD_ABR_1, AMD_ABR_2, AMD_ABR_3.
- Água de drenagem ácida de Mina de Julho de 2014 (Filtros 0.1µm e 0.8 µm em duplicatas): AMD1_JUL_0.1, AMD2_JUL_0.1, AMD1_JUL_0.8, AMD2_JUL_0.8.
- Sedimento de drenagem ácida de Mina de Julho de 2014: AMD_SED_JUL.

A fim de comparar a comunidade microbiana de drenagem ácida de mina com outros pontos dentro do ambiente de mineração (Mina de Sossego) e em diferentes épocas do ano as seguintes amostras serão citadas:

- Água da barragem de rejeitos superfície de outubro de 2012 (Triplicatas): 1M_OUT_1, 1M_OUT_2, 1M_OUT_3.
- Água da barragem de rejeitos profundidade de outubro de 2012 (Triplicatas): 15M_OUT_1, 15M_OUT_2, 15M_OUT_3.
- Sedimento da barragem de rejeitos de outubro de 2012 (Três camadas em duplicata): SED_OUT_1, SED_OUT_2, SED_OUT_3, SED_OUT_4, SED_OUT_5, SED_OUT_6.
- Água da barragem de rejeitos superfície de abril de 2013 (Triplicatas): 1M_ABR_1, 1M_ABR_2, 1M_ABR_3.
- Água da barragem de rejeitos profundidade de abril de 2013 (Triplicatas): 15M_ABR_1, 15M_ABR_2, 15M_ABR_3.

- Sedimento da barragem de abril de 2013 (Três camadas em triplicatas): SED_ABR_1, SED_ABR_2, SED_ABR_3, SED_ABR_4, SED_ABR_5, SED_ABR_6, SED_ABR_7, SED_ABR_8, SED_ABR_9.

4.2.2. Características físico-químicas

Para todas as amostras de água e sedimento coletadas, uma parte foi destinada à avaliação de parâmetros físico-químicos. Essas medidas foram realizadas pela empresa SGS Geosol e as amostras de água seguiram “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*”. O relatório dos resultados para amostra de água contou com os seguintes parâmetros: Temperatura, oxigênio dissolvido, turbidez, condutividade, pH, potencial redox, alcalinidade, alumínio total, arsênio total, cádmio total, cálcio total, chumbo total, cloreto, cobalto total, cobre total, cromo total, ferro férrico, ferro ferroso, fluoreto, fósforo total, magnésio total, manganês total, níquel total, nitrogênio total, potássio total, sódio total, sulfato, sulfeto, sulfito, zinco total. Já o relatório para as amostras de sedimento forneceu os valores para os elementos químicos: Carbono (C), enxofre (S), prata (Ag), alumínio (Al), arsênio (As), boro (B), cálcio (Ca), cádmio (Cd), cobalto (Co), crômio (Cr) césio (Cs), cobre (Cu), ferro (Fe), mercúrio (Hg), potássio (K), magnésio (Mg), sódio (Na), níquel (Ni), fósforo (P), chumbo (Pb), enxofre (S), selênio (Se), urânio (U), tungstênio (W), zinco (Zn).

4.2.3. Filtração das amostras de água

A fim de concentrar a biomassa microbiana, as amostras de água foram submetidas a uma filtração sequencial em filtros com diferentes porosidades. Para as amostras coletadas em outubro de 2012 e abril de 2013 foi utilizado um sistema de filtração a vácuo com uma série de filtros: pré-filtro de fibra de vidro, 5 μ m, 0,45 μ m, 0,22 μ m. Com esse sistema foi possível filtrar aproximadamente 3L de água para cada amostra.

Para as amostras coletadas em julho de 2014 foi utilizado um novo sistema de filtração que tem capacidade de filtrar grandes volumes de água em um curto período de tempo. Esse sistema é composto por um compressor de ar ligado a três suportes conectados por mangueiras. Nos suportes estão contidas membranas de diferentes porosidades. Nesse estudo foram utilizadas membranas de 3 μ m, 0,8 μ m e 0,1 μ m. Com esse sistema foi possível filtrar aproximadamente 50L de água por amostra.

4.2.4. Extração de DNA

Para as amostras de água coletadas em outubro 2012 e abril 2013 o DNA da comunidade microbiana foi extraído usando os kits PowerWater® DNA Isolation Kit (MOBIO, USA) seguindo instruções do fabricante. Para as amostras de água coletadas em julho de 2014 (AMD1_JUN_0.1, AMD2_JUN_0.1, AMD1_JUN_0.8, AMD2_JUN_0.8) a extração de DNA seguiu o protocolo descrito por Rusch et al., 2007. Brevemente, os filtros foram cortados assepticamente em pequenos pedaços e colocados individualmente em tubos de 50mL contendo um tampão de lise de sacarose (20 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.75 M sucrose, 50 mM Tris-HCl [pH 8]) e TE pH8. Lisozima foi adicionada à solução na concentração final de 2,5 mg/ml⁻¹, e os tubos foram incubados a 37 °C por 1 hora em um banho-maria com agitação. Proteinase K foi adicionada a uma concentração final de 200 µg/ml⁻¹, e as amostras foram congeladas em gelo seco seguida de descongelamento a 55 °C. Foi adicionado SDS (concentração final 1%) e proteinase K (200 µg/ml⁻¹) às amostras e estas foram incubadas a 55 °C por 2 horas com agitação leve. Em seguida as amostras foram tratadas com fenol e fenol/clorofórmio/isoamílico. O sobrenadante foi precipitado com acetato de sódio e isopropanol. O *pellet* de DNA foi lavado com etanol 70%.

As amostras de sedimento foram extraídas com PowerSoil® DNA Isolation Kit, (MOBIO, USA).

4.2.5. Sequenciamento do gene 16S rRNA

A fim de determinar o perfil taxonômico das comunidades microbianas foi realizado o sequenciamento do gene marcador molecular 16S rRNA de todas as amostras obtidas nesse estudo. As amostras de DNA passaram por amplificação da região V3-V4 do gene 16S rRNA e construção de bibliotecas para sequenciamento do tipo *paired-end* na plataforma Miseq (Illumina, USA). Inicialmente o DNA de todas as amostras foi diluído a uma concentração de 5ng/µL. A amplificação da região V3-V4 do gene 16S rRNA foi realizada utilizando os *primers* 341F (5' **TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**CCTACGGGNGGCWGCAG-3') e 806R (5' **GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG**GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (KLINDWORTH et al., 2013) modificados. Foram inseridos na região 5' dos *primers* uma sequência *overhang* (destacada em vermelho) que tem complementaridade de base pelos adaptadores fornecidos pelo kit Nextera XT da Illumina, conforme ilustrado da Figura 7. A reação de amplificação foi a seguinte:

Tabela 1 – Reação de PCR utilizada na amplificação das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA.

Reagentes	Concentração Inicial	Volume (1x)
<i>Primer 341F-mod</i>	1 μ M	5 μ L
<i>Primer 806R-mod</i>	1 μ M	5 μ L
KAPA HiFi HotStart ReadyMix	2X	12,5 μ L
DNA	5ng/1 μ L	2,5 μ L

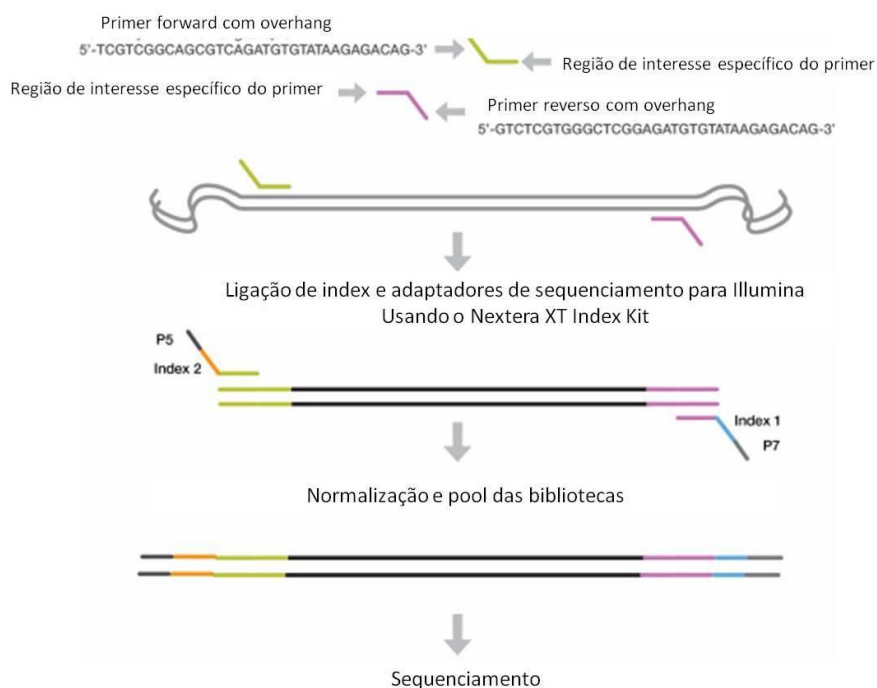


Figura 7 – Esquema ilustrativo da construção de bibliotecas de 16S para sequenciamento no MiSeq da Illumina.

As condições utilizadas nessa PCR foram: Desnaturação inicial à 95°C seguido de 25 ciclos de desnaturação à 95°C, anelamento à 56°C, extensão à 72°C, finalizando com extensão final de 72°C. A especificidade e eficiência da amplificação foi checado em corrida no Bioanalyzer utilizando o kit Agilent DNA 1000 (Agilent, USA). O tamanho de *amplicon* esperado era de aproximadamente 550pb. Em seguida os produtos amplificados foram purificados utilizando *beads* magnéticas da AMPure XP beads (Beckman Coulter, USA).

O passo seguinte na construção das bibliotecas consistiu na ligação de um par de *index* diferentes para cada amostra bem como ligação dos adaptadores necessários para que a reação de sequenciamento pudesse acontecer. Os *index* e adaptadores utilizados fazem parte do Nextera XT Index Kit (Illumina, USA). Essa ligação foi realizada por uma reação de amplificação de 8 ciclos, descrita a seguir.

Tabela 2 – Reação de PCR utilizada para ligação de index durante a construção de bibliotecas para sequenciamento na plataforma Illumina.

Reagentes	Volume
Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)	5µL
Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)	5µL
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25µL
Água	10µL
DNA (produto da reação anterior)	5µL

Após a ligação dos index e adaptadores foi realizada uma corrida no Bioanalyzer para checar o tamanho das bibliotecas. Em seguida as bibliotecas foram novamente purificadas utilizando *beads* magnéticas. Por fim, foi realizada a quantificação das bibliotecas por PCR em tempo real utilizando o kit KAPA Library Quantification (Kapa Biosystems, USA). As bibliotecas foram normalizadas, colocadas em um *pool* e sequenciadas em uma corrida única na plataforma Miseq (Illumina, USA) utilizando o kit MiSeq Reagent Kit v3- 600 Cycles, sendo o sequenciamento *paired-end* de 2x 300pb. O sequenciamento foi realizado na plataforma NGS do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR/ FIOCRUZ-MG).

4.2.6. Análises de bioinformática

O *pipeline* utilizado para análise das sequências do gene 16S rRNA foi o desenvolvido pelo *Brazilian Microbiome Project* (BMP) (PYLRO et al., 2014). Basicamente os passos realizados no *pipeline* foram os seguintes:

1) Filtro por qualidade: O programa Trimmomatic v.0.32 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) foi utilizado para filtrar a qualidade das sequências. Os parâmetros utilizados indicam o corte das 10 primeiras e últimas bases de cada sequência (TRAILING:10 LEADING:10) e uma varredura ao longo de toda a sequência (SLIDINGWINDOW:4:13). A cada janela de 4 bases a qualidade média dessas bases foi checada. Se houvesse alguma média de qualidade abaixo do valor de phred 13 a sequência era trimada, isto é, desse ponto em diante a sequência era quebrada e a região com baixa qualidade excluída.

2) Montagem dos pares: Como o sequenciamento foi realizado de maneira *paired-end*, cada fragmento foi lido duas vezes. Assim, fez-se necessária a montagem desses pares a fim de se obter um fragmento maior e mais representativo da região amplificada do gene 16S rRNA. A montagem dos pares baseada na sua região de sobreposição foi realizada com o programa FLASH v.1.2.11 (MAGOČ; SALZBERG, 2011).

3) Filtro por tamanho: Todos os pares montados foram truncados com tamanho 400bp a fim de garantir um melhor alinhamento múltiplo possível nas etapas posteriores. Essa etapa foi realizada com USEARCH (EDGAR, 2010).

4) Dereplicação: Esse processo é a identificação de sequências únicas de modo que apenas uma cópia de cada sequência continue nos próximos passos da análise. É importante considerar que o valor agregado de cada sequência única é armazenado para o cálculo da abundância. Essa etapa foi realizada com USEARCH.

5) Categorização da abundância e descarte de *singletons*: As sequências foram ordenadas por abundância e sequências com apenas um representante foram descartadas a fim de evitar análise de erros de sequenciamento. Etapa realizada com USEARCH.

6) Clusterização em unidades taxonômicas operacionais (OTUs). A clusterização foi realizada pelo método UPARSE (EDGAR, 2013).

7) Filtro das possíveis quimeras formadas, utilizando o banco referência.

8) Atribuição de taxonomia para as OTUs utilizando o método uclust do pacote QIIME v1.8.0 (CAPORASO et al., 2010), a nível de 97% de identidade. O banco de dados utilizado foi o Greengenes.

9) Alinhamento das sequências utilizando o QIIME v1.8.0, sendo Greengenes o banco de referência.

10) Construção da árvore de referência usando QIIME v1.8.0.

11) Criação de uma tabela de OTUs no formato BIOM.

12) Análises de taxonomia, diversidade, *core microbiome* e *biplot* usando *scrips* incluídos no QIIME v1.8.0.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Metadados

Os parâmetros físico-químicos analisados nas águas e sedimento de drenagem ácida de mina estão descritos nas tabelas 3 e 4. Também foram adicionados os parâmetros obtidos para amostras de água superficial da barragem de rejeito da mina de Sossego, na mesma data da coleta de abril (1M_ABR), a fim de comparação. As coletas de abril e julho se deram no período chuvoso, sendo que em abril a média de pluviosidade na data da coleta foi de 139mm e em julho 89mm.

Tabela 3 – Características físico-químicas das amostras de água de drenagem ácida de mina nos períodos de abril de 2013 e julho 2014 e água superficial da barragem de rejeitos em abril 2013 (1M_ABR).

Parâmetros	Unidades	Amostras				
		1M_ABR	AMD_ABR_1	AMD_ABR_2	AMD_ABR_3	AMD_JUL
Temperatura	°C	31	-	-	33,2	-
O2 dissolvido	mg/mL	12,62	5,0	5,0	4,8	4,1
Turbidez	NTU	2,6	12,6	1,5	11,8	42,8
pH	NOUNIT	7,36	4,86	5,0	5,0	5,02
Potencial Redox	mV	310	496	421	270	-
Alcalinidade Total	mg CaCO ₃ /L	41,1	6,51	<2	3,01	3,03
Alumínio Total	mg Al/L	0,12	1,03	1,00	0,98	0,09
Arsênio Total	mg As/L	0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Cádmio Total	mg Cd/L	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Cálcio Total	mg Ca/L	68,7	272	306	281	219
Chumbo Total	mg Pb/L	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Cloreto	mg Cl ⁻ /L	97,8	14,9	11,6	15,3	19,4
Cobalto Total	mg Co/L	<0,01	3,23	2,42	3,88	2,78
Cobre Total	mg Cu/L	0,01	532	573	483	74,7
Cromo Total	mg Cr/L	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Ferro Férrico	mg Fe ³ /L	0,10	0,21	0,69	0,15	0,12
Ferro Ferroso	mg Fe ² /L	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Fluoreto	mg F/L	0,56	0,54	0,45	0,53	<0,1
Fósforo Total	mg P/L	0,02	<0,01	0,05	<0,01	0,02
Magnésio Total	mg Mg/L	3,81	82,9	93,5	96,2	136
Manganês Total	mg Mn/L	<0,05	8,45	6,22	8,74	18,4
Níquel Total	mg Ni/L	<0,02	8,68	7,42	10,1	<0,02
Nitrogênio Total	mg N/L	3,8	16,1	12,6	16,6	6,2
Potássio Total	mg K/L	33,8	10,7	12,4	11,0	9,69
Sódio Total	mg Na/L	158	46,5	33,5	48,3	65,4
Sulfato	mg SO ₄ /L	160	948	1360	1505	1170
Sulfeto	mg S ₂ ⁻ /L	0,002	0,003	<0,002	<0,002	<0,002
Sulfito	mg SO ₃ /L	<2	<2	<2	<2	<2
Zinco Total	mg Zn/L	<0,1	0,85	0,69	1,02	0,38

Tabela 4– Análise química da amostra de sedimento de ácida de mina em julho 2014.

	Unit	AMD_SED_JUL
C	%	0,91
S	%	0,48
Ag	ppm	2,85
Al	%	3,28
As	ppm	1
B	ppm	<10
Ba	ppm	98
Be	ppm	2,4
Bi	ppm	0,08
Ca	%	0,54
Cd	ppm	0,12
Ce	ppm	139,49
Co	ppm	57,9
Cr	ppm	62
Cs	ppm	0,55
Cu	ppm	>10000
Fe	%	7
Ga	ppm	17,5
Ge	ppm	0,2
Hf	ppm	<0,05
Hg	ppm	<0,01
In	ppm	0,05
K	%	0,28
La	ppm	84,6
Li	ppm	17
Lu	ppm	0,5
Mg	%	1,65
Mn	ppm	337
Mo	ppm	6,11
Na	%	0,04
Nb	ppm	1,32
Ni	ppm	232,1
P	ppm	1233
Pb	ppm	8,3
Rb	ppm	29,2
Re	ppm	<0,1
S	%	0,6
Sb	ppm	<0,05
Sc	ppm	13,4
Se	ppm	2
Sn	ppm	4,4
Sr	ppm	19,7
Ta	ppm	<0,05
Tb	ppm	1,28
Te	ppm	0,19
Th	ppm	17,3
Ti	%	0,11
Tl	ppm	0,11
U	ppm	7,52
V	ppm	116
W	ppm	0,7
Y	ppm	41,91
Yb	ppm	3,6
Zn	ppm	53
Zr	ppm	9,2

A concentração de metais dissolvidos na água da barragem de rejeito não excedeu o máximo permitido pela legislação brasileira que diz respeito às condições e padrões de lançamento de efluentes (Resolução CONAMA Nº 430/2011). Quando comparados a esses resultados, observa-se que as amostras de água de AMD, apresentaram diversos parâmetros físico-químicos alterados. O pH observado nessas amostras variou de 4,86 a 5,00 (Tabela 3). Os valores de pH em torno de 5 não são críticos quanto os observados em drenagens ácidas bem estabelecidas, que podem atingir 1 (JACOBS; VANCE, 2014). Porém, sabe-se que essa é uma drenagem ácida em formação já caracterizada por altas concentrações de cobre (até 573 mg/L) e sulfato (até 1.505 mg/L) (Tabela 3). Além disso, é importante considerar que houve um processo de correção do pH com calcário, por parte da empresa mineradora. A correção é facilmente notada quando se leva em consideração os níveis de cálcio dessas amostras, que atingiram 306 mg/L. Os baixos níveis de Fe observados são justificáveis devido ao pH das amostras estarem próximo de 5 já que a dissolução do ferro ocorrem em pH mais baixos (LIU et al., 1994).

Com relação aos parâmetros físico-químicos analisados no sedimento de drenagem ácida de mina, vale destacar a concentração de cobre (Tabela 4), que atingiu o nível de detecção do método utilizado (valores maiores que 10000 ppm). Essa alta concentração observada no sedimento da drenagem era esperada pois, como ressaltado anteriormente, essa é uma consequência do processo de formação das AMDs. Além disso, as drenagens foram corrigidas com calcário o que ocasionou solubilização desse metal na forma de sulfato de cobre, e sua precipitação na forma de óxido de cobre, o que deu a coloração azulada para essas drenagens conforme ilustrado na Figura 8.

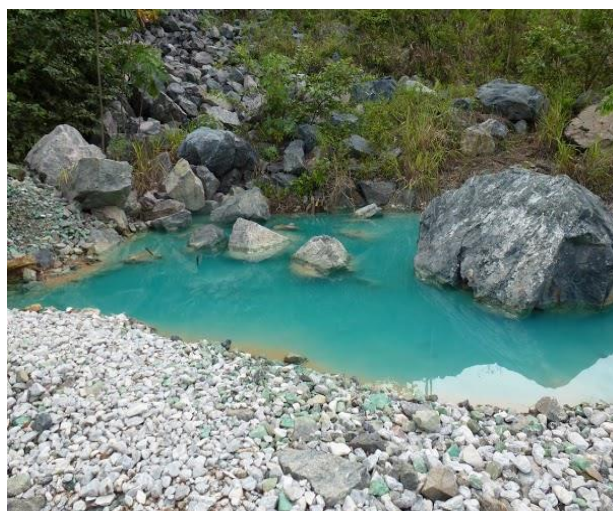


Figura 8 – Drenagem ácida de mina coletada em Abril de 2013.

4.3.2. Resultado do sequenciamento

Um total de 620.980 *reads* filtrados pela qualidade e com seus respectivos pares foram obtidos das amostras de drenagem ácida de mina (Tabela 5). A amostra AMD_ABR_2 rendeu um baixo número de sequências (9.275). A fim de minimizar os efeitos das diferentes coberturas de sequenciamento, as análises de diversidade e comparação taxonômica foram realizadas aplicando-se um método de subamostragem aleatória de sequências. Estimativas de α -diversidade foram realizadas com rarefação de 25.000 sequências, ou seja, excluindo a amostra AMD_ABR_2. Já o perfil taxonômico e β -diversidade foram analisados com a rarefação de 9.000 sequências.

4.3.3. α -diversidade

Os índices de α -diversidade utilizados nesse estudo levam em consideração tanto a riqueza de espécie do ambiente bem como sua dominância (Tabela 5). As métricas utilizadas foram: Chao-1, estima a riqueza total de espécies, proposto por (CHAO, 1984); espécies observadas, indica o número de OTUs detectadas; Shannon (H') e Simpson, que consideram além da riqueza de espécies a sua abundância. Os valores de H' aumentam quanto maior for a riqueza e a equitabilidade de abundância das OTUs. O índice de Simpson, é a probabilidade de que dois indivíduos escolhidos aleatoriamente de uma amostra pertençam à diferentes OTUs, sendo que os valores mais altos indicam maior diversidade. Esse índice dá peso às espécies mais abundantes em uma amostra (LOUIS et al., 2016).

Tabela 5 – Índices de α -diversidade. Valores calculados para uma subamostragem de 25.000 sequências.

Métricas	AMD_ABR_1	AMD_ABR_2	AMD_ABR_3	AMD1_JUL_0.1	AMD2_JUL_0.1	AMD1_JUL_0.8	AMD2_JUL_0.8	AMD_SED_JUL
Número de sequencias	183176	9275	29385	75247	36366	81521	25413	180597
Goods coverage	0,98	n/a	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Chao-1	1796,7	n/a	1343,5	804,0	753,0	667,7	592,8	694,5
Espécies observadas	1366	n/a	1085	601	570	438	446	467
Shannon	7,2	n/a	6,5	5,3	4,8	5,0	5,3	3,6
Simpson	0,97	n/a	0,95	0,92	0,86	0,93	0,93	0,70

* Os números 0.1 e 0.8 na identificação das amostras representam a porosidade da membrana utilizada durante a filtração

Com relação à riqueza de espécie (índices Chao-1 e espécies observadas) fica evidenciado que as amostras mais diversas foram as drenagens coletadas em abril 2013 (AMD_ABR_1 e AMD_ABR_3). Nas amostras de AMD coletadas em julho 2014 tanto a água quanto o sedimento tiveram uma riqueza de espécies com poucas variações entre elas,

quando comparadas com AMD de abril (tabela 5). Sabe-se que a biomassa e a riqueza de táxons microbianos em sedimentos são geralmente maiores do que nos corpos d'água correspondentes, já que nos sedimentos há a deposição de matéria orgânica e estes fornecem uma matriz de nutrientes para o crescimento microbiano (WANG et al., 2012). Dessa maneira, a riqueza semelhante e/ou maior para água do que o sedimento da AMD foi um resultado não esperado. Porém, as altas concentrações de cobre (Tabela 4) no sedimento podem justificar um decréscimo na diversidade microbiana desse ecossistema. Quando se avaliam os índices que levam em consideração a abundância de espécies (Shannon e Simpson), o sedimento se mostra o ambiente menos diverso (mesmo apresentando riqueza semelhante com a água), isso nos indica que nessa amostra há a dominância de alguns táxons com relação à todas as OTUs atribuídas. Novamente, as características físico-químicas do sedimento (especialmente taxas elevadas de Cu) podem estar contribuindo para a seleção de grupos específicos de microrganismos e sua maior abundância. Diversos estudo já mostraram que há uma redução da diversidade microbiana em drenagens ácidas bem estabelecidas, e essa redução é guiada principalmente pelas condições ambientais extremas desses ecossistemas (BOND; SMRIGA; BANFIELD, 2000; JOHNSON; HALLBERG, 2003b; MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015)

A análise de rarefação, que considera a riqueza de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) em função da cobertura do sequenciamento (Figura 9), e o índice de Good's coverage (cobertura atingida com a subamostragem de 25.000 sequências) com valores variando de 0,98 para 0,99 mostraram que o esforço de sequenciamento realizado foi suficiente para representar a diversidade de *Bacteria* e *Archaea*. Além disso, essa análise também reforça a maior diversidade nas amostras de drenagem ácida coletadas em abril 2013.

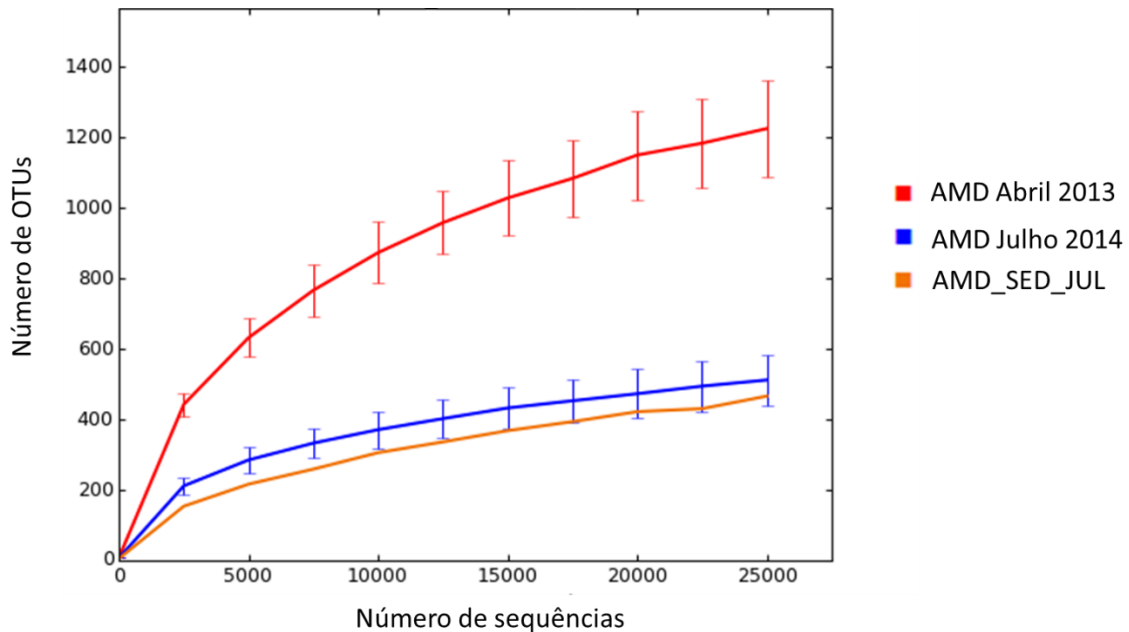


Figura 9 – Curva de rarefação dos microbiomas analisados. Dados plotados com uma subamostragem de 25.000 sequências.

4.3.4. Perfil taxonômico

A abundância dos táxons de *Bacteria* e *Archaea* obtidos, a nível de filo, para as amostras de drenagem ácida estão descritos na Figura 10. Considerando *Archaea*, as amostras de abril 2013 apresentaram maior abundância desse domínio sendo que na AMD_ABR_2 esse grupo chegou a representar uma importante parcela de 36%. As OTUs atribuídas para *Archaea* foram classificadas principalmente nos grupos Crenarchaeota (*unclassified*), Crenarchaeota (ordem Cenarchaeales) e Euryarchaeota (família Methanomassiliococcaceae). A presença de arqueias em alta proporção em amostras de drenagem ácida de mina é um resultado esperado já que esses organismos já foram relatados em drenagens bem estabelecidas (JOHNSON; KANAO; HEDRICH, 2012; MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015). Muitas sequências da amostra AMD_ABR_2 foram atribuídas à família Methanomassiliococcaceae (aproximadamente 26,9% do total de *reads*). Essa família foi recentemente descrita e é caracterizada por conter organismos metanogênicos, que são capazes de produzir metano como um subproduto metabólico (IINO et al., 2013).

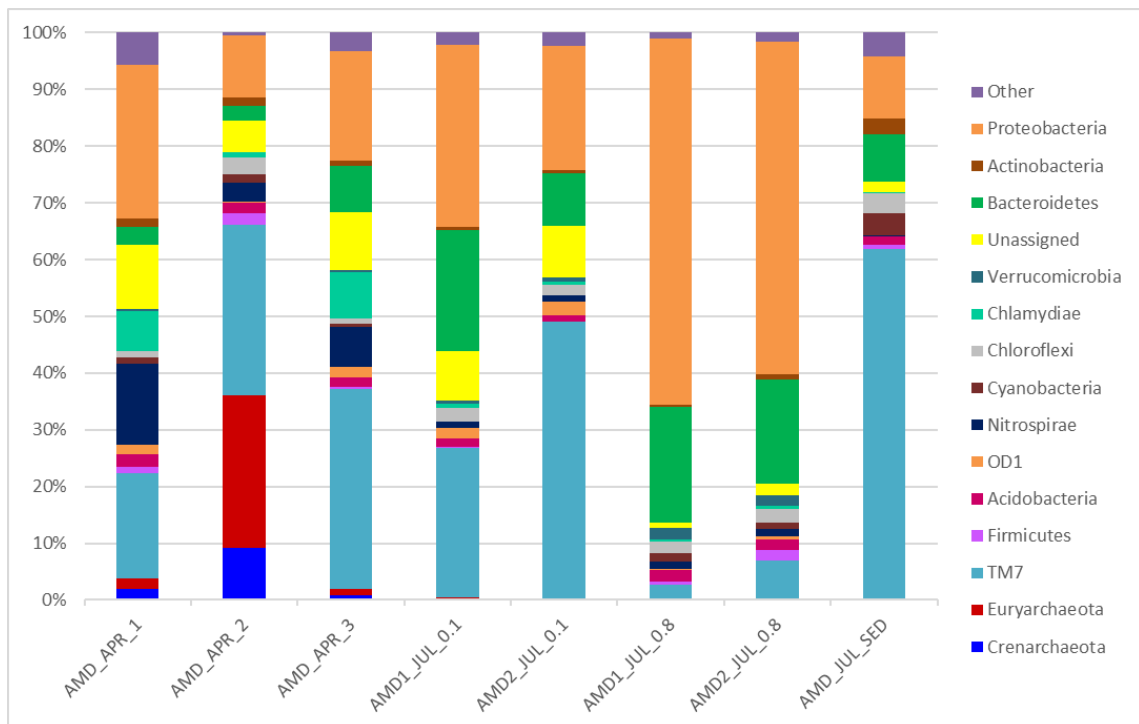


Figura 10 – Perfil taxonômico da comunidade microbiana de amostras de água e sedimento de drenagem ácida de mina coletadas em abril 2013 e julho 2014. Os números 0.1 e 0.8 na identificação das amostras representam a porosidade da membrana utilizada durante a filtração.

Considerando o domínio *Bacteria*, o filo com maior representatividade nas amostras de drenagem ácida foi TM7 (Figura 10), com exceção para as amostras de água de AMD de julho 2014 cujo filtro utilizado foi de porosidade 0.8 μ m. O filo TM7 é classificado como um filo candidato pois ainda não tem nenhum representante descrito cultivado e/ou isolado em meio de cultura. Até o momento existem poucos genomas (n=9) depositados de bactérias pertencentes a esse grupo e todos eles foram recuperados de metagenomas (ALBERTSEN et al., 2013) ou são originários de *Single Cell Genomics*. Esse filo bacteriano é altamente ubíquo e já foi descrito em uma gama de ambientes como solos, sedimentos, águas residuais e associados a humanos. Tan e colaboradores (2009), através de bibliotecas de clones de 16S rDNA, identificaram a presença de OTUs correspondentes ao filo TM7 em amostras de drenagem ácida de mina. Além disso, HANADA et al., 2014 observaram que bactérias do filo candidato TM7 eram abundantes em reatores acidofílicos nitrificantes (reatores capazes de realizar oxidação de amônia/nitrito em águas residuais, com o pH menor ou igual a 4). Até o momento o filo candidato TM7 foi descrito com duas classes, de acordo com o estudo de DINIS et al., (2011), TM7-1 é mais frequentemente composto por bactérias originárias de amostras ambientais, tais como solos e sedimentos, enquanto que espécies de TM7-3 foram identificadas em amostras associadas a humanos e outros animais (DINIS et al., 2011), porém essa separação não é rigorosa. Nas amostras de drenagem ácida, foi possível classificar 83 OTUs pertencentes ao filo candidato TM7 sendo que dessas, as com maior abundância de

sequências foram da classe TM7-3, em destaque para uma OTU na amostra de AMD_SED_JUL com 97.000 sequências. A análise de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) realizada por Albertsen e colaboradores (2013) mostrou células de TM7 com formato de cocos e com diâmetro de aproximadamente 0.7 μ m. O pequeno tamanho das células de TM7 explica o motivo pelo qual esse grupo não foi abundante nas amostras de água de AMD que foram filtradas em membranas de 0.8 μ m, já que a biomassa retida nessas membranas deveriam ter tamanho superior a 0.8 μ m o que aparentemente não é o caso das células de TM7 (também relatado por HE et al., 2015).

Outros filios muito abundantes nas amostras de AMD foram Proteobacteria (Figura 10), especialmente a classe Betaproteobacteria, representando 30% do total de *reads* nas amostras de AMD1_JUL_0.8 e AMD2_JUL_0.8 e Bacteroidetes. A alta abundância desses grupos era esperado pois sabe-se que as Betaproteobacterias e Bacteroidetes são frequentemente dominantes em água doce (NEWTON et al., 2011). O filo Nitrospirae também foi bem representado nas amostras estudadas (Figura 10). Esse filo contém apenas três gêneros com representantes cultiváveis, que são eles *Nitrospira*, *Leptospirillum* e *Thermodesulfovibrio* (LEFEVRE et al., 2011). Cada um desses gêneros possui diferente fisiologia, porém todos têm importância nos ciclos biogeoquímicos. *Nitrospira* são bactérias oxidadoras de nitrito pertencentes à família Nitrospiraceae, essa família representou uma porcentagem significativa do filo Nitrospirae nas amostras de drenagem ácida. Já *Leptospirillum* é um gênero de bactérias acidofílicas oxidadoras de ferro, que são importantes candidatos aos processos de biomineração. A abundância desse gênero foi significativa principalmente nas amostras de abril 2013. O terceiro gênero, *Thermodesulfovibrio*, é um grupo termofílico de bactérias anaeróbias redutoras de sulfato, que tem importância nos processos de biorremediação de drenagem ácida. Esse gênero não foi observado nas amostras de AMD já que esse ambiente não é propício para o desenvolvimento de bactérias anaeróbias.

4.3.5. Microbiota *core*

Até o momento foram discutidos de maneira geral os grupos abundantes nas amostras estudadas, porém a fim de evidenciar a microbiota *core* das drenagens ácidas, uma análise mais refinada foi realizada. A microbiota *core* é caracterizada por membros da comunidade microbiana comuns em duas ou mais amostras associado ao mesmo habitat. Identificar as espécies (ou unidade taxonômicas operacionais, OTUs) centrais é essencial para compreender a ecologia de consórcios microbianos já que organismos comuns a determinados ambientes podem ser críticos para a função daquele ecossistema (SHADE; HANDELSMAN, 2012). Além disso, no caso deste trabalho, conhecer a microbiota *core* das

amostras de drenagem poderia facilitar o entendimento sobre os grupos microbianos que estão persistindo nesse ecossistema em formação, já que temos amostra da mesma drenagem em anos diferentes.

Um total de 80 OTUs foram identificadas como uniformemente representadas em todas as amostras de AMD (Tabela 6). Dentre esses grupos microbianos alguns já foram discutidos no tópico anterior, entre eles a família Methanomassiliicoccaceae e Nistrospiraceae com o gênero *Nitrospira*, que sabe-se têm importância na ciclagem de nutrientes já que são composta de arqueias metanogênicas e bactérias nitrificantes, respectivamente. Além destes, vale ressaltar a presença das bactérias pertencentes ao filo TM7. Bactérias fotossintetizantes também puderam ser observadas fazendo parte da microbiota core das drenagens ácidas, em destaque as bactérias não sulfurosas roxas (*Purple non-sulfur bacteria*) pertencentes aos grupos: Bradyrhizobiaceae, *Rhodoplanes*, Rhodospirillaceae e *Limnobacter* (tabela 6). O gênero acidofílico *Acidithiobacillus* também apareceu como pertencente à essa microbiota, além de ser persistente no ambiente com o passar de um ano, esse gênero tem ampla importância nos processos de biolixiviação e será discutido em detalhe no tópico a seguir.

Tabela 6 – Unidades taxonômicas operacionais (OTU's) pertencentes ao microbioma core de drenagem ácida de mina. As OTU's indicadas foram observadas em 100% das amostras desse estudo.

OTU's	Táxon
OTU871875704749033	k_Archaea, p_Crenarchaeota, c_MBGA, o_NRP-J, f_, g_, s_
OTU413878328210412	k_Archaea, p_Crenarchaeota, c_MBGA, o_NRP-J, f_, g_, s_
OTU393000341093841	k_Archaea, p_Crenarchaeota, c_MBGA, o_NRP-J, f_, g_, s_
OTU541729263715005	k_Archaea, p_Euryarchaeota, c_Thermoplasmata, o_E2, f_Methanomassiliicoccaceae, g_, s_
OTU474512350124395	k_Archaea, p_Euryarchaeota, c_Thermoplasmata, o_E2, f_Methanomassiliicoccaceae, g_, s_
OTU375959666029231	k_Bacteria, p_Acidobacteria, c_Acidobacteriia, o_Acidobacteriales, f_Acidobacteriaceae, g_, s_
OTU384667194279710	k_Bacteria, p_Acidobacteria, c_DA052, o_Ellin6513, f_, g_, s_
OTU85695033990191	k_Bacteria, p_Acidobacteria, c_Solibacteres, o_JH-WHS99, f_, g_, s_
OTU822256486880061	k_Bacteria, p_Acidobacteria, c_Solibacteres, o_Solibacterales, f_Solibacteraceae, g_Candidatus Solibacter, s_
OTU407212036343928	k_Bacteria, p_Actinobacteria, c_Actinobacteria, o_Actinomycetales, f_, g_, s_
OTU114474619763658	k_Bacteria, p_Actinobacteria, c_Actinobacteria, o_Actinomycetales, f_Microbacteriaceae, g_Yonghaparkia, s_
OTU565486868053806	k_Bacteria, p_Actinobacteria, c_MB-A2-108, o_0319-7L14, f_, g_, s_
OTU860670239299071	k_Bacteria, p_Actinobacteria, c_Thermoleophilia, o_Gaiellales, f_Gaiellaceae, g_, s_
OTU707128767289443	k_Bacteria, p_Bacteroidetes, c_Saprospirae, o_Saprospirales, f_Chitinophagaceae, g_Sediminibacterium, s_
OTU501619429576560	k_Bacteria, p_Bacteroidetes, c_Saprospirae, o_Saprospirales, f_Chitinophagaceae, g_Sediminibacterium, s_
OTU105426338376521	k_Bacteria, p_Bacteroidetes, c_Saprospirae, o_Saprospirales, f_Chitinophagaceae, g_Sediminibacterium, s_
OTU104140968514055	k_Bacteria, p_Bacteroidetes, c_Saprospirae, o_Saprospirales, f_Chitinophagaceae, g_Sediminibacterium, s_
OTU281003814765728	k_Bacteria, p_Chlamydiae, c_Chlamydiia, o_Chlamydiales, f_, g_, s_
OTU970728263639799	k_Bacteria, p_Chlamydiae, c_Chlamydiia, o_Chlamydiales, f_Rhabdochlamydiaceae, g_Candidatus Rhabdochlamydia
OTU552192064761538	k_Bacteria, p_Chlorobi, c_BSV26, o_BSN164, f_, g_, s_
OTU352319757761584	k_Bacteria, p_Chloroflexi, c_Ellin6529, o_, f_, g_, s_
OTU235771559256914	k_Bacteria, p_Chloroflexi, c_Ellin6529, o_, f_, g_, s_
OTU972394941303701	k_Bacteria, p_Chloroflexi, c_Ellin6529, o_, f_, g_, s_

OTU536663153244376 k_Bacteria, p_Chloroflexi, c_Ellin6529, o_, f_, g_, s_
 OTU469851310360386 k_Bacteria, p_Chloroflexi, c_Ktedonobacteria, o_JG30-KF-AS9, f_, g_, s_
 OTU100385908759417 k_Bacteria, p_Chloroflexi, c_P2-11E, o_, f_, g_, s_
 OTU211138841073928 k_Bacteria, p_Chloroflexi, c_TK10, o_B07_WMSP1, f_, g_, s_
 OTU394849963137826 k_Bacteria, p_Gemmatimonadetes, c_Gemmatimonadetes, o_KD8-87, f_, g_, s_
 OTU288121480973888 k_Bacteria, p_Nitrospirae, c_Nitrospira, o_Nitrospirales, f_Nitrospiraceae, g_, s_
 OTU222110187166816 k_Bacteria, p_Nitrospirae, c_Nitrospira, o_Nitrospirales, f_Nitrospiraceae, g_, s_
 OTU750249816140833 k_Bacteria, p_Nitrospirae, c_Nitrospira, o_Nitrospirales, f_Nitrospiraceae, g_, s_
 OTU411054299277985 k_Bacteria, p_Nitrospirae, c_Nitrospira, o_Nitrospirales, f_Nitrospiraceae, g_Nitrospira, s_
 OTU594486186045767 k_Bacteria, p_Proteobacteria
 OTU606269835233796 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_, o_, f_, g_, s_
 OTU780967217681151 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Rhizobiales, f_Bradyrhizobiaceae
 OTU391934781449723 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Rhizobiales, f_Bradyrhizobiaceae, g_, s_
 OTU704002262303891 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Rhizobiales, f_Hyphomicrobiaceae, g_Rhodoplanes, s_
 OTU154245387450522 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Rhizobiales, f_Hyphomicrobiaceae, g_Rhodoplanes, s_
 OTU137182654102794 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Rhizobiales, f_Methylocystaceae, g_Methylosinus, s_
 OTU634855012541031 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Rhodospirillales, f_Rhodospirillaceae, g_, s_
 OTU383049780657668 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Rhodospirillales, f_Rhodospirillaceae, g_, s_
 OTU507604891164859 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Rhodospirillales, f_Rhodospirillaceae, g_, s_
 OTU836591971999386 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Rhodospirillales, f_Rhodospirillaceae, g_Magnetospirillum
 OTU712512751297595 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Rickettsiales, f_, g_, s_
 OTU574013416402152 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Rickettsiales, f_, g_, s_
 OTU90850242172027 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Sphingomonadales, f_Erythrobacteraceae, g_, s_
 OTU644512121099353 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Sphingomonadales, f_Sphingomonadaceae
 OTU880996990344257 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Sphingomonadales, f_Sphingomonadaceae, g_, s_
 OTU149560386621491 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Sphingomonadales, f_Sphingomonadaceae,
 g_Novosphingobium
 OTU735552105305377 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Alphaproteobacteria, o_Sphingomonadales, f_Sphingomonadaceae,
 g_Sphingomonas
 OTU68131669339930 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Betaproteobacteria
 OTU647976155926645 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Betaproteobacteria, o_Burkholderiales, f_, g_, s_
 OTU431842065257122 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Betaproteobacteria, o_Burkholderiales, f_Comamonadaceae, g_Limnobacter, s_
 OTU389686399196136 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Betaproteobacteria, o_Burkholderiales, f_Oxalobacteraceae, g_, s_
 OTU855537023234067 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Betaproteobacteria, o_Methylophilales, f_, g_, s_
 OTU671008025377524 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Betaproteobacteria, o_Methylophilales, f_, g_, s_
 OTU305540889955619 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Betaproteobacteria, o_MND1, f_, g_, s_
 OTU729054045071404 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Betaproteobacteria, o_Procabbacteriales, f_Procabbacteriaceae, g_, s_
 OTU864369878278441 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Betaproteobacteria, o_Rhodocyclales, f_Rhodocyclaceae, g_, s_
 OTU755081708620714 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Betaproteobacteria, o_Thiobacterales, f_Thiobacteraceae
 OTU320775516562449 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Betaproteobacteria, o_Thiobacterales, f_Thiobacteraceae, g_, s_
 OTU440132624806899 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Gammaproteobacteria, o_Acidithiobacillales, f_Acidithiobacillaceae,
 g_Acidithiobacillus
 OTU379191086355806 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Gammaproteobacteria, o_Legionellales, f_Coxiellaceae, g_, s_
 OTU179079573445470 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Gammaproteobacteria, o_Legionellales, f_Coxiellaceae, g_Aquicella, s_
 OTU643140876411880 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Gammaproteobacteria, o_Legionellales, f_Coxiellaceae, g_Aquicella, s_
 OTU544440473987659 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Gammaproteobacteria, o_Legionellales, f_Coxiellaceae, g_Aquicella, s_
 OTU613440323150214 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Gammaproteobacteria, o_Legionellales, f_Legionellaceae, g_, s_
 OTU649190726695234 k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Gammaproteobacteria, o_Legionellales, f_Legionellaceae, g_, s_

OTU835282757765167	k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Gammaproteobacteria, o_Legionellales, f_Legionellaceae, g_Legionella
OTU296280114647487	k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Gammaproteobacteria, o_Xanthomonadales, f_Xanthomonadaceae, g_, s_
OTU185694229176782	k_Bacteria, p_Proteobacteria, c_Gammaproteobacteria, o_Xanthomonadales, f_Xanthomonadaceae, g_, s_
OTU667657547773572	k_Bacteria, p_TM7, c_TM7-1, o_, f_, g_, s_
OTU207777932406756	k_Bacteria, p_TM7, c_TM7-1, o_, f_, g_, s_
OTU384090939374992	k_Bacteria, p_TM7, c_TM7-1, o_, f_, g_, s_
OTU605298774464213	k_Bacteria, p_TM7, c_TM7-1, o_, f_, g_, s_
OTU450277986561076	k_Bacteria, p_TM7, c_TM7-3, o_, f_, g_, s_
OTU623415528939901	k_Bacteria, p_TM7, c_TM7-3, o_EW055, f_, g_, s_
OTU501650962078283	Unassigned
OTU951234419151283	Unassigned
OTU481207654601089	Unassigned

Outro membro da microbiota *core* da drenagem ácida que merece destaque é a família Chitinophagaceae. Essa família faz parte do filo Bacteroidetes que como descrito anteriormente foi um dos filos mais abundantes nas amostras de drenagem ácida de mina. Além de abundante algumas OTUs foram observadas em todas as amostras analisadas. Dentre elas a OTU501619429576560, classificadas como pertencente ao gênero *Sediminibacterium*, chegou a apresentar até 13900 sequências em uma das amostras, sendo a OTU mais abundante de Chitinophagaceae. Essa família, em especial a espécie *Hydrotalea flava* será amplamente discutida no capítulo 2, pois as células únicas isoladas de AMD através do *pipeline* de *Single Cell Genomics* que tiveram seus genomas sequenciados pertencem à essa espécie. A fim de compreender a relação entre as bactérias isoladas como células únicas e as OTUs atribuídas para Chitinophagaceae, uma análise filogenética do gene 16S rRNA das SAGs e estas OTUs foi realizada, similarmente ao descrito no item *Single-cell sorting, whole genome amplification, and phylogenetic analysis* do capítulo 2.

A filogenia (Figura 11) mostrou que todas as OTUs classificadas como *Sediminibacterium* (destacadas em rosa) estavam fortemente associadas às SAGs, as quais foram identificadas como pertencente ao gênero *Hydrotalea* (dados apresentados no capítulo 2). A OTU501619429576560 juntamente com as SAG B16, SAG L11 e SAG P17 formaram um clado com alta confiabilidade o que nos dá suporte para reclassificar essa OTU *Sediminibacterium* como *Hydrotalea*. Vale considerar que poucas sequências do gene 16S rRNA de *Hydrotalea* estavam depositados nos bancos de dados anteriormente a esse trabalho justificando a atribuição incorreta para *Sediminibacterium*, além disso, nosso grupo sequenciou os únicos genomas de *Hydrotalea* disponíveis até o momento (ANEXO I e capítulo 2).

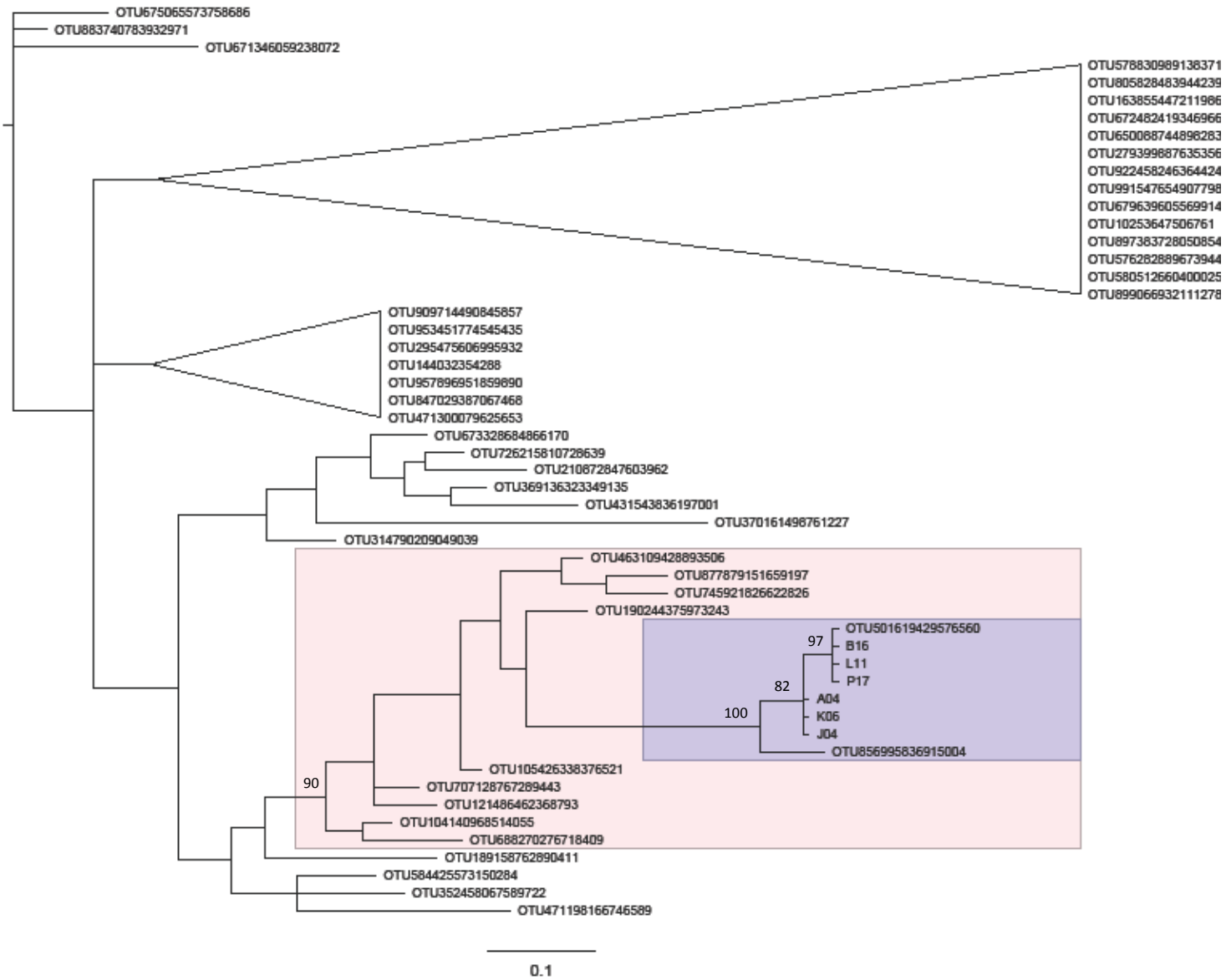


Figura 11 – Filogenia do gene 16S rRNA das células únicas obtidas pelo *pipeline* de *single cell genomics* e das OTUs classificadas como Chitinophagaceae. Em destaque rosa todas as OTUs atribuídas ao gênero *Sediminibacterium*, em azul o clado com as células únicas pertencentes ao gênero *Hydrotalea*. O alinhamento das sequências foi realizado com MAFFT e o método filogenético utilizado foi a inferência Bayesiana através do programa MrBayes (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001) como descrito por PYLRO et al., (2012).

4.3.6. Microrganismos com potencial para biolixiviação e biorremediação

Uma busca por microrganismos capazes de atuar nos processos biotecnológicos importantes para a indústria da mineração foi realizada. Foi feita uma análise manual sobre o total de OTUs atribuídas nas amostras de drenagem e outros pontos da Mina de Sossego a fim de identificar microrganismos capazes de realizar biolixiviação e biorremediação.

Com relação aos microrganismos biolixiviadores, quatro importantes OTUs foram identificadas, sendo elas classificadas como *Acidithiobacillus* (membro do microbioma core) e *Leptospirillum*. O gênero *Acidithiobacillus* é composto por seis espécies: *At albertensis*, *At caldus*, *At ferrooxidans*, *At ferridurans*, *At ferrivorans* e *Acidithiobacillus thiooxidans*. Todas estas são bactérias acidofílicas e autotrófica que crescem utilizando compostos de enxofre inorgânico reduzidos (RISCs- *reduced inorganic sulphur compounds*) como único substrato energético. *At. ferrooxidans*, *At ferridurans* e *At ferrivorans* ainda são capazes de realizar oxidação de Fe^{2+} para Fe^{3+} (MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015; VALDÉS et al., 2008). Todas essas características fazem dessas bactérias ótimas biomineradoras já que conseguem desempenhar a oxidação de enxofre e também ferro necessária para que a biolixiviação do cobre aconteça, como descrito nas equações 2 e 3. É interessante considerar que as OTUs desse gênero só foram observadas nas amostras de AMD (não estão presente na água e sedimento da barragem de rejeito), que é o ambiente mais propício para seu crescimento. O gênero *Leptospirillum* também é composto por bactérias chave para atuarem nos processos de biolixiviação já que são acidófilas oxidadoras de ferro. As OTUs atribuídas a esse gênero também foram exclusivas de AMD com destaque para uma das amostras de abril 2013 que o número total de sequências chegou a 5.910.

Além disso, uma nova espécie de bactéria acidofílica, pertencente ao filo Firmicutes, foi isolada da mesma AMD em formação investigada nesse trabalho, porém em uma época do ano diferente (dezembro 2013). Essa bactéria é caracterizada por ser mesofílica (crescimento ótimo entre 20-45 °C) que realiza a oxidação de Fe^{2+} mas não de enxofre. Devido à essas características têm potencial para atuar nos processos de biolixiviação. O genoma dessa bactéria foi sequenciado e está descrito no ANEXO III.

As bactérias redutoras de sulfato (SRB), que são candidatas à biorremediação da AMD, não foram observadas nas amostras de drenagem ácida. Algumas famílias caracterizadas por possuírem membros das SRBs concentraram-se no sedimento da barragem de rejeito, já que esse era o ambiente mais adequado para o desenvolvimento dessas bactérias que são anaeróbias e não toleram pH ácido (com exceção de algumas descritas na introdução). A Figura 12 traz diversas amostras estudadas no ambiente de mineração e enfatiza a presença das SRBs no sedimento da barragem, além disso ressalta que há uma diversidade dentro de cada família avaliada já que diferentes OTUs (representada por pontos na Figura 12) foram classificadas na mesma amostra.

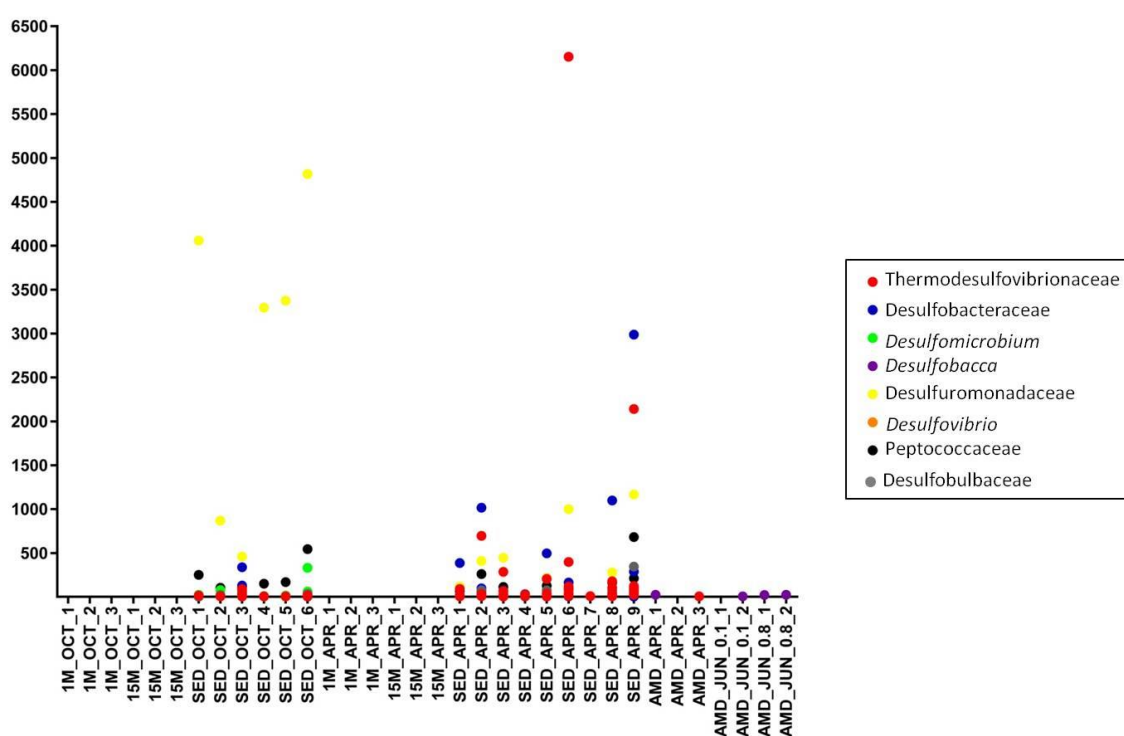


Figura 12 – OTUs classificadas para as famílias de bactérias redutoras de sulfato nos diferentes ambientes da área de mineração. Cada cor representa uma família de SBR. Os pontos representam as diferentes OTUs. Os valores representados no eixo y são abundância de seqüências para cada OTU.

4.3.7. β -diversidade

A fim de compreender as diferenças entre as comunidades microbianas de distintos pontos do ambiente de mineração em diferentes épocas do ano, foi realizada uma análise de coordenadas principais (PCoA) baseada na matriz de distância das OTUs (atribuídas a todas as amostras) calculadas através do método filogenético ponderado UNIFRAC. Além disso, também foi plotado nesse gráfico de PCoA as OTUs mais abundantes entre todas as

amostras. O local em que essas OTUs foram plotadas no gráfico nos permite inferir quais os grupos taxonômicos estão influenciando as diferenças nas comunidades microbianas das amostras analisadas.

O resultado (Figura 13) permite observar claramente uma separação entre as amostras de drenagem ácida de mina, sedimento da barragem de rejeito e água da barragem de rejeito. Indicando que a comunidade microbiana desses três ambientes é distinta. Além disso é possível observar uma separação das amostras pela sazonalidade, por exemplo, nas amostras de água da barragem coletadas no período seco (outubro 2012) independente da profundidade (1m ou 15m) se agruparam mais proximamente quando comparadas as amostras do período chuvoso (abril 2013). O mesmo pode ser observado no sedimento, com exceção de 1 réplica.

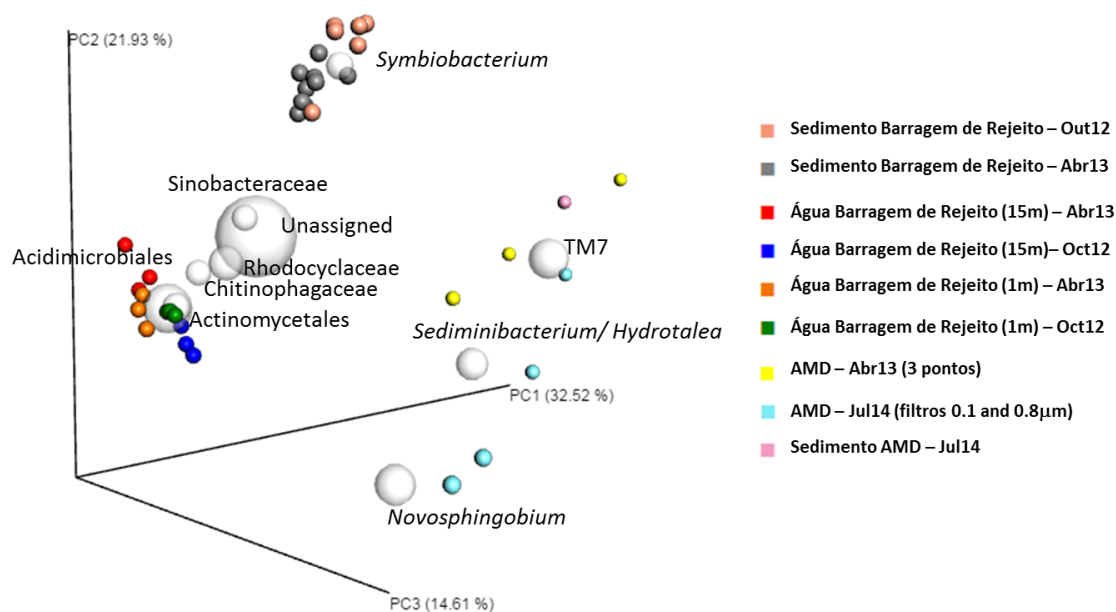


Figura 13 – Análise de coordenadas principais (PCoA) das diferentes amostras do ambiente de mineração (drenagem ácida, água e sedimento da barragem de rejeitos) em diferentes períodos do ano. Os círculos cinza representam OTUs.

As amostras de AMD foram coletadas todas em período chuvoso o que justifica a sua distribuição mais homogênea. Porém, é possível observar que duas das amostras de água de AMD coletadas em julho se separam um pouco das demais. Estas foram as amostras filtradas em membranas de 0.8µm, o que justifica essa separação, já que a biomassa retida nessa membrana é constituída de células maiores, como foi evidenciado na taxonomia (Figura 10) e nesse PCoA (Figura 13), em que OTUs atribuídas ao filo TM7 eram abundantes em todas as amostras de drenagem, exceto essas.

Também é possível observar no gráfico de PCoA que a OTU atribuída a

Sediminibacterium, porém reclassificada nesse trabalho como *Hydrotalea* exerce influência na diferenciação da comunidade microbiana da AMD com relação às demais amostras. Além de abundante, esse grupo parece ter papel importante nos estágios iniciais de formação de drenagens ácidas de mina. As características genômicas de uma espécie desse gênero serão discutidas em detalhes no capítulo a seguir.

5. **CAPÍTULO II – Single cell sequencing unveils the lifestyle and CRISPR-based population history of *Hydrotalea* sp. In acid mine drainage**



Single cell sequencing unveils the lifestyle and CRISPR-based population history of *Hydrotalea* sp. in acid mine drainage

Journal:	<i>Molecular Ecology</i>
Manuscript ID	MEC-17-0316
Manuscript Type:	Original Article
Complete List of Authors:	<p>Medeiros, Julliane; Centro de Pesquisas Rene Rachou, Biosystems Informatics and Genomics Group; Universidade Federal de Minas Gerais, Institute of Biological Sciences</p> <p>Leite, Laura; Centro de Pesquisas Rene Rachou, Biosystems Informatics and Genomics Group; Universidade Federal de Minas Gerais, Institute of Biological Sciences</p> <p>Pylro, Victor; Centro de Pesquisas Rene Rachou, Biosystems Informatics and Genomics Group; Universidade de Sao Paulo Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Department of Soil Science</p> <p>S Oliveira, Francislton; Centro de Pesquisas Rene Rachou, Biosystems Informatics and Genomics Group; Universidade Federal de Minas Gerais, Institute of Biological Sciences</p> <p>Almeida, Viviani ; Centro de Pesquisas Rene Rachou, Biosystems Informatics and Genomics Group; Universidade Federal de Minas Gerais, Institute of Biological Sciences</p> <p>Fernandes, Gabriel; Centro de Pesquisas Rene Rachou, Biosystems Informatics and Genomics Group</p> <p>Salim, Anna; Centro de Pesquisas Rene Rachou, Biosystems Informatics and Genomics Group</p> <p>Araujo, Flávio; Centro de Pesquisas Rene Rachou, Biosystems Informatics and Genomics Group</p> <p>Volpini, Angela; Centro de Pesquisas Rene Rachou, Biosystems Informatics and Genomics Group</p> <p>Oliveira, Guilherme; Vale Institute of Technology – Sustainable Development</p> <p>Cuadros-Orellana, Sara; Centro de Pesquisas Rene Rachou, Biosystems Informatics and Genomics Group; Universidad Catolica del Maule, Centro de Biotecnología de los Recursos Naturales</p>
Keywords:	Acid mine drainage, single-cell genomics, CRISPR-Cas systems, metal resistance, <i>Hydrotalea</i> sp.

Single cell sequencing unveils the lifestyle and CRISPR-based population history of *Hydrotalea* sp. in acid mine drainage

Medeiros, JD^{1,2*}; Leite, LR^{1,2}; Pylro, VS^{1,3}; Oliveira, FS^{1,2}; Almeida, VM^{1,2}; Fernandes, GR¹; Salim, ACM¹; Araújo, FMG¹; Volpini, AC¹; Oliveira, G^{1,4}; Cuadros-Orellana, S^{1,5}

¹ Biosystems Informatics and Genomics Group, René Rachou Research Center, FIOCRUZ-MG. Av. Augusto de Lima, 1715. Belo Horizonte, MG, 30190-002. Brazil.

² Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, UFMG. Av. Pres. Antônio Carlos, 6627. Belo Horizonte, MG, 31270-901. Brazil.

³ Department of Soil Science, “Luiz de Queiroz” College of Agriculture, University of São Paulo, ESALQ/USP. Av Pádua Dias, 11 CP 09. Piracicaba, SP, 13400-970. Brazil.

⁴ Vale Institute of Technology – Sustainable Development. Boaventura da Silva, 955. Belém, PA, 66055-090. Brazil.

⁵ Centro de Biotecnología de los Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Católica del Maule. Avda. San Miguel, 3605. Talca. Chile.

Keywords: Acid mine drainage, single-cell genomics, CRISPR-cas systems, metal resistance, *Hydrotalea* sp.

*Corresponding author: Julliane Dutra Medeiros. Biosystems Informatics and Genomics Group, René Rachou Research Center, FIOCRUZ-MG. Av. Augusto de Lima, 1715. Belo Horizonte, MG, 30190-002. Brazil. Fone: +553133497875. Electronic mail: jdutramedeiros@gmail.com

Running title: Single-cell genomics of *Hydrotalea* sp.

Abstract

Acid mine drainage (AMD) is characterized by an acid and metal-rich runoff that originates from mining systems. Despite having been studied for many decades, much remains unknown about the microbial community dynamics in AMD sites, especially during their early development, when the acidity is moderate. Here, we describe draft genome assemblies from single cells retrieved from an early-stage AMD sample. These cells belong to the genus *Hydrotalea*, and is closely related to *H. flava*. The phylogeny and average nucleotide identity analysis suggest that all single-amplified genomes (SAGs) form two clades that may represent different strains. These cells have the genomic potential for denitrification, copper and other metal resistance. Two co-existing CRISPR-cas loci were recovered across SAGs, and we observed heterogeneity in the population with regards to the spacers sequences, together with the loss of trailer-end spacers. Our results suggest that the genomes of *Hydrotalea* sp. strains studied here are adjusting to a quickly changing selective pressure at the microhabitat scale, and an important form of this selective pressure is infection by foreign DNA.

Introduction

The chemical weathering of metal sulfide-rich ores ultimately leads to the formation of acid mine drainage (AMD), an acidic and metal-rich leachate. During the operational phase of mineral exploration, mine tailings are prone to producing AMD (DOLD, 2014) through a progressive process that can be enhanced by the chemolithotrophic metabolism of the microorganisms inhabiting these minerals (BAKER; BANFIELD, 2003). Extremely acidic mine drainage can be formed several years after mining operations begin and also after they cease as the tailings remain in storage; this drainage pollutes streams and sediments with acidity and high concentrations of sulfate and metals.

The diversity and metabolic abilities of the most abundant microorganisms in AMD systems have been thoroughly reviewed (BAKER; BANFIELD, 2003; RAWLINGS; JOHNSON, 2007). However, aspects from microbial ecology of this environment are still unknown, as the role of non-acidophilic groups previously detected in AMD (Kuang *et al.* 2013; Pereira *et al.* 2014 and Fig. S1, Supporting information). A way to address this issue is through in-depth microbial community sequencing approach. Metagenomics has consistently helped to shed light on the metabolic potential of microbial communities in many habitats (LLORENS-MARÈS *et al.*, 2015; MEDEIROS *et al.*, 2016; WEIGOLD *et al.*, 2016), but it is limited by the possibility of unequivocally assigning assembled sequences to their taxa of origin (BROWN, 2015). In this context, single cell genomics (SCG) represents an additional tool for studying the microbial genomes within a community, regardless of their cultivability (STEPANAUSKAS, 2015). In addition, SCG allows for the study of the genomic variability and evolution of natural microbial communities (MARTIJN *et al.*, 2015).

Chitinophagaceae (phylum Bacteroidetes) comprises a ubiquitous bacterial family that was recently described in soil (BAILEY *et al.*, 2013; LV *et al.*, 2016), freshwater (LEITE *et al.*,

2016; SIDDIQI; IM, 2016), a hypersaline lake (VAVOURAKIS et al., 2016), hot springs (HANADA et al., 2014b), maize roots (GAO et al., 2016) and human tumors (LO et al., 2015). This is a clade with strong taxonomic support, even though few genomes have been fully sequenced to date. Little is known about the biogeography and the adaptive traits of these organisms, but our data suggest that this family represents an important fraction of the microbial community in an acid mine drainage that is under formation in Brazil (Fig. S1, Supporting information).

Here, we describe the genomes of single cells that were retrieved from a new, moderately acidic mine drainage site in the Brazilian mineral province of Carajás. The single amplified genomes (SAGs) share sequence similarity with *Hydrotalea* sp. strains (Chitinophagaceae) isolated elsewhere. We discuss aspects related to the metabolic capabilities of this taxon as well as insights into their population history based on their CRISPR inventory.

Material and Methods

Environmental data and metadata

Samples for single cell genomics were collected from the outflow of water near a low-grade chalcopyrite ore pile in Sossego Mine (Brazilian mineral province of Carajás) (06°25'.610”S 050°03'089” W), in July of 2014. They were sent to the Bigelow Single Cell Genomics Center (SCGC). Chemical analyses were performed at the SGS Geosol (Brazil). Metagenomic analysis was carried out in samples from the same site and date, and the data produced, which is available under accession numbers SRR5161794, SRR5161788, SRR5161795, SRR5161805 were used here for comparison purpose.

Single-cell sorting, whole genome amplification, and phylogenetic analysis

Sample processing through the single-cell genomics pipeline was performed at the Bigelow SCGC Laboratory as previously described by Martinez-Garcia *et al.* (2012). In brief, single-cell isolation was obtained by Fluorescent Activated Cell Sorting, and the cells were subsequently lysed. The extracted DNA was amplified by multiple displacement amplification (MDA) (SWAN *et al.*, 2011) and further screened by SSU rDNA PCR using primers for Bacteria (27F:5'-AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3'/ 907R:5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3').

For phylogenetic analysis, a multiple alignment of 16S rDNA amplicon sequences was performed using the MAFFT aligner (KATOHI; STANDLEY, 2013). Bayesian Inference was performed using the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method, as implemented in MrBayes (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). The best nucleotide substitution model was chosen using MrModelTest v2 (NYLANDER, 2004). Two simultaneous and independent runs, each containing one cold and three heated chains, were processed for 10^7 generations, each starting from a random tree with random parameters (topology, branch lengths and model parameters). These parameters were sampled every 1,000 generations, resulting in 10^4 samples. After running the chains, we burned-out 25 % of the first generations, checked for chain convergence (<0.01) and used the remaining topologies (7,500) to build a majority-rule consensus tree for the alignments. The trees were drawn with FigTree v.1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Sequencing, assembly and annotation

We selected six SAGs for genomic sequencing. A short-insert paired-end library was

constructed for each SAG. Sequencing (2x150 bp) was performed on a NextSeq platform (Illumina Inc., CA, USA), yielding a total of 85,808,358 reads. The quality control of the sequence data was performed with Trimmomatic v0.32 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). The reads were assembled *de novo* using SPAdes 3.0 (BANKEVICH et al., 2012) in single-cell mode, with default k-mer sizes. The assembled contigs were subjected to Rapid Annotation using the Subsystem Technology (RAST) pipeline (AZIZ et al., 2008), for genomic annotation. Genome completeness was estimated using CheckM (PARKS et al., 2015) in the taxonomic-specific mode. Bacteroidetes was used as the marker lineage, with its 419 genomes and 286 marker genes.

Comparative analysis and fragment recruitment

Genomic comparisons were performed between the six SAGs and the genomes of *Hydrotalea flava* CCUG 51397^T (LUHG00000000.1), *H. sandarakina* AF-51^T (JGI Project Id: 1049057) and *Sediminibacterium salmoneum* NJ-44^T (NZ_AXZP00000000.1) (AYARZA; FIGUEROLA; ERIJMAN, 2014). The genome of *Hydrotalea flava* CCUG 51397^T was previously sequenced by our group (LEITE et al., 2016) and detailed here for the first time. Average nucleotide identity using both BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997) best hits (one-way ANI) between two genomic datasets, was calculated using JSpecies (RICHTER; ROSSELLO-MORA, 2009) as proposed by Goris *et al.*, 2007.

The recruitments of metagenomic reads over a reference SAG was carried out with BLASTN, and the hits were filtered using the following criteria: minimal query coverage of 40%, shared identity higher than 80% and an e-value $\leq 1e-4$ (MIZUNO; RODRIGUEZ-VALERA; GHAI, 2015). The metagenomics datasets (Table S1, Supporting information) used to perform the recruitment analysis included sequences from water and sediment that were

collected from a copper mine tailings dam, as previously described (MEDEIROS et al., 2015) and sequences from two acid mine drainages of the same mine. We also used a metagenomic dataset of AMD biofilm from Richmond Mine, Iron Mountain, CA (MG-RAST ID 4441138.3).

CRISPR-Cas analysis

Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) arrays were identified in SAGs, reference genomes and metagenomic contigs using the CRISPRFinder tool (GRISSA; VERGNAUD; POURCEL, 2007) and CRISPR Recognition Tool (BLAND et al., 2007). Cas proteins were identified using the CRISPR-Cas classification system developed by Makarova *et al.* (2011) and Makarova *et al.* (2015). The leader position of the CRISPR array was predicted using CRISPRdirections (BISWAS; FINERAN; BROWN, 2014). The spacers found in the CRISPR arrays were compared using an *in house* Perl script (https://github.com/big-cpqr/scripts/blob/master/compare_spacer.pl).

All the spacers were searched for their similarity to other sequences in AMD metagenomic contigs and to the GenBank nucleotide sequence database using BLASTN (with its word size of 7). Matches were considered significant if they had an e-score smaller than $1e^{-5}$. We considered only perfect matches that represented a 100% match across 100% of the spacer length (SUN et al., 2016).

To test the reliability of the CRISPR locus from SAG B16, we used bowtie2 (--phred33 --very-sensitive) (LANGMEAD et al., 2009) to align the filtered B16 reads against each of the contigs containing CRISPR array type I-B from SAGs L11 and P17.

Cas1 Phylogeny

The Cas1 proteins (which were translated *in silico*) from SAGs J04, B16, L11, P17 and K06, *Niabella soli* JS13-8^T (CP007035.1), *Sediminibacterium sp.* OR53 (GCA_000515315.1), *Sediminibacterium sp.* C3 (GCA_000508085.1), *H. flava* CCUG 51397^T (LUHG00000000.1) and *H. sandarakina* AF-51^T (JGI Project Id: 1049057) were aligned with 194 Cas1 proteins from CRISPR-cas systems type I-B and II-C used in the phylogenetic tree constructed by Makarova *et al.* (2015) (for a complete list of Cas1 proteins, see Table S2, Supporting information). Multiple sequence alignments were performed using a combination of MUSCLE (EDGAR, 2004) and MAFFT (KATO; STANDLEY, 2013). Phylogenetic trees were reconstructed using the maximum likelihood method implemented in MEGA6 (TAMURA *et al.*, 2013), with the LG evolutionary model.

Sequence accession

The genomic data were submitted to the European Nucleotide Archive and are accessible under the BioProject identifier PRJEB14091. The assembled SAG sequences were deposited in DDBJ/EMBL/GenBank under accession numbers ERS1199780, ERS1199781, ERS1199782, ERS1199783, ERS1199784 and ERS1199785.

Results and Discussion

Chemical conditions in AMD

Water from a chalcopyrite early stage formation AMD site had a pH of 5.02 and contained high concentrations of sulfate (1,170 mg.L⁻¹) and copper (74.7 mg.L⁻¹). These values are consistent with the acid mine drainage composition, as described by Johnson and Hallberg

(2003) and Kuang *et al.* (2013) (for more detailed chemical analysis, see Table S3, Supporting information).

Phylogenetic affiliation of single cells and genome statistics

Eleven cells that were assigned to the family Chitinophagaceae (phylum Bacteroidetes) were sorted from the AMD site. The phylogenetic profile of the Chitinophagaceae members (Fig. 1) suggests that the SAGs constitute a monophyletic clade, together with *Hydrotalea sp.* and *Sediminibacterium sp.* Furthermore, the SAGs were grouped into two well-supported clades that may represent two different strains of the same species (Fig. 1). The *Sediminibacterium sp.* nju-AMD4 strain (FJ915149.1, Taxonomy ID 672102 - also isolated from an AMD), grouped together with all SAGs in the 16S rRNA gene phylogeny, and should be reassigned to the same species as these SAGs.

Six SAGs representing clade I (A04, K06, and J04) and II (B16, L11, and P17) were selected for sequencing, based on their MDA quality standard. The partially reconstructed genomes varied from 710 Kb to 2.08 Mb. The genome completeness estimate ranged from 24.5 to 63.5%. The numbers of coding sequences predicted for the SAGs varied from 749 to 2,095, and the coding density was closer to 90% for all of them. The complete statistics for these draft genomes are shown in Table 1.

The complete 16S rDNA from SAGs share more than 99% identity to the one from *H. flava*, and the whole ribosomal operon is 96% identical. The pairwise average nucleotide identity (ANI) among the SAGs ranged from 97.7% to 99.9%, with the highest values being obtained when comparing SAGs from the same clade (Table S4, Supporting information). The average ANI values of all the SAGs against *H. flava* CCUG 51397T, *H. sandarakina* AF-51T and *Sediminibacterium salmoneum* NJ-44T are 94.3%, 76.8% and 68.3%, respectively, as

shown in Table S4, Supporting information. Taken together, these results support the idea that the six SAGs described here belong to the same species, while clades I and II represent different strains and SAGs classified within the same clade are highly similar over the majority of their genome length. The SAGs contain genomic regions with low shared identity relative to *Sediminibacterium* and *H. sandarakina* genomes, but high shared identity relative to *H. flava* (Table S4, Supporting information). These findings indicate that these SAGs represent a same species within the genus *Hydrotalea*, at the species boundary of *H. flava*.

Distribution of SAGs in the mine environment

AMD environments host high abundances of Chitinophagaceae family members, as reported by metataxonomics (Figure S1, Supporting information). To verify the presence of sequences resembling those from the SAGs in the resident community of distinct mine habitats (Table S1, Supporting information), we used a fragment recruitment analysis of metagenomic reads for each single amplified genome as a reference. The two *Hydrotalea* sp. strains represented by the SAGs are more abundant (the recruited reads represented an average of 3% of the total reads in the metagenome) in the sample of origin (AMD), as should be expected (Fig. 2). The SAGs were not found in any of the tailing dam samples (TD_1M, TD_15M, and TD_SED), but was instead within a more distant taxon, since the recruited reads had a median shared identity of 82% (Fig. 2a). No sequences from the Richmond Mine datasets were recruited by the genomes, meaning that no *Hydrotalea*-like genomes were represented in this sample. The Richmond Mine is a sulfidic ore body that was operated intermittently between the 1860s and 1962 to collect Au, Ag, Cu, Fe, Zn, and FeS₂ (DRUSCHEL et al., 2004). The AMD formed there is a well-established and highly acidic (pH < 2) environment, harboring a low-diversity but adapted acidophilic microbial community (BAKER; BANFIELD, 2003; DRUSCHEL et

al., 2004).

The recruitment obtained with the acid mine drainage dataset (AMD2), which was sampled in the same copper mine but in a different site and year, highlights the presence of *Hydrotalea* sp. However, these bacteria were present in lower relative abundance compared to the site from which the SAGs were isolated (Fig. 2b, Fig. S2, Supporting information). These results suggest the prevalence of *Hydrotalea* sp. (represented by SAGs) in water from acid mine drainage at the early stage of formation (Fig. 2).

Genome content analysis

All members of the Chitinophagaceae family are aerobic or facultative anaerobic gram-negative rod-shaped cells. Some species present gliding motility and the ability to degrade chitin (ROSENBERG, 2014). These characteristics were encoded in most of the SAGs recovered in this study.

Gene clusters coding for nitrate, nitrite and nitrous oxide reduction have been found in the SAGs (Fig. S3, Supporting information). Denitrification genes are also present in the genome of *H. flava* CCUG 51397^T (LEITE et al., 2016). We identified a 9.9 Kb-long conserved syntenic genomic region shared by the *H. flava*, P17, L11 and J04 genomes, which harbors genes for the nitrite reductase [NAD(P)H] large and small subunits (EC 1.7.1.4), a nitrate/nitrite transporter, an assimilatory nitrate reductase large subunit (EC1.7.99.4), and a sequence containing a putative conservative domain of nitrate reductase. The SAGs B16 and K06 also host some of the genes from the *nir* and *nar* operons. Another syntenic region in the *H. flava*, B16, L11, J04 and K06 genomes contains a regulator sequence that is dependent of the nitric oxide (*norA*), nitrous-oxide reductase (EC 1.7.99.6) and nitrous-oxide reductase maturation genes (*nosD*, *nosF*, and *nosY*). Xie and collaborators (2011) studied the metabolic potential of

the microbial community in acid mine drainage using a GeoChip array, and they identified a high abundance of genes involved in the denitrification process across five AMD samples from a copper mine in China. Méndez-García *et al.* (2015) reviewed the metabolic pathways in AMD system, emphasizing the potential for denitrification in this environment. Furthermore, when stimulated, this system is an important process that contributes to the reduction of acidity (BAESEMAN; SMITH; SILVERSTEIN, 2006). Based on these observations, we believe that *Hydrotalea*, including the group whose single-cell genomes are described here, may play a role in the denitrification process at the sites where they occur. This role is especially relevant in AMD waters because low pH and soluble Cu have been shown to reduce the overall denitrification rates (PAPIRIO *et al.*, 2014). Nevertheless, the extent of the contribution of these bacteria to denitrification and the range of environmental conditions under which this process occurs requires further investigation.

The acid mine drainage described here is a metal-rich environment that is especially rich in copper (Table S3, Supporting information). Despite being an essential trace element for biological processes, excess copper is toxic and leads to the inactivation of enzymes and to intracellular oxidative damage (MACOMBER; IMLAY, 2009). The genomes of all single cells and also that of *H. flava* contain genes encoding Cu resistance determinants (Table S5, Supporting information). One example is CopA, a copper-translocating P-type ATPase and component of the *cue* system, which is responsible for pumping excess Cu⁺ out of the cytoplasm (BONDARCZUK; PIOTROWSKA-SEGET, 2013). A second example is the multicopper oxidase component of the *cue* system, which is responsible for oxidizing Cu (I) to the less toxic Cu (II). A gene encoding the cytoplasmic Cu homeostasis protein CutC was also identified. Another system involved in copper resistance is *cus*, which, together with multicopper oxidase, acts in periplasmic copper detoxification. We also identified *cusA* in all the SAGs and in the *H. flava* genome. CusA is a membrane-bound proton-driven transporter

and is a member of the resistance-nodulation-division (RND) protein superfamily. It is required for copper efflux from the periplasm to the cell exterior (BONDARCZUK; PIOTROWSKA-SEGET, 2013).

The genomes also harbor an operon that codes for a CzcCBA heavy metal efflux pump. The CzcCBA pump is composed of CzcA, an RND-membrane efflux pump similar to CusA, the membrane fusion protein CzcB and the outer membrane factor CzcC. This system is one of the major efflux mechanisms employed by bacteria to survive under heavy metal stress, especially from cobalt, zinc and cadmium (NIES, 2003). The genes that encode determinants for resistance to copper and other metals are organized in a 35Kb-long region in the genome of *H. flava* (Fig. S4, Supporting information). An in-depth comparison between the *H. flava* genome and the SAGs is not yet possible because only partial single cell genomes were produced, and their assemblies are fragmented, probably due to multiple displacement amplification bias.

Microevolutionary history of SAGs based on their CRISPR-cas inventory

The CRISPR-cas system is an adaptive and heritable immunity mechanism widespread in prokaryotes. The CRISPR array is composed of short repeats interspersed with unique spacers (MAKAROVA et al., 2011; RATH et al., 2015), which are small pieces of foreign DNA primarily derived from viruses and plasmids. As such, the spacers represent chronological records of selfish element-infecting prokaryotic cells and their ancestors (RATH et al., 2015; SUN et al., 2016), and the comparative analysis of CRISPR-Cas sequences allows for the assessment of the adaptive dynamics and the microevolution of bacterial populations.

Here, we characterized the CRISPR-cas system in the SAGs and based on their architecture, SAGs L11, B16, P17 and J04 were found to encode two different types, namely I-

B and II-C (Fig. 3). The type I-B operon, was partially complete in the SAGs (Fig. 3a). We found the spacers sequences conserved among SAGs in the same clade. SAGs L11 and P17 (clade II) have an identical repeat-spacer array structure from the trailer to the leader end, with 28 spacers. SAG B16 (clade II) has 17 spacers that are identical to the ones from the leader end of L11 and the P17 array, except for the older spacers (trailer end), which are missing. The CRISPR structure of SAG B16 was confirmed by mapping the total set of reads from B16 to the contigs containing the CRISPR arrays from SAGs L11 and P17, which resulted in identical independent assemblies. We observed a disrupted synteny that was represented by an inversion in the *cas* gene cluster of SAG B16, compared to those of SAGs L11 and P17 (Fig. 3a). We also used stringent alignment criteria to confirm that no reads from the SAG B16 mapped to the older spacers present in SAGs L11 and P17.

Assuming that SAGs from the same clade are subject to the same amplification bias that is introduced by single cell-MDA reactions, we hypothesize that SAG B16 lose their older CRISPR spacers. This type of loss has been shown to occur and to contribute to intrapopulation heterogeneity (SUN et al., 2016; TYSON; BANFIELD, 2008). From an ecological view, the loss of older spacers may facilitate the maintenance and transcription of spacers targeting viruses that are currently in the environment, making the adaptive immunity in prokaryotes a more dynamic process.

The type I-B CRISPR locus found in J04 (clade I) is very similar (~99% identity) to those found in the SAGs of L11, P17 and B16, including the repeat sequence (Fig. 3a). However, none of the 24 CRISPR spacers are shared among the SAGs in clade II. The spacer repertoire of the CRISPR arrays from bacterial clade I and II also support that these cells represent different strains of *Hydrothalea*. The CRISPR-based heterogeneity of the Chitinophagaceae population documented here suggests that these organisms may be responding to a quickly changing selection pressure imposed by the infection of foreign DNA.

Phage predation may be a more important contributor to the maintenance of diversity within bacterial populations than the mutation rate alone (RODRIGUEZ-VALERA et al., 2009; WILLIAMS, 2013).

A second CRISPR locus of type II-C (CHYLINSKI; LE RHUN; CHARPENTIER, 2013; MAKAROVA et al., 2015) is observed in the B16, L11, P17 and J04 genomes (Fig. 3b). In addition to the *cas* genes, we recovered a small CRISPR array in the assemblies. Despite being small, the repertoire of spacers in these CRISPR systems also support the separation of cells into two well-defined clades (Fig 3b). The genome of *H. flava* also contains a type II-C CRISPR locus; however, its *cas9* component has a low nucleotide identity (48.5%) relative to the *cas9* found in the SAGs. *H. flava* and the SAGs have identical repeat sequences, but their spacers are distinct, reflecting the different phage/plasmid exposure histories of the geographically isolated populations from which these lineages were retrieved (KÄMPFER; LODDERS; FALSEN, 2011).

We also investigated the presence and types of CRISPR-cas systems in other members of the Chitinophagaceae family, although there are only a few sequenced genomes available. The genomes that had the CRISPR-Cas system were *Niabella soli* JS13-8^T, *Sediminibacterium* OR53, *Sediminibacterium* C3 and *H. flava* CCUG 51397^T. The *H. sandarakina* AF-51^T genome has *cas* loci, but is CRISPR-negative. All the CRISPR-cas systems recovered here are classified as type II-C; the array repeats are 47 nt-long and contain a conserved signature motif (Fig. S5, Supporting information). To support this classification, we refurbished part of the phylogenetic tree of Cas1 as proposed by Makarova and colleagues (2015)(Fig. 4). The resulting tree confirms our classification based on CRISPR-cas loci architecture. The SAGs have two distinct Cas1 that are more similar to the others from the same CRISPR-cas type than the second genome copy. Based on the Cas1 type II-C, the SAGs form a monophyletic clade with other Chitinophagaceae and other members of the phylum Bacteroidetes (Fig. 4), which is consistent

with the findings of Makarova *et al.*, (2015) and Chylinski *et al.*, (2014). The phylogeny of type II-C is consistent with the Chitinophagaceae species tree shown in Fig. 1, suggesting a similar evolutionary pattern for this system and 16S rRNA genes. However, type I-B Cas1 sequences separate these genomes into two clades, with all SAGs being grouped together (Fig. 4). The phylogeny proposed by Makarova *et al.* (2015) shows that Cas1 sequences from type I-B are scattered across the tree, which is suggestive of a primarily horizontal evolution for this CRISPR-cas system. Comparative genomics studies also indicate that CRISPR-Cas loci undergo horizontal gene transfer (HGT) (Chakraborty *et al.*, 2010; Takeuchi *et al.*, 2012; Makarova *et al.*, 2015). Taken together, this information supports our hypothesis that the SAGs or their ancestor cells had a CRISPR-Cas type II-C that is conserved in the Chitinophagaceae family, and a CRISPR-Cas type I-B system that was likely acquired through HGT. It is important to mention that the SAGs harbor transposases and features related to conjugative transposons (CTNs) (e.g., transfer operon *traEFGIJKMN*) that may be contributing to the HGT in *Hydrotalea* sp.

We also addressed the CRISPR spacer repertoire of environmental sequences related to the SAGs and their possible targets. We used the metagenomic sequences that were obtained from the same AMD samples from which the SAGs were retrieved to search for CRISPRs with similar structures and repeats to those found in the SAGs. For type I-B, we found a contig containing a CRISPR array (including all spacers) and *cas* genes that are highly similar to those found in L11 and P17 (Fig. 3a). Two other CRISPR arrays were found; one of them has 11 spacers that are identical to those in the leader end of J04, together with novel spacers and; a second array with spacers that are distinct from those found in the SAGs, except for one (Fig. 3a). For CRISPR type II-C, it was possible to recover arrays with a larger number of new spacers (Fig. 3b). Single cell genomics allied to CRISPR analysis provide evidence of intrapopulation genetic variability in *Hydrotalea* species. The characterization of the

environmental repertoire of CRISPRs suggests that this diversity is even bigger.

We were unable to identify putative targets for the SAGs CRISPRs. When comparing the SAG spacers to the contigs from environmental sequences, no significant match is found. It is possible that the phages from which these spacers are derived were missed during the filtering process we used to concentrate metagenomic samples.

Concluding remarks

Our data indicate that *Hydrotalea* sp., represented here as SAGs, is abundant in the early stage formation of acid mine drainages, and contains adaptive traits that allow it to cope with high metal concentrations in this environment. We also predict the potential for denitrification, metal-resistance and HGT. The CRISPR-based heterogeneity of cells suggests that the populations are adjusting to a quickly changing selective pressure at a microhabitat scale.

Acknowledgements

This work received financial support from Vale (grant no. 1786221 to GCO/GRF and to the next generation sequencing and bioinformatics platforms of FIOCRUZ-Minas). Additional funding was received from FAPEMIG (RED-00014-14 to GO). GCO is a CNPq fellow (309312/2012-4).

Data accessibility

The assembled SAG sequences were deposited in DDBJ/EMBL/GenBank under accession numbers ERS1199780, ERS1199781, ERS1199782, ERS1199783, ERS1199784 and

ERS1199785.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JDM, GCO, ACV, SCO. Performed the experiments: JDM, VMA, ACMS, FMGA. Analyzed the data: JDM, LRL, VSP, FSO, GRF. Contributed reagents/materials/analysis tools: JDM, LRL, VSP, FOS, GRF, ACV, GCO, SCO. Wrote the paper: JDM, LRL, VSP, FOS, VMA, GRF, ACMS, FMGA, ACV, GCO, SCO.

Figures and tables

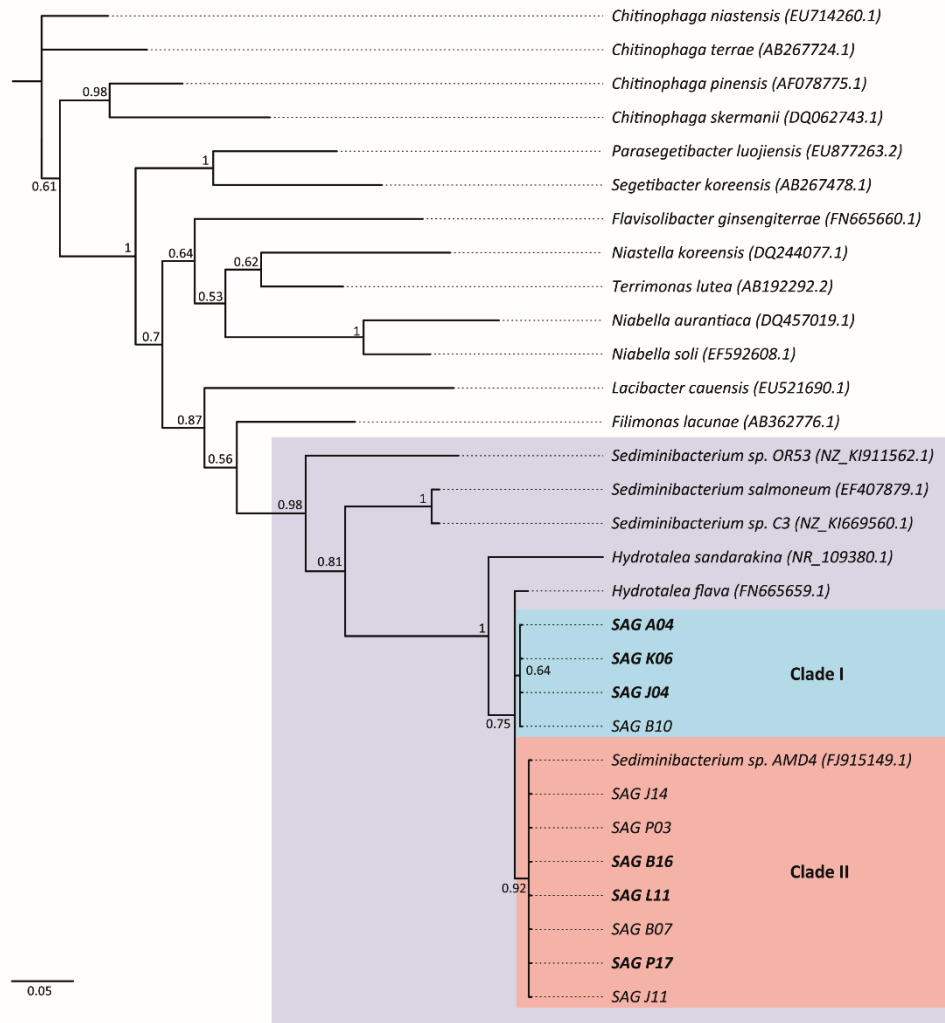


Figure 1- Phylogeny of the 16S rRNA gene sequence from the SAGs (in bold) and their close relatives in GenBank.

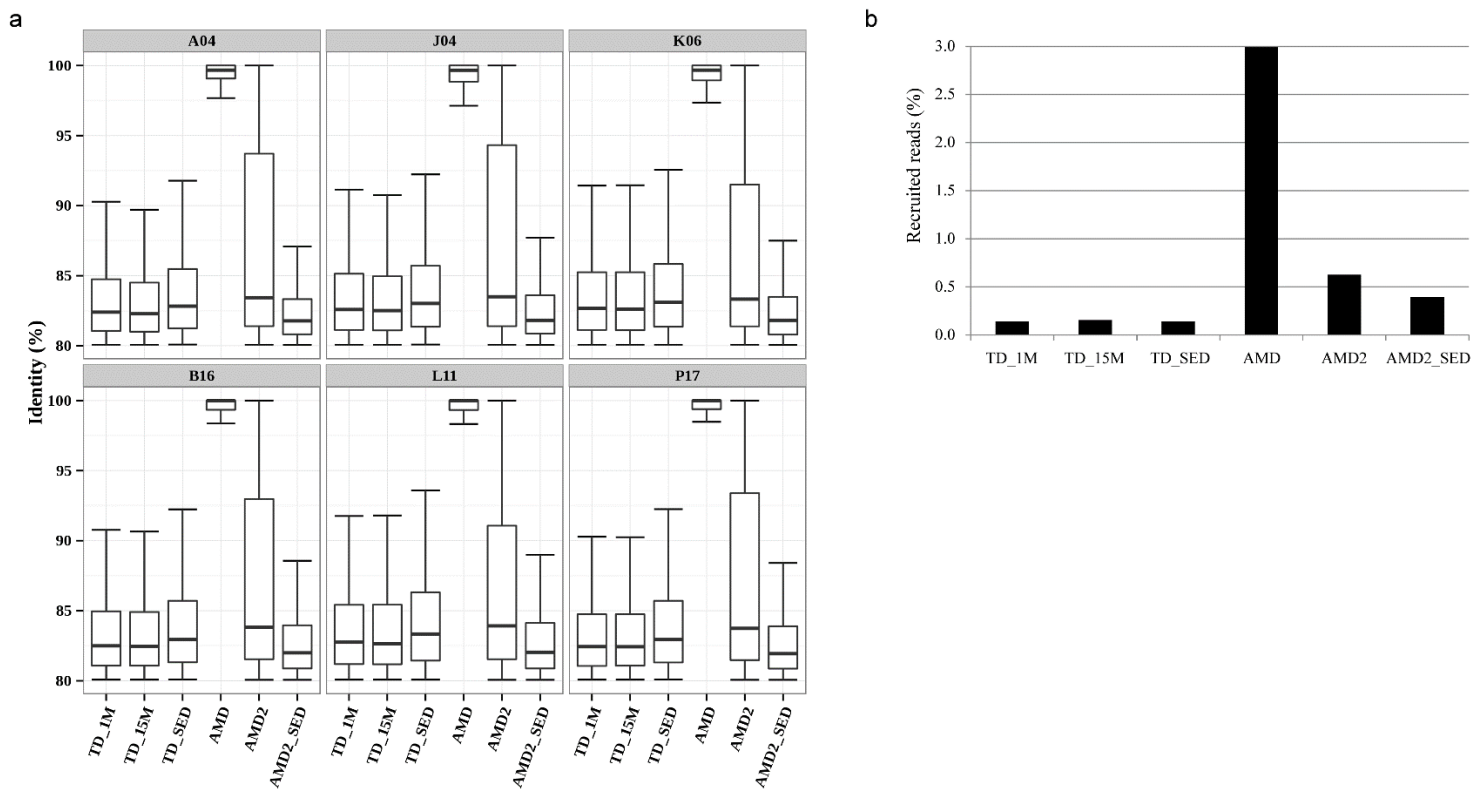
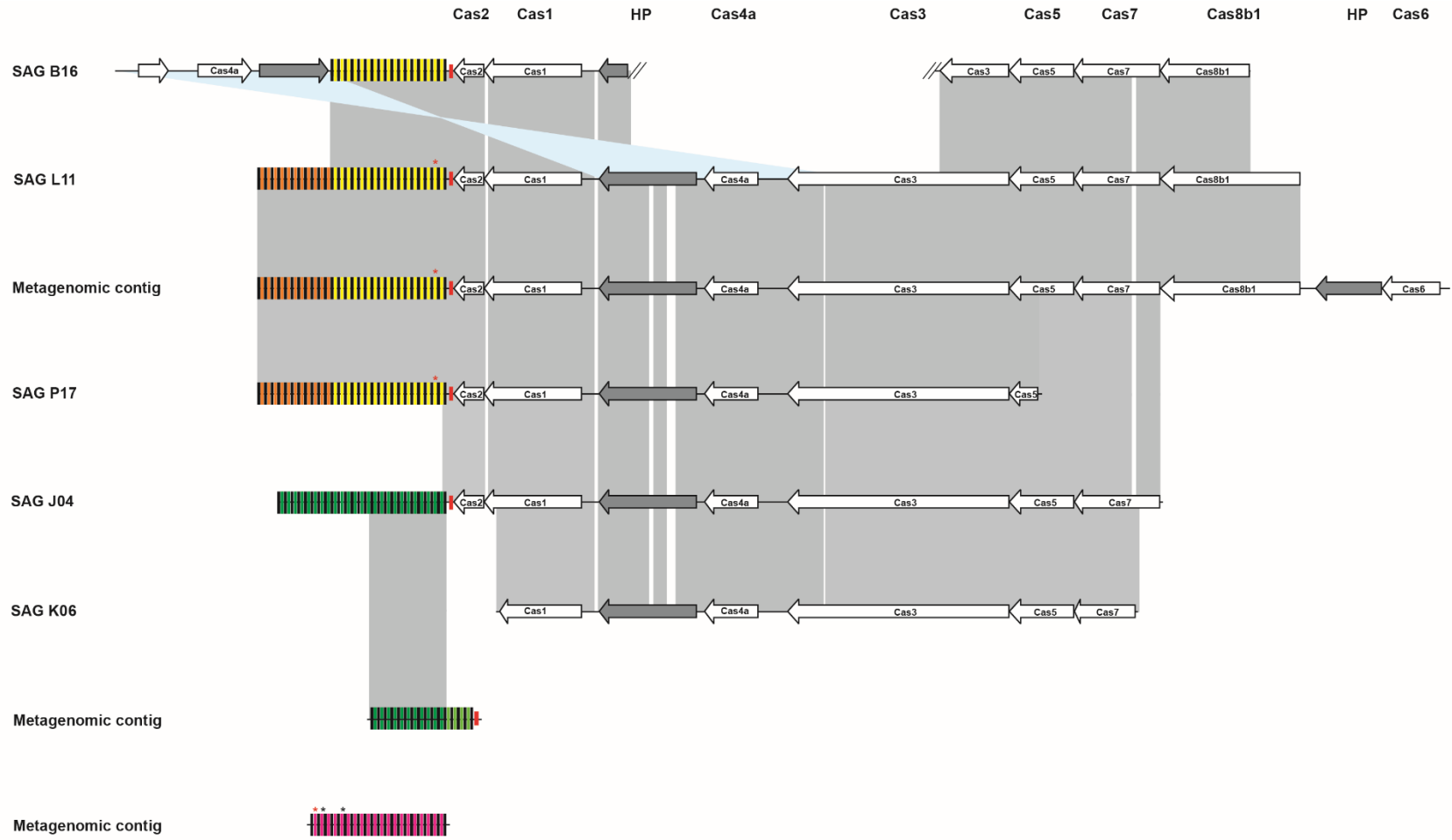


Figure 2 - Fragment recruitment of metagenomic data against *Hydrotalea* sp. single-amplified genomes. The recruitments of the SAGs over different metagenomes were performed using BLASTN (Altschul et al., 1997), and hits were filtered using the following criteria: minimal query coverage of 40%, shared identity higher than 80% and e-value $\leq 1e-4$ (Mizuno et al., 2015). A- The distribution of recruited reads at a nucleotide identity of 80–100%. B- Average of SAGs recruited reads in the metagenomes. The percentage of recruited reads was calculated using the reads recruited per base of the metagenome. TD_1M: Water from Tailing dam surface; TD_15M: Water from 15m depth of tailing dam; TD_SED: Tailing dam sediment; AMD: Water from acid mine drainage early stage formation (Site 1); AMD2: Water from acid mine drainage early stage formation (Site 2); AMD2_SED: Sediment from acid mine drainage early stage formation (Site 2).

a



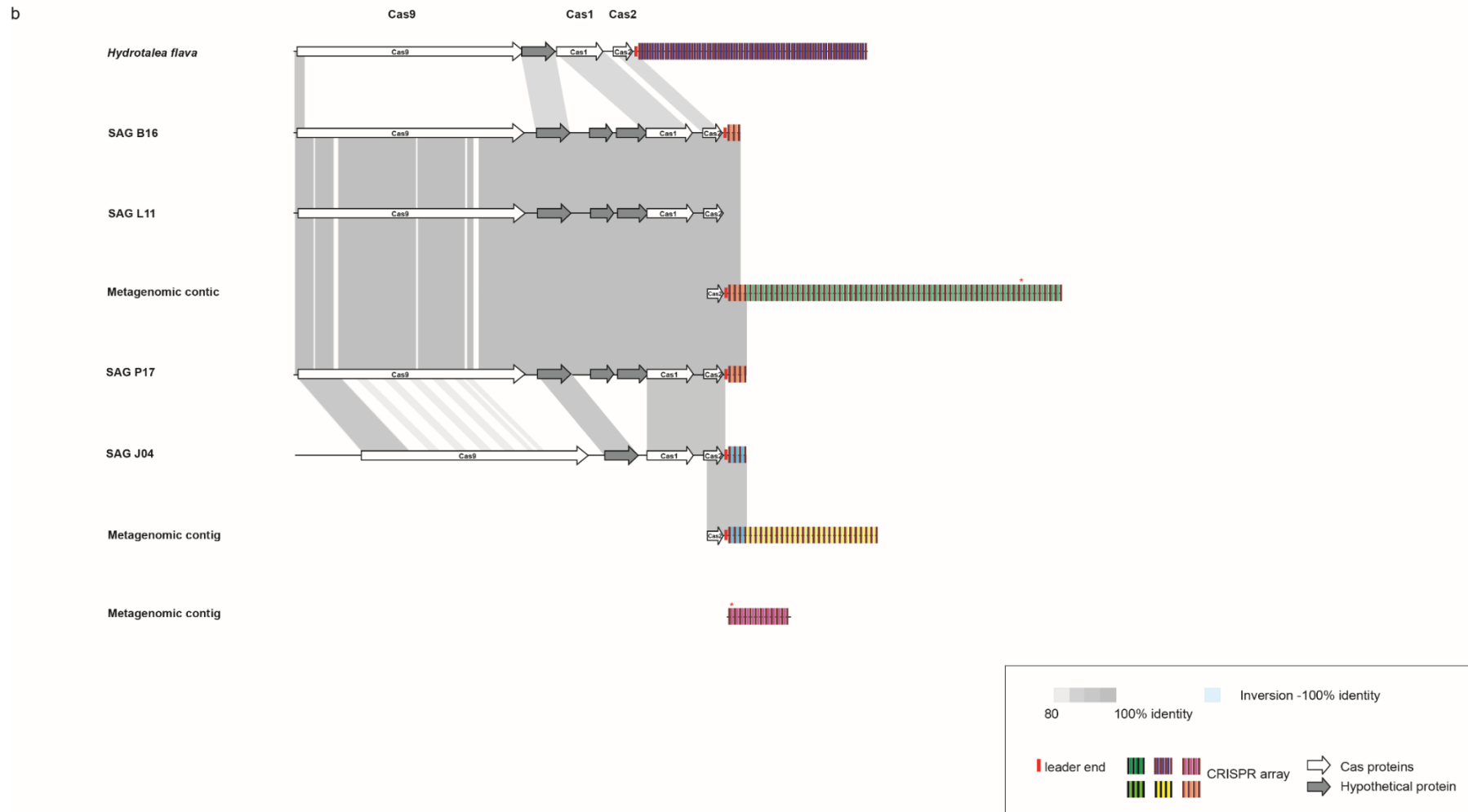


Figure 3 - CRISPRs loci found in *Hydrotalea* sp. SAGs and AMD metagenomic contigs. A) Type I-B; B) Type II-C. The comparison between genomes and metagenomic contigs was performed with BLASTN ($e\text{-value} \leq 1e\text{-}3$) and visualized in the Artemis Comparison Tool (Carver et al., 2005).

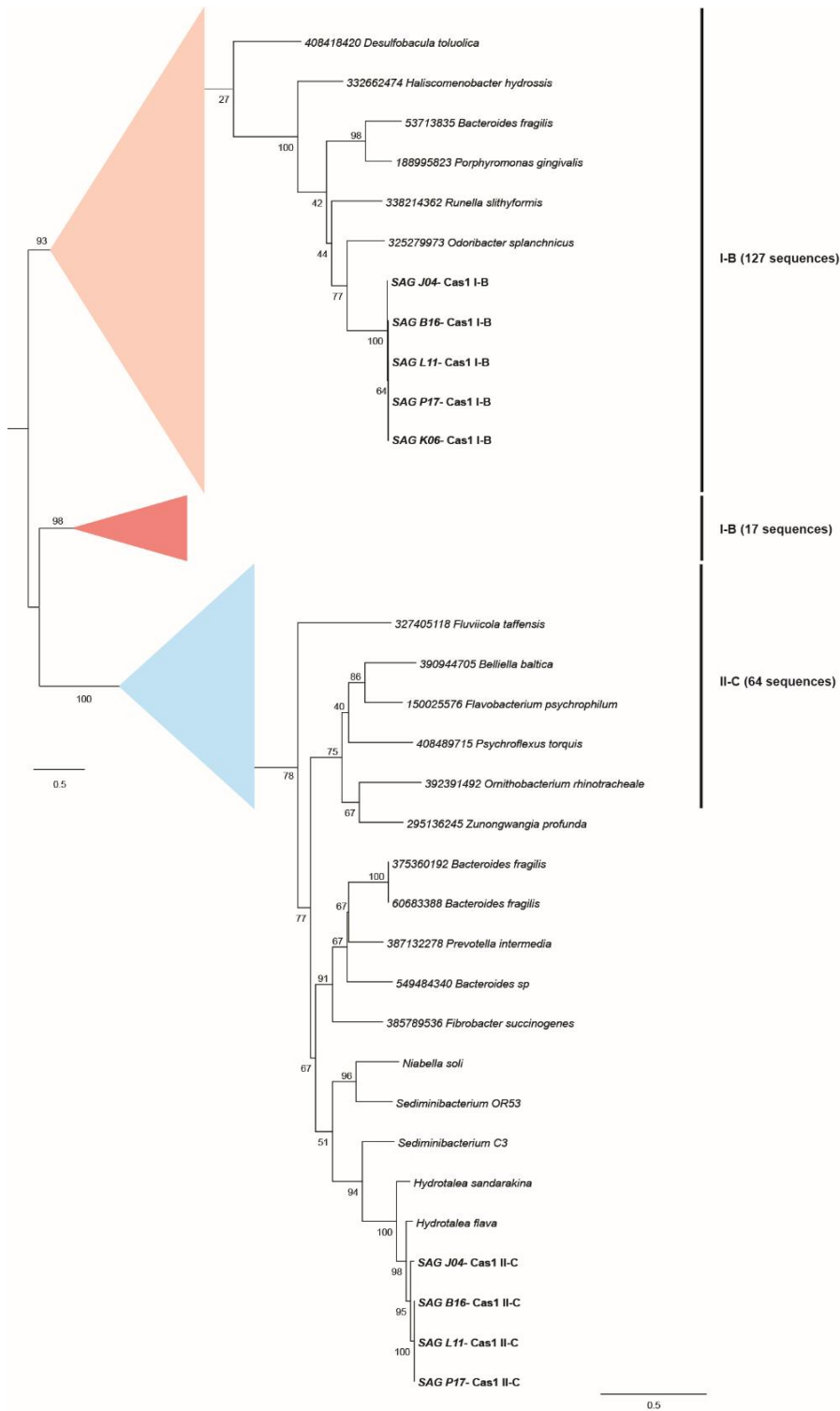


Figure 4- Phylogenetic tree for Cas1 proteins from CRISPR-Cas type I-B and II-C. The tree was generated using maximum likelihood, with 500 bootstrap replicates, using the LG evolutionary model. Cas1 from SAGs are represented in bold.

Table 1- The Chitinophagaceae single-amplified draft genomes features.

Feature	SAGs					
	A04	J04	K06	L11	B16	P17
Number of contigs*	68	116	90	92	125	131
N50(bp)	18064	21646	23214	22041	24033	26556
Total Size (bp)	710749	1579673	1106849	1105265	1752129	2082446
Completeness estimate (%)	24,5	46,0	36,0	28,1	43,6	63,5
GC%	36	37	37	37	37	37
CDS	749	1651	1153	1148	1765	2095
Coding Density (%)	91,0	90,5	90,2	89,9	90,2	90,1
rRNA	2 (5S/23S)	3 (16S/5S/23S)	3 (16S/5S/23S)	3 (16S/5S/23S)	3 (16S/5S/23S)	3 (16S/5S/23S)
tRNA	6	18	17	13	23	25
CRISPR Arrays	-	2	-	1	2	2
Repeat region	6	23	15	18	20	34

*Higher than 2000bp

Supporting Information

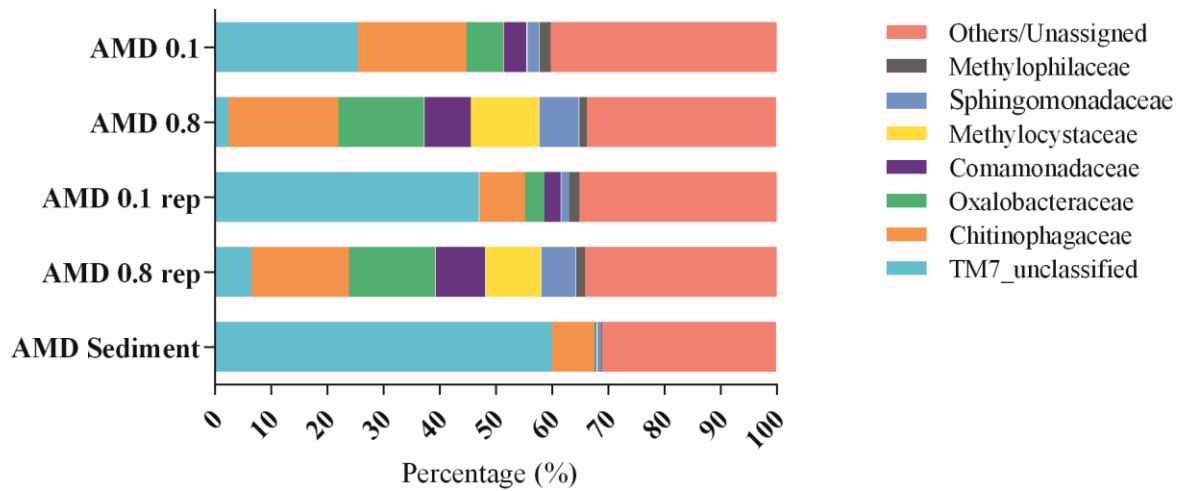


Fig. S1 – Percentage of reads assigned at the family taxonomic level in AMD samples. Samples were collected from the outflow of moderately acidic water near a low-grade chalcopyrite ore pile in Sossego Mine (Brazilian mineral province of Carajás), in July of 2014. Fifty liters of water, in replicate, were concentrated through a series of 0.8 μm and 0.1 μm polycarbonate filters. DNA were extracted and the V3-V4 region of 16S rDNA was amplified using primers 341F and 806R. The amplicons were paired-end sequenced on the MiSeq Illumina platform. The data were analyzed using the Brazilian Microbiome Project pipeline (PYLRO et al., 2014). AMD 0.1 - 0.1 μm membrane from the water sample of acid mine drainage (SRR5161796); AMD 0.1 rep - replicate of a 0.1 μm membrane from the water sample of acid mine drainage (SRR5161790); AMD 0.8- 0.8 μm membrane from the water sample of acid mine drainage (SRR5161799); and AMD 0.8 rep - replicate of a 0.8 μm membrane from the water sample of acid mine drainage (SRR5161803). AMD Sediment - sediment from acid mine drainage (SRR5161806).

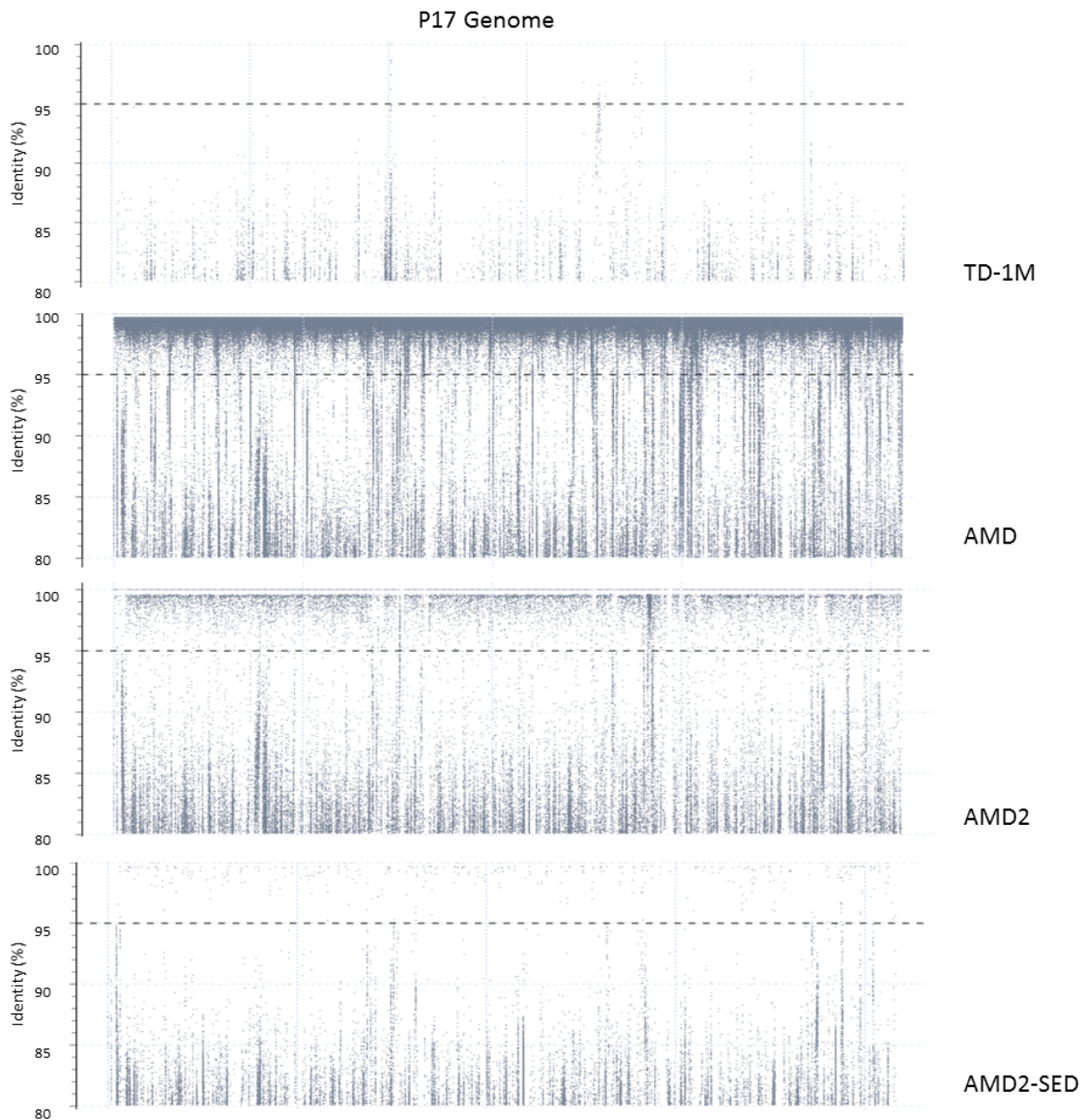


Fig. S2 – Fragment recruitment of SAG P17 over metagenomics datasets. The recruitment of the SAG over different metagenomes were performed using BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997), and hits were filtered using the following criteria: minimal query coverage of 40%, shared identity higher than 80% and e-value $\leq 1e-4$ (MIZUNO; RODRIGUEZ-VALERA; GHAI, 2015). Metagenomics datasets are described in Supporting Table 1.

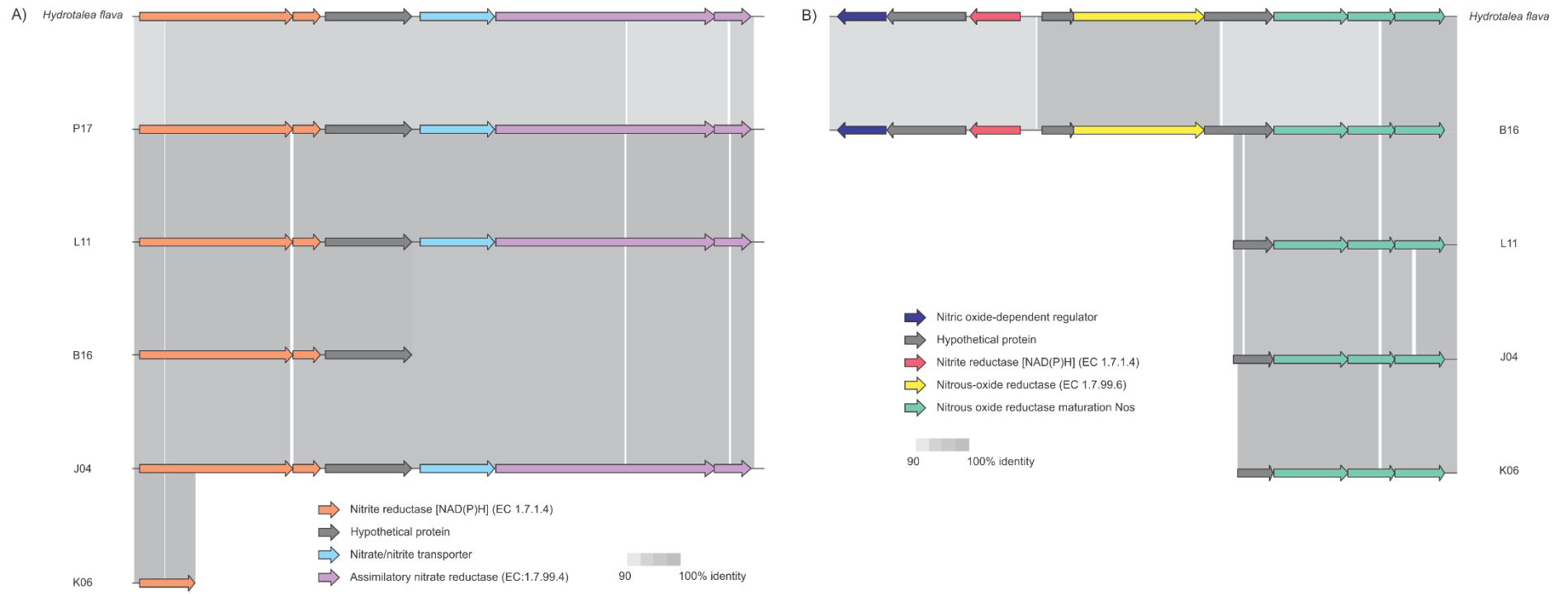


Fig. S3 – Synteny of conserved gene clusters related to denitrification between SAGs and the *Hydratolea flava* CCUG 51397^T genome.

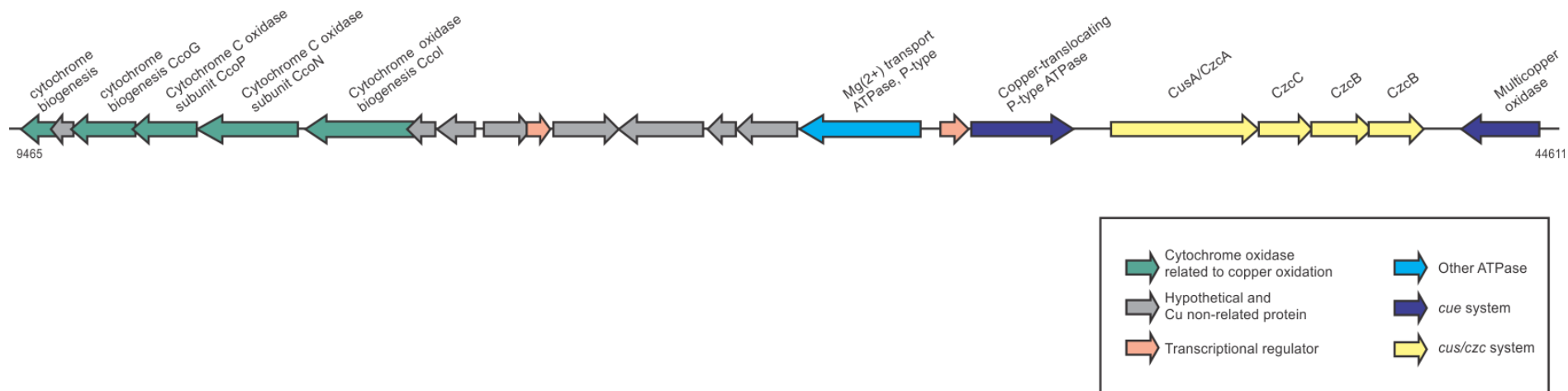


Fig. S4 – Cu genomic island in *Hydrotalea flava*.

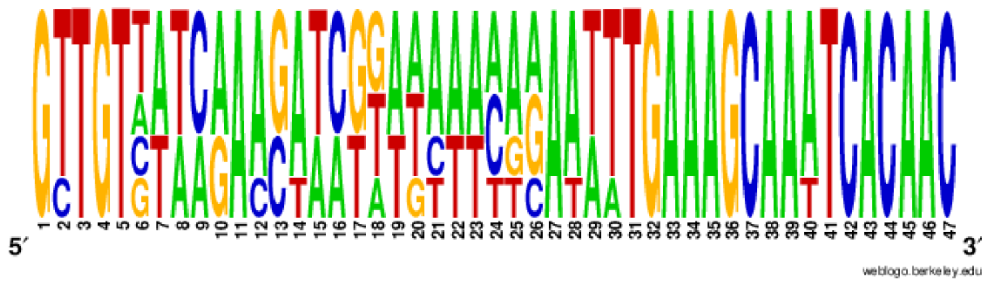


Fig. S5 – Logoplot of CRISPR repeats for the Chitinophagaceae genomes (*Hydrotalea flava* CCUG 51397T, *Hydrotalea sandarakina* AF-51T, *Niabella soli* JS13-8T, *Sediminibacterium* OR53 and *Sediminibacterium* C3).

Table S1 – Metagenomics datasets used in fragment recruitment analysis.

Metagenomic datasets	Mine	Sites	Source	Year	Identification	Accession number
Acid mine drainage early stage formation	Sossego copper mine	Site 1	Water	2014	AMD	SRR5161794, SRR5161788
Acid mine drainage early stage formation	Sossego copper mine	Site 2	Water	2016	AMD2	SRR5161807, SRR5161800
Acid mine drainage early stage formation	Sossego copper mine	Site 2	Sediment	2016	AMD2_SED	SRR5161792
Tailing dam – Surface	Sossego copper mine	Site 3	Water	2012/2013	TD_1M	SRR5045253, SRR5045254, SRR5045256, SRR5045259, SRR5045261, SRR5045263
Tailing dam - 15m depth	Sossego copper mine	Site 3	Water	2012/2013	TD_15M	SRR5045255, SRR5045260, SRR5045262, SRR5045264, SRR5045267
Tailing dam	Sossego copper mine	Site 3	Sediment	2012/2013	TD_SED	SRR5045252, SRR5045257, SRR5045258, SRR5045265, SRR5045266
Acid mine drainage well established	Richmond Mine	Site 4	Biofilm	2002	-	MG-RAST ID 4441138.3

Table S2 – List of all the Cas1 from CRISPR-cas type I-B and II-C used for the Cas1 phylogeny. Data and classifications were obtained from Makarova *et al.* (2015).

GI (Cas1)	Genome	Assigned system subtype
11500011	<i>Archaeoglobus_fulgidus_DSM_4304_uid57717</i>	part CAS-I-B
14591064	<i>Pyrococcus_horikoshii_OT3_uid57753</i>	CAS-I-B
19704512	<i>Fusobacterium_nucleatum_ATCC_25586_uid57885</i>	CAS-I-B
20092470	<i>Methanosarcina_acetivorans_C2A_uid57879</i>	CAS-I-B
20809002	<i>Thermoanaerobacter_tengcongensis_MB4_uid57813</i>	CAS-I-B
21226661	<i>Methanosarcina_mazei_Go1_uid57893</i>	CAS-I-B
34557789	<i>Wolinella_succinogenes_DSM_1740_uid61591</i>	CAS-II-C
41614813	<i>Nanoarchaeum_equitans_Kin4_M_uid58009</i>	CAS-I-B
53713835	<i>Bacteroides_fragilis_YCH46_uid58195</i>	CAS-I-B
55376278	<i>Haloarcula_marismortui_ATCC_43049_uid57719</i>	CAS-I-B
55978407	<i>Thermus_thermophilus_HB8_uid58223</i>	CAS-I-B
60683388	<i>Bacteroides_fragilis_NCTC_9343_uid57639</i>	CAS-II-C
83590562	<i>Moorella_thermoacetica_ATCC_39073_uid58051</i>	CAS-I-B
84489236	<i>Methanosphaera_stadtmanae_DSM_3091_uid58407</i>	CAS-I-B
89895510	<i>Desulfitobacterium_hafniense_Y51_uid58605</i>	CAS-I-B
90425960	<i>Rhodopseudomonas_palustris_BisB18_uid58443</i>	CAS-II-C
91773111	<i>Methanococcoides_burtonii_DSM_6242_uid58023</i>	CAS-I-B
111224947	<i>Frankia_alni_ACN14a_uid58695</i>	CAS-I-B
114567318	<i>Syntrophomonas_wolfei_Goettingen_uid58179</i>	CAS-I-B
117929157	<i>Acidothermus_cellulolyticus_11B_uid58501</i>	CAS-II-C
118443013	<i>Clostridium_novyi_NT_uid58643</i>	CAS-I-B
118475338	<i>Campylobacter_fetus_82_40_uid58545</i>	CAS-I-B
121608212	<i>Verminephrobacter_eiseniae_EF01_2_uid58675</i>	CAS-II-C
134045811	<i>Methanococcus_maripaludis_C5_uid58741</i>	CAS-I-B
134298414	<i>Desulfotomaculum_reducens_MI_1_uid58277</i>	CAS-I-B
146297392	<i>Caldicellulosiruptor_saccharolyticus_DSM_8903_uid58289</i>	CAS-I-B
148642224	<i>Methanobrevibacter_smithii_ATCC_35061_uid58827</i>	CAS-I-B
150020249	<i>Thermosiphon_melanesiensis_BI429_uid58683</i>	CAS-I-B
150025576	<i>Flavobacterium_psychrophilum_JIP02_86_uid61627</i>	CAS-II-C
150389964	<i>Alkaliphilus_metalliredigens_QYMF_uid58171</i>	CAS-I-B
150398983	<i>Methanococcus_vannielii_SB_uid58767</i>	CAS-I-B
152978061	<i>Actinobacillus_succinogenes_130Z_uid58247</i>	CAS-II-C
153955370	<i>Clostridium_kluyveri_DSM_555_uid58885</i>	CAS-I-B
154174048	<i>Campylobacter_curvus_525_92_uid58669</i>	CAS-I-B
154249624	<i>Fervidobacterium_nodosum_Rt17_B1_uid58625</i>	CAS-I-B
154250554	<i>Parvibaculum_lavamentivorans_DS_1_uid58739</i>	CAS-II-C
157164052	<i>Campylobacter_conciscus_13826_uid58667</i>	CAS-I-B
157363075	<i>Thermotoga_lettingae_TMO_uid58419</i>	CAS-I-B
159042957	<i>Dinoroseobacter_shibae_DFL_12_uid58707</i>	CAS-II-C
159901591	<i>Herpetosiphon_aurantiacus_DSM_785_uid58599</i>	CAS-I-B

160903306	<i>Petrotoga mobilis</i> _SJ95_uid58747	CAS-I-B
162457462	<i>Sorangium cellulosum</i> _So_ce_56_uid61629	CAS-I-B
163848495	<i>Chloroflexus aurantiacus</i> _J_10_fl_uid57657	CAS-I-B
167036565	<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i> _ATCC_33223_uid58339	part CAS-I-B
167040929	<i>Thermoanaerobacter</i> _X514_uid58589	CAS-I-B
187250661	<i>Elusimicrobium minutum</i> _Pei191_uid58949	CAS-II-C
187736488	<i>Akkermansia muciniphila</i> _ATCC_BAA_835_uid58985	CAS-II-C
188995823	<i>Porphyromonas gingivalis</i> _ATCC_33277_uid58879	CAS-I-B
206889560	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i> _DSM_11347_uid59257	CAS-I-B
206900365	<i>Dictyoglomus thermophilum</i> _H_6_12_uid59439	CAS-I-B
212638614	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> _WK1_uid59135	CAS-I-B
217077321	<i>Thermosipho africanus</i> _TCF52B_uid59095	CAS-I-B
219847509	<i>Chloroflexus aggregans</i> _DSM_9485_uid58621	CAS-I-B
220930481	<i>Clostridium cellulolyticum</i> _H10_uid58709	CAS-II-C
221632058	<i>Thermomicrobium roseum</i> _DSM_5159_uid59341	CAS-I-B
222099688	<i>Thermotoga neapolitana</i> _DSM_4359_uid59065	CAS-I-B
222109284	<i>Acidovorax ebreus</i> _TPSY_uid59233	CAS-II-C
222481209	<i>Halorubrum lacusprofundi</i> _ATCC_49239_uid58807	CAS-I-B
222526429	<i>Chloroflexus</i> _Y_400_fl_uid59085	CAS-I-B
222530612	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i> _DSM_6725_uid59201	CAS-I-B
224367660	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> _HRM2_uid59061	CAS-I-B
225848645	<i>Sulfurihydrogenibium azorense</i> _Az_Fu1_uid58121	CAS-I-B
225850878	<i>Persephonella marina</i> _EX_H1_uid58119	CAS-I-B
242399467	<i>Thermococcus sibiricus</i> _MM_739_uid59399	CAS-I-B
257052525	<i>Halorhabdus utahensis</i> _DSM_12940_uid59189	CAS-I-B
257125579	<i>Leptotrichia buccalis</i> _C_1013_b_uid59211	CAS-I-B
257388877	<i>Halomicrobium mukohataei</i> _DSM_12286_uid59107	CAS-I-B
258517354	<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i> _DSM_771_uid59109	CAS-I-B
260892568	<i>Ammonifex degensii</i> _KC4_uid41053	part CAS-I-B
268679538	<i>Sulfurospirillum deleyianum</i> _DSM_6946_uid41861	CAS-I-B
269123825	<i>Streptobacillus moniliformis</i> _DSM_12112_uid41863	CAS-II-C
269839455	<i>Thermobaculum terrenum</i> _ATCC_BAA_798_uid42011	CAS-I-B
283456134	<i>Bifidobacterium dentium</i> _Bd1_uid43091	CAS-II-C
284040851	<i>Spirosoma linguale</i> _DSM_74_uid43413	CAS-I-B
288560055	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> _M1_uid45857	CAS-I-B
288818552	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i> _TK_6_uid45927	CAS-I-B
288957740	<i>Azospirillum</i> _B510_uid46085	CAS-II-C
289433792	<i>Listeria seeligeri</i> _serovar_1_2b_SLCC3954_uid46215	CAS-I-B
289579423	<i>Thermoanaerobacter italicus</i> _Ab9_uid46241	CAS-I-B
291276264	<i>Helicobacter mustelae</i> _12198_uid46647	CAS-II-C
291278961	<i>Deferribacter desulfuricans</i> _SSM1_uid46653	CAS-I-B
292653771	<i>Haloferax volcanii</i> _DS2_uid46845	CAS-I-B
295133386	<i>Zunongwangia profunda</i> _SM_A87_uid48073	CAS-I-B
295136245	<i>Zunongwangia profunda</i> _SM_A87_uid48073	CAS-II-C

296109866	<i>Methanocaldococcus infernus</i> _ME_uid48803	CAS-I-B
296126271	<i>Brachyspira murdochii</i> _DSM_12563_uid48819	CAS-I-B
296133980	<i>Thermincola potens</i> _JR_uid48823	CAS-I-B
296274322	<i>Arcobacter nitrofigilis</i> _DSM_7299_uid49001	CAS-I-B
297543518	<i>Thermoanaerobacter mathranii</i> _A3_uid49481	CAS-I-B
302388669	<i>Thermosediminibacter oceani</i> _DSM_16646_uid51421	part CAS-I-B
310780383	<i>Ilyobacter polytropus</i> _DSM_2926_uid59769	CAS-II-C
310825770	<i>Eubacterium limosum</i> _KIST612_uid59777	CAS-I-B
312128678	<i>Caldicellulosiruptor hydrothermalis</i> _108_uid60157	CAS-I-B
312134146	<i>Caldicellulosiruptor owensensis</i> _OL_uid60165	CAS-I-B
312143828	<i>Halanaerobium hydrogeniformans</i> _uid60191	CAS-I-B
312623502	<i>Caldicellulosiruptor kronotskyensis</i> _2002_uid60491	CAS-I-B
312794543	<i>Caldicellulosiruptor kristjanssonii</i> _177R1B_uid60393	CAS-I-B
313669045	<i>Neisseria lactamica</i> _020_06_uid60851	CAS-II-C
313673874	<i>Calditerrivibrio nitroreducens</i> _DSM_19672_uid60821	CAS-I-B
319760941	<i>Alicyclophilus denitrificans</i> _BC_uid49953	CAS-II-C
319957207	<i>Nitratifactor salsuginis</i> _DSM_16511_uid62183	CAS-II-C
320114993	<i>Thermoanaerobacter brockii</i> _finnii_Ako_1_uid55639	CAS-I-B
325279973	<i>Odoribacter splanchnicus</i> _DSM_20712_uid63397	CAS-I-B
325289514	<i>Syntrophobotulus glycolicus</i> _DSM_8271_uid63343	CAS-I-B
325955458	<i>Weeksella virosa</i> _DSM_16922_uid63627	CAS-II-C
325972002	<i>Spirochaeta Buddy</i> _uid63633	CAS-II-C
326315086	<i>Acidovorax avenae</i> _ATCC_19860_uid42497	CAS-II-C
327400671	<i>Archaeoglobus veneficus</i> _SNP6_uid65269	CAS-I-B
327405118	<i>Fluviicola taffensis</i> _DSM_16823_uid65271	CAS-II-C
328951570	<i>Marinithermus hydrothermalis</i> _DSM_14884_uid65783	part CAS-I-B
328951839	<i>Desulfobacca acetoxidans</i> _DSM_11109_uid65785	CAS-I-B
332662474	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i> _DSM_1100_uid66777	CAS-I-B
332982754	<i>Mahella australiensis</i> _50_1_BON_uid66917	CAS-I-B
333898147	<i>Thermoanaerobacterium xylanolyticum</i> _LX_11_uid63163	CAS-I-B
333922948	<i>Desulfotomaculum carboxydivorans</i> _CO_1_SRB_uid67317	CAS-I-B
333978075	<i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i> _DSM_6115_uid67357	CAS-I-B
334341514	<i>Desulfotomaculum ruminis</i> _DSM_2154_uid67507	CAS-I-B
336115128	<i>Bacillus coagulans</i> _2_6_uid68053	CAS-I-B
336235012	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> _C56_YS93_uid48129	CAS-I-B
336323211	<i>Flexistipes sinusarabici</i> _DSM_4947_uid68147	CAS-I-B
337288767	<i>Thermodesulfobacterium OPB45</i> _uid68283	part CAS-I-B
338214362	<i>Runella slithyformis</i> _DSM_19594_uid68317	CAS-I-B
338731442	<i>Thermotoga thermarum</i> _DSM_5069_uid68449	CAS-I-B
340622235	<i>Capnocytophaga canimorsus</i> _Cc5_uid70727	CAS-II-C
344209644	<i>Haloarcula hispanica</i> _ATCC_33960_uid72475	CAS-I-B
344997553	<i>Caldicellulosiruptor lactoaceticus</i> _6A_uid60575	CAS-I-B
345018873	<i>Thermoanaerobacter wiegelii</i> _Rt8_B1_uid52581	CAS-I-B
345430423	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> _T3T1_uid72801	CAS-II-C

347525482	<i>Lactobacillus_ruminis</i> _ATCC_27782_uid73417	CAS-I-B
347547913	<i>Listeria_ivanovii</i> _PAM_55_uid73473	CAS-I-B
357419113	<i>Thermovirga_lienii</i> _DSM_17291_uid77129	CAS-I-B
365959405	<i>Flavobacterium_columnare</i> _ATCC_49512_uid80731	CAS-II-C
374339292	<i>Marinitoga_piezophila</i> _KA3_uid81629	CAS-I-B
375289764	<i>Corynebacterium_diphtheriae</i> _241_uid83607	CAS-II-C
375360192	<i>Bacteroides_fragilis</i> _638R_uid84217	CAS-II-C
379008964	<i>Sulfobacillus_acidophilus</i> _DSM_10332_uid88061	CAS-I-B
379012740	<i>Acetobacterium_woodii</i> _DSM_1030_uid88073	CAS-I-B
383319612	<i>Methanocella_conradii</i> _HZ254_uid157911	CAS-I-B
383485593	<i>Riemerella_anatipestifer</i> _ATCC_11845__DSM_15868_uid159857	CAS-II-C
383762541	<i>Caldilinea_aerophila</i> _DSM_14535__NBRC_104270_uid158165	CAS-I-B
383787935	<i>Caldisericum_exile</i> _AZM16c01_uid158173	CAS-I-B
384200945	<i>Bifidobacterium_longum</i> _KACC_91563_uid158861	CAS-II-C
384362144	<i>Clostridium_difficile</i> _BI1_uid158363	CAS-I-B
385324781	<i>Neisseria_meningitidis</i> _8013_uid161967	CAS-II-C
385780234	<i>Clostridium_thermocellum</i> _DSM_1313_uid161989	CAS-I-B
385789536	<i>Fibrobacter_succinogenes</i> _S85_uid161919	CAS-II-C
385803535	<i>Haloquadratum_walsbyi</i> _C23_uid162019	CAS-I-B
386052779	<i>Listeria_monocytogenes</i> _Finland_1998_uid54443	CAS-I-B
386318631	<i>Staphylococcus_pseudintermedius</i> _ED99_uid162109	CAS-II-C
387132278	<i>Prevotella_intermedia</i> _17_uid163151	CAS-II-C
389849193	<i>Haloferax_mediterranei</i> _ATCC_33500_uid167315	CAS-I-B
390940098	<i>Sulfurospirillum_barnesii</i> _SES_3_uid168117	CAS-I-B
390944705	<i>Belliella_baltica</i> _DSM_15883_uid168182	CAS-II-C
390961970	<i>Thermococcus</i> _CL1_uid168259	CAS-I-B
392391492	<i>Ornithobacterium_rhinotracheale</i> _DSM_15997_uid168256	CAS-II-C
392407912	<i>Anaerobaculum_mobile</i> _DSM_13181_uid168323	CAS-I-B
407473145	<i>Clostridium_acidurici</i> _9a_uid176126	CAS-I-B
407692092	<i>Actinobacillus_suis</i> _H91_0380_uid176363	CAS-II-C
408418420	<i>Desulfobacula_toluolica</i> _Tol2_uid175777	CAS-I-B
408489715	<i>Psychroflexus_torquis</i> _ATCC_700755_uid54205	CAS-II-C
428208003	<i>Chroococcidiopsis_thermalis</i> _PCC_7203_uid183002	CAS-I-B
429193351	<i>Natronobacterium_gregoryi</i> _SP2_uid74439	CAS-I-B
430751276	<i>Thermobacillus_composti</i> _KWC4_uid74021	CAS-I-B
432329386	<i>Aciduliprofundum</i> _MAR08_339_uid184407	CAS-I-B
432331519	<i>Methanoregula_formicicum</i> _SMSP_uid184406	CAS-I-B
451821616	<i>Clostridium_saccharoperbutylaceticum</i> _ATCC_27021_uid189747	CAS-I-B
452944366	<i>Hydrogenobaculum</i> _HO_uid190882	CAS-I-B
470166766	<i>Bibersteinia_trehalosi</i> _192_uid193709	CAS-II-C
470213513	<i>Sphingomonas</i> _MM_1_uid193771	CAS-II-C
471261879	<i>Bdellovibrio_exovorus</i> _JSS_uid194119	CAS-II-C
471315928	<i>Helicobacter_cinaedi</i> _ATCC_BAA_847_uid193765	CAS-II-C
472466986	<i>Clostridium_stercorarium</i> _DSM_8532_uid195569	CAS-I-B

479154410	Ruminococcus_uid197156	CAS-I-B
479198700	Synergistetes_bacterium_SGP1_uid197182	part CAS-I-B
488774373	Desulfotomaculum_gibsoniae_DSM_7213_uid76945	CAS-I-B
494703076	Streptococcus_agalactiae_2_22_uid202215	CAS-II-C
507380410	Fusobacterium_4_8_uid205051	CAS-I-B
507384106	Spiroplasma_syrphidicola_EA_1_uid205054	CAS-II-C
509154231	Methanobrevibacter_AbM4_uid206516	CAS-I-B
511059752	Methanomassiliicoccus_Mx1_Issoire_uid207287	CAS-I-B
518652584	Ferropasma_acidarmanus_fer1_uid54095	CAS-I-B
525868764	Vibrio_paraahaemolyticus_O1_K33_CDC_K4557_uid212977	CAS-I-B
525912228	Vibrio_paraahaemolyticus_O1_K33_CDC_K4557_uid212977	CAS-II-C
529078026	Halorhabdus_tiamatea_SARL4B_uid214082	CAS-I-B
530600687	Geobacillus_JF8_uid215234	CAS-II-C
530892606	Treponema_pedis_T_A4_uid215715	CAS-II-C
544063171	Campylobacter_jejuni_00_2425_uid219359	CAS-II-C
549484340	Bacteroides_CF50_uid222805	CAS-II-C
550918912	Clostridium_saccharobutylicum_DSM_13864_uid223284	CAS-I-B
554379177	Clostridium_autoethanogenum_DSM_10061_uid225029	CAS-I-B
556591141	Staphylococcus_pasteuri_SP1_uid226267	CAS-II-C
557605419	Clostridium_tetani_12124569_uid227214	CAS-I-B
563693591	Spiroplasma_apis_B31_uid230613	CAS-II-C
566002379	Methanobacterium_MB1_uid231690	CAS-I-B
570743684	Niabella_soli_DSM_19437	CAS-II-C
This study	<i>Sediminibacterium</i> OR53 (GCA_000515315.1)	CAS-II-C
This study	<i>Sediminibacterium</i> C3 (GCA_000508085.1)	CAS-II-C
This study	<i>Hydrotalea sandarakina</i> AF-51T (JGI Project Id: 1049057)	CAS-II-C
This study	<i>Hydrotalea flava</i> CCUG 51397T (LUHG00000000.1)	CAS-II-C

Table S3 – Chemical parameters of water samples from an acid mine drainage (AMD) site that is being formed from a low-grade chalcopyrite ore pile.

	Unit	AMD water
Alcalinity	mg CaCO ₃ /L	3,03
Al	mg Al/L	0,09
As	mg As/L	<0,01
Cd	mg Cd/L	<0,001
Ca	mg Ca/L	219
Pb	mg Pb/L	<0,01
Chloride	mg Cl-/L	19,4
Co	mg Co/L	2,78
Cu	mg Cu/L	74,7
Cr	mg Cr/L	<0,01
Ferric Iron	mg Fe ₃ /L	0,12
Ferrous Iron	mg Fe ₂ /L	<0,05
Fluoride	mg F-/L	<0,1
P	mg P/L	0,02
Mg	mg Mg/L	136
Mn	mg Mn/L	18,4
Ni	mg Ni/L	<0,02
NH₃	mg N_NH ₃ /L	-
N	mg N/L	6,2
K	mg K/L	9,69
Na	mg Na/L	65,4
Sulfate	mg SO ₄ /L	1170
Sulfide	mg S ₂ -/L	<0,002
Sulfite	mg SO ₃ /L	<2
Zn	mg Zn/L	0,38

Table S4 – Pairwise comparison of the SAGs and the genomes of *Hydrotalea flava* CCUG 51397^T, *Hydrotalea sandarakina* AF-51^T and *Sediminibacterium salmoneum* NJ-44^T using the average nucleotide identity.

	SAG A04	SAG K06	SAG J04	SAG B16	SAG L11	SAG P17	<i>Hydrotalea flava</i>	<i>Hydrotalea sandarakina</i>	<i>Sediminibacterium salmoneum</i>
SAG A04	100	99.48	99.49	98.62	98.25	98.98	95	76.72	68.46
SAG K06	99.92	100	99.42	98.66	98.96	98.85	94.11	77.22	68.67
SAG J04	99.5	99.29	100	97.88	97.69	98.46	94.28	76.87	67.93
SAG B16	98.83	98.57	98.2	100	99.54	99.84	94.47	76.43	68.21
SAG L11	98.42	98.8	98.17	99.64	100	99.65	93.69	76.65	68.45
SAG P17	98.65	98.4	98.39	99.6	99.51	100	94.3	76.7	68.2

Table S5 – Copper and other metal resistance genes in *Hydrotalea* sp. genomes.

Gene description	Gene name	Genomes							
		<i>Hydrotalea flava</i>	P17	B16	L11	K06	J04	A04	
Copper translocating P-type ATPases	CopA	+	+	+	-	+	+	+	
Cu ⁺ P-type ATPase		+	+	+	+	-	+	-	
Multicopper oxidase		+	+	+	+	+	+	-	
Cation efflux system protein CusA/ Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA	CusA/CzcA	+	+	+	+	+	+	+	
Efflux system membrane fusion protein	CzcB	+	+	+	-	+	+	+	
Heavy metal RND efflux outer membrane protein	CzcC	+	+	+	-	-	+	+	
Cobalt-zinc-cadmium resistance protein	CzcD	+	+	+	-	-	-	-	
Cytoplasmic copper homeostasis protein	CutC	+	+	+	-	-	+	-	

References

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA *et al.* (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, **25**, 3389–402.
- Ayarza JM, Figuerola ELM, Erijman L (2014) Draft Genome Sequences of Type Strain *Sediminibacterium salmoneum* NJ-44 and *Sediminibacterium* sp. Strain C3, a Novel Strain Isolated from Activated Sludge. *Genome announcements*, **2**, 1–2.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA *et al.* (2008) The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, **9**, 75.
- Baeseman JL, Smith RL, Silverstein J (2006) Denitrification potential in stream sediments impacted by acid mine drainage: Effects of pH, various electron donors, and iron. *Microbial Ecology*, **51**, 232–241.
- Bailey VL, Fansler SJ, Stegen JC, McCue LA (2013) Linking microbial community structure to β -glucosidic function in soil aggregates. *The ISME Journal*, **7**, 2044–2053.
- Baker BJ, Banfield JF (2003) Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology*, **44**, 139–152.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D *et al.* (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, **19**, 455–477.
- Biswas A, Fineran PC, Brown CM (2014) Accurate computational prediction of the transcribed strand of CRISPR non-coding RNAs. *Bioinformatics*, **30**, 1805–1813.
- Bland C, Ramsey TL, Sabree F *et al.* (2007) CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. *BMC bioinformatics*, **8**, 209.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, **30**, 2114–2120.
- Bondarczuk K, Piotrowska-Seget Z (2013) Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Cell Biology and Toxicology*, **29**, 397–405.
- Brown CT (2015) Strain recovery from metagenomes. *Nature Publishing Group*, **33**, 1041–1043.
- Carver TJ, Rutherford KM, Berriman M *et al.* (2005) ACT: the Artemis comparison tool. *Bioinformatics*, **21**, 3422–3423.
- Chakraborty S, Snijders AP, Chakravorty R *et al.* (2010) Comparative network clustering of direct repeats (DRs) and cas genes confirms the possibility of the horizontal transfer of CRISPR locus among bacteria. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **56**, 878–887.
- Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin E V. (2014) Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, **42**, 6091–6105.
- Chylinski K, Le Rhun A, Charpentier E (2013) The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA biology*, **10**, 726–37.
- Dold B (2014) Evolution of Acid Mine Drainage Formation in Sulphidic Mine Tailings. *Minerals*, **4**, 621–641.
- Druschel GK, Baker BJ, Gihring TM, Banfield JF (2004) Acid mine drainage

- biogeochemistry at Iron Mountain, California. *Geochemical Transactions*, **5**, 13.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, **32**, 1792–7.
- Gao J-L, Sun P, Wang X-M *et al.* (2016) *Filimonas zeae* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from maize root. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA *et al.* (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**, 81–91.
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C (2007) CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic acids research*, **35**, W52-7.
- Hanada S, Tamaki H, Nakamura K, Kamagata Y (2014) *Crenotalea thermophila* gen. nov., sp. nov., a member of the family Chitinophagaceae isolated from a hot spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **64**, 1359–64.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17**, 754–755.
- Johnson DB, Hallberg KB (2003) The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology*, **154**, 466–473.
- Kämpfer P, Lodders N, Falsen E (2011) *Hydrotalea flava* gen. nov., sp. nov., a new member of the phylum Bacteroidetes and allocation of the genera Chitinophaga, Sediminibacterium, Lacibacter, Flaviumibacter, Flavisolibacter, Niabella, Niastella, Segetibacter, Parasegetibacter, Terrimonas, Fer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **61**, 518–523.
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 772–780.
- Kuang J-L, Huang L-N, Chen L-X *et al.* (2013) Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage. *The ISME journal*, **7**, 1038–50.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, **10**, R25.
- Leite LR, Medeiros JD, Fernandes GR *et al.* (2016) Draft Genome Sequence of *Hydrotalea flava* Strain CCUG 51397T. *Genome announcements*, **4**.
- Llorens-Marès T, Yooseph S, Goll J *et al.* (2015) Connecting biodiversity and potential functional role in modern euxinic environments by microbial metagenomics. *The ISME journal*, **9**, 1648–61.
- Lo AS, Merrell DS, Lei H *et al.* (2015) A Novel Member of Chitinophagaceae Isolated from a Human Peritoneal Tumor. *Genome announcements*, **3**.
- Lv Y-Y, Wang J, Chen M-H, You J, Qiu L-H (2016) *Dinghuibacter silviterrae* gen. nov., sp. nov., isolated from forest soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **66**, 1785–91.
- Macomber L, Imlay JA (2009) The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- of the United States of America, **106**, 8344–9.
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R *et al.* (2011) Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, **9**, 467–477.
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS *et al.* (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature reviews. Microbiology*, **13**, 722–736.
- Martijn J, Schulz F, Zaremba-Niedzwiedzka K *et al.* (2015) Single-cell genomics of a rare environmental alphaproteobacterium provides unique insights into Rickettsiaceae evolution. *Isme j*, 1–13.
- Martinez-Garcia M, Swan BK, Poulton NJ *et al.* (2012) High-throughput single-cell sequencing identifies photoheterotrophs and chemoautotrophs in freshwater bacterioplankton. *The ISME journal*, **6**, 113–23.
- Medeiros JD, Cantão ME, Cesar DE *et al.* (2016) Comparative metagenome of a stream impacted by the urbanization phenomenon. *Brazilian Journal of Microbiology*, 4–14.
- Medeiros JD, Leite LR, Cuadros-Orellana S, Oliveira G (2015) Taxonomic and functional diversity of microbial community from a mining environment. *BMC Bioinformatics*, **16**, A3.
- Méndez-García C, Peláez AI, Mesa V *et al.* (2015) Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 1–17.
- Mizuno CM, Rodriguez-Valera F, Ghai R (2015) Genomes of planktonic acidimicrobiales: Widening horizons for marine actinobacteria by metagenomics. *mBio*, **6**, 1–11.
- Nies DH (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, **27**, 313–339.
- Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. *Evolutionary Biology Centre, Uppsala University*.
- Papirio S, Ylinen A, Zou G *et al.* (2014) Fluidized-bed denitrification for mine waters . Part I : low pH and temperature operation. , 425–435.
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research*, **25**, 1043–55.
- Pereira LB, Vicentini R, Ottoboni LMM (2014) Changes in the bacterial community of soil from a neutral mine drainage channel. *PloS one*, **9**, e96605.
- Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M (2015) The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, **117**, 119–128.
- Rawlings DE, Johnson DB (2007) The microbiology of biomining: Development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology*, **153**, 315–324.
- Richter M, Rossello-Mora R (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 19126–19131.
- Rodriguez-Valera F, Martin-Cuadrado A-B, Rodriguez-Brito B *et al.* (2009) Explaining microbial population genomics through phage predation. *Nature reviews. Microbiology*, **7**, 828–36.
- Rosenberg E (2014) The Family Chitinophagaceae. In: *The Prokaryotes*, pp. 493–495. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

- Siddiqi MZ, Im W-T (2016) *Niabella aquatica* sp. nov., isolated from lake water. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*.
- Stepanauskas R (2015) Wiretapping into microbial interactions by single cell genomics. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 2014–2016.
- Sun CL, Thomas BC, Barrangou R, Banfield JF (2016) Metagenomic reconstructions of bacterial CRISPR loci constrain population histories. *The ISME journal*, **10**, 858–70.
- Swan BK, Martinez-Garcia M, Preston CM *et al.* (2011) Potential for Chemolithoautotrophy Among Ubiquitous Bacteria Lineages in the Dark Ocean. *Science*, **333**, 1296–1300.
- Takeuchi N, Wolf YI, Makarova KS, Koonin E V. (2012) Nature and intensity of selection pressure on crispr-associated genes. *Journal of Bacteriology*, **194**, 1216–1225.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725–2729.
- Tyson GW, Banfield JF (2008) Rapidly evolving CRISPRs implicated in acquired resistance of microorganisms to viruses. *Environmental Microbiology*, **10**, 200–207.
- Vavourakis CD, Ghai R, Rodriguez-Valera F *et al.* (2016) Metagenomic Insights into the Uncultured Diversity and Physiology of Microbes in Four Hypersaline Soda Lake Brines. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1–18.
- Weigold P, El-Hadidi M, Ruecker A *et al.* (2016) A metagenomic-based survey of microbial (de)halogenation potential in a German forest soil. *Scientific reports*, **6**, 28958.
- Williams HTP (2013) Phage-induced diversification improves host evolvability. *BMC evolutionary biology*, **13**, 17.
- Xie J, He Z, Liu XX *et al.* (2011) GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of microbial communities in acid mine drainage. *Appl Environ Microbiol*, **77**, 991–999.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As drenagens ácidas de mina são caracterizadas por baixo pH e altas concentrações de metais, fatores estes que fazem desse um ambiente extremo e alvo de estudos a décadas. Apesar de muitos trabalhos investigarem a microbiota das AMD, ainda não se conhece a fundo a comunidade microbiana das drenagens em estágios iniciais de formação. Assim, esse foi um dos primeiros estudos tentando resolver essa questão em aberto. Conhecer a comunidade microbiana sempre foi um desafio para os pesquisadores. Porém, hoje com o avanço da genômica, das tecnologias de sequenciamento de nova geração e bioinformática, já é possível realizar análises independentes de cultivo dessas comunidades, estes estudos vão desde uma caracterização geral dos grupos microbianos presentes no ambiente, conhecimento do pool gênico dessas comunidades e até mesmo isolar células únicas e sequenciar seus genomas. De posse dessas técnicas moleculares, este trabalho buscou uma caracterização taxonômica da microbiota da AMD em estágio inicial de formação bem como visou compreender o papel de uma espécie bacteriana muito representada nessas drenagens.

Os nossos resultados evidenciaram que a drenagem ácida de mina se diferencia dos demais ambientes de mineração seja pelo seu perfil físico-químico ou pela composição da sua microbiota. Analisando amostras coletadas com um intervalo de mais de um ano foi possível identificar grupos microbianos abundantes, centrais e persistentes nesse ambiente. O filo TM7 foi um desses. Este é um filo candidato que não tem representante cultivável descrito, pouco ainda se sabe sobre esse grupo. Mas, sua incidência em drenagens ácidas já foi relatada (MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015). Como as bactérias pertencentes à TM7 possuem pequeno tamanho, a detecção desse grupo foi maior nas amostras de água de AMD filtradas com membranas de 0,22 μ m e 0,1 μ m, além do sedimento. Vale destacar que devido à alta abundância desse grupo, outras análises estão sendo realizadas para tentar compreender o seu papel nas drenagens ácidas em formação. Através dos dados de metagenômica *shotgun*, das mesmas amostras de AMD, estamos tentando reconstruir genomas de bactérias pertencentes à TM7.

É interessante considerar que o pipeline de *Single Cell Genomics* que foi aplicado (sem seleção de microrganismo específico de interesse), isolou do ambiente células que eram muito abundantes como foi o caso das *Hydrotalea* pertencentes à família Chitinophagaceae. O que justifica as células de TM7, que apesar de serem muito abundantes, não terem sido isoladas nesse trabalho foi o fato de que através do *sorting* celular há uma seleção de células por tamanho também. Todas as células menores foram separadas e dispostas em uma placa multipocinhos. Porém no momento de escolher as células que seriam amplificadas, teriam seu gene 16S rRNA sequenciado e posteriormente o seu genoma, a opção feita foi das células de tamanho maior.

A incidência de microrganismos acidofílicos quimiolitotróficos também foi evidenciada nessa AMD, mesmo sendo estes estágios iniciais de formação com acidez moderado (pH variando de 4,85 a 5). Além de abundante, a OTU atribuída à *Acidithiobacillus* persistiu no ambiente com o passar do ano. O que sugere que esses organismos são potenciais candidatos para a realização de processos biotecnológicos como a biolixiviação.

Como já ressaltado, através da técnica de *Single Cell Genomics* foi possível sequenciar o genoma de células únicas isoladas do ambiente e que se mostraram muito abundantes. Essas células pertencem à família Chitinophagaceae e ao gênero *Hydrotalea* e através das análises realizadas (ANI e filogenia) observamos a existência de duas linhagens diferentes de uma mesma espécie, estreitamente relacionada com *Hydrotalea flava*. Com os dados de SCG pudemos descrever pela primeira vez o genoma dessa bactéria, além de também termos sequenciado o genoma da linhagem de referência *H flava* CCUG 51397^T, para auxiliar nas análises subsequentes. Os resultados obtidos apontaram para os SAGs com o potencial de atuação em processos de desnitrificação já que possuem genes codificadores de proteínas relacionadas com redução de nitrato, nitrito e óxido nítrico. Já foi relatado que a desnitrificação ajuda na redução da acidez em drenagens ácidas (BAESEMAN; SMITH; SILVERSTEIN, 2006). Esse processo pode estar auxiliando a sobrevivência de outros microrganismos que não são tolerantes à baixa acidez, até mesmo as próprias *Hydrotalea*, já que não foi observado em seu genoma genes codificando para esse tipo de resistência. Em contrapartida, genes codificando determinantes de resistência ao cobre e outros metais foram encontrados nos genomas das células únicas. Esses genes se expressos podem estar garantindo a sobrevivência desses organismos já que a drenagem ácida da qual eles foram isolados possui alta concentração de cobre, que em altos níveis é tóxico para as células.

Além disso, foi possível identificar nos genomas das células únicas, sistemas do tipo CRISPR-cas, que são considerados mecanismos de imunidade adaptativa dos procariontes, que agem protegendo as células contra invasão de elementos genéticos exógenos. Uma análise comparativa das regiões genômicas contendo *locus* CRISPR-Cas entre as células únicas e o genoma de referência de *H flava*, nos permitiu documentar heterogeneidade e variabilidade genética na população de *Hydrotalea* nessa drenagem ácida. Também observamos que esses organismos estão respondendo, em escala de micro-habitat, à pressão seletiva imposta por predação de fagos. Nossos resultados, evidenciaram a importância de estudos utilizando *Single Cell Genomics*, pois considerando apenas dados metagenômicos essa heterogeneidade populacional não poderia ser descrita.

Todos esses resultados descritos ajudaram a caracterizar a microbiota das AMDs em estágios iniciais de formação, em especial conhecer em detalhes um grupo ainda pouco explorado, as *Hydrotalea* sp. Como perspectivas, teremos a busca por genomas recuperados de dados de metagenômica *shotgun*, para adquirir um conhecimento ainda maior sobre o

papel de alguns microrganismos dessas drenagens ácidas.

7. REFERÊNCIAS

- ALBERTSEN, M. et al. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 533–538, 26 maio 2013.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389–402, 1 set. 1997.
- AMITAI, G.; SOREK, R. CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. **Nature Reviews Microbiology**, v. advance on, n. 2, p. 67–76, 2016.
- AYARZA, J. M.; FIGUEROLA, E. L. M.; ERIJMAN, L. Draft Genome Sequences of Type Strain *Sediminibacterium salmoneum* NJ-44 and *Sediminibacterium* sp. Strain C3, a Novel Strain Isolated from Activated Sludge. **Genome announcements**, v. 2, n. 1, p. 1–2, 2014.
- AZIZ, R. K. et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 75, 2008.
- BAESEMAN, 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.
- BAILEY, V. L. et al. Linking microbial community structure to β -glucosidic function in soil aggregates. **The ISME Journal**, v. 7, n. 10, p. 2044–2053, 30 out. 2013.
- BAKER, B. J.; BANFIELD, J. F. Microbial communities in acid mine drainage. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 44, n. 2, p. 139–152, 2003.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, maio 2012.
- BERGAMO, R. F. et al. Differentiation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains based on 16S-23S rDNA spacer polymorphism analysis. **Research in microbiology**, v. 155, n. 7, p. 559–67, set. 2004.
- BINNEWIES, T. T. et al. Ten years of bacterial genome sequencing: Comparative-genomics-based discoveries. **Functional and Integrative Genomics**, v. 6, n. 3, p. 165–185, 2006.
- BISWAS, A.; FINERAN, P. C.; BROWN, C. M. Accurate computational prediction of the transcribed strand of CRISPR non-coding RNAs. **Bioinformatics**, v. 30, n. 13, p. 1805–1813, 2014.
- BLAND, C. et al. CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. **BMC bioinformatics**, v. 8, p. 209, 2007.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 ago. 2014.
- BOND, P. L.; SMRIGA, S. P.; BANFIELD, J. F. Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3842–9, set. 2000.
- BONDARCZUK, K.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. **Cell Biology and Toxicology**, v. 29, n. 6, p. 397–405, 2013.
- BONNEFOY, V.; HOLMES, D. S. Genomic insights into microbial iron oxidation and iron

uptake strategies in extremely acidic environments. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 1597–1611, 2012.

BROWN, C. T. Strain recovery from metagenomes. **Nature Publishing Group**, v. 33, n. 10, p. 1041–1043, 2015.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335–6, maio 2010.

CHAKRABORTY, S. et al. Comparative network clustering of direct repeats (DRs) and cas genes confirms the possibility of the horizontal transfer of CRISPR locus among bacteria. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 3, p. 878–887, 2010.

CHAO, A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 11, n. 4, p. 265–270, 1984.

CHYLINSKI, K. et al. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 10, p. 6091–6105, 2014.

CHYLINSKI, K.; LE RHUN, A.; CHARPENTIER, E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. **RNA biology**, v. 10, n. 5, p. 726–37, 2013.

COCKELL, C. S. Geomicrobiology beyond Earth: Microbe-mineral interactions in space exploration and settlement. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 7, p. 308–314, 2010.

DEAN, F. B. et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 8, p. 5261–6, 16 abr. 2002.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL. Sumário Mineral 2015. v. 35, p. 135, 2015.

DINIS, J. M. et al. In search of an uncultured human-associated TM7 bacterium in the environment. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 1–8, 2011.

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

DRUSCHEL, G. K. et al. Acid mine drainage biogeochemistry at Iron Mountain, California. **Geochemical Transactions**, v. 5, n. 2, p. 13, 2004.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792–7, 2004.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 1 out. 2010.

EDGAR, R. C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature methods**, v. 10, n. 10, p. 996–8, out. 2013.

FLEISCHMANN, R. D. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. **Science (New York, N.Y.)**, v. 269, n. 5223, p. 496–512, 28 jul. 1995.

FRASER, C. M. et al. The minimal gene complement of Mycoplasma genitalium. **Science (New York, N.Y.)**, v. 270, n. 5235, p. 397–403, 20 out. 1995.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, v. 122, n. 2–4 SPEC. IIS., p. 109–119, 2004.

GADD, G. M. Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. **Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 609–643, 2010.

GAO, J.-L. et al. Filimonas zeae sp. nov., an endophytic bacterium isolated from maize root. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 26 abr. 2016.

- GILBERT, J. A.; DUPONT, C. L. Microbial metagenomics: beyond the genome. **Annual review of marine science**, v. 3, p. 347–71, 2011.
- GORIS, J. et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 81–91, 2007.
- GRISSA, I.; VERGNAUD, G.; POURCEL, C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. **Nucleic acids research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W52-7, jul. 2007.
- HAMMARSTROM, J. M.; SIBRELL, P. L.; BELKIN, H. E. Characterization of limestone reacted with acid-mine drainage in a pulsed limestone bed treatment system at the Friendship Hill National Historical Site, Pennsylvania, USA. **Applied Geochemistry**, v. 18, n. 11, p. 1705–1721, 2003.
- HANADA, A. et al. Bacteria of the Candidate Phylum TM7 are Prevalent in Acidophilic Nitrifying Sequencing-Batch Reactors. **Microbes Environ**, v. 29, n. 4, p. 353–362, 2014a.
- HANADA, S. et al. *Crenotalea thermophila* gen. nov., sp. nov., a member of the family Chitinophagaceae isolated from a hot spring. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. Pt 4, p. 1359–64, abr. 2014b.
- HAQ, F.; ULLAH, R. Bioleaching. In: HAQ, F.; ULLAH, R. (Eds.). . Alemanha: LAP Lampert, 2012. p. 13–20.
- HE, X. et al. Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 1, p. 244–9, 2015.
- HUANG, L.-N.; KUANG, J.-L.; SHU, W.-S. Microbial Ecology and Evolution in the Acid Mine Drainage Model System. **Trends in Microbiology**, v. xx, p. 1–13, 2016.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754–755, 1 ago. 2001.
- HUG, L. A. et al. A new view of the tree of life. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 16048, 11 abr. 2016.
- HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES, N. C. A changing of the guard. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 551–553, mar. 2009.
- IBRAM. Informações sobre a economia mineral brasileira 2015. v. 0, n. 61, p. 1–25, 2015.
- IINO, T. et al. *Candidatus Methanogranum caenicola*: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class *Thermoplasmata*. **Microbes and environments**, v. 28, n. 2, p. 244–50, 2013.
- JACOBS, J. A.; VANCE, D. B. Biochemistry of acid drainage. In: JACOBS, J. A.; LEHR, J. H.; TESTA, S. M. (Eds.). . USA: Wiley, 2014. p. 15–51.
- JOHNSON, D. B. Development and application of biotechnologies in the metal mining industry. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 11, p. 7768–7776, 2013.
- JOHNSON, D. B. Biomining goes underground. **Nature Geoscience**, v. 8, n. 3, p. 165–166, 2015.
- JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B. The microbiology of acidic mine waters. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 7, p. 466–473, 2003a.
- JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B. The microbiology of acidic mine waters. **Research in microbiology**, v. 154, n. 7, p. 466–73, set. 2003b.

- JOHNSON, D. B.; KANAO, T.; HEDRICH, S. Redox transformations of iron at extremely low pH: Fundamental and applied aspects. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. MAR, p. 1–13, 2012.
- JONG, T.; PARRY, D. L. Microbial sulfate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. **Water research**, v. 40, n. 13, p. 2561–71, jul. 2006.
- KÄMPFER, P.; LODDERS, N.; FALSEN, E. *Hydrotalea flava* gen. nov., sp. nov., a new member of the phylum Bacteroidetes and allocation of the genera Chitinophaga, Sediminibacterium, Lacibacter, Flavihumibacter, Flavisolibacter, Niabella, Niastella, Segetibacter, Parasegetibacter, Terrimonas, Fer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 518–523, 2011.
- KARAH, N. et al. CRISPR-cas subtype I-Fb in *Acinetobacter baumannii*: evolution and utilization for strain subtyping. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0118205, 2015.
- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 1 abr. 2013.
- KLEIN, R. et al. Bioremediation of mine water. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 141, p. 109–72, 2014.
- KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 1, p. e1, 7 jan. 2013.
- KUANG, J.-L. et al. Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage. **The ISME journal**, v. 7, n. 5, p. 1038–50, 2013.
- LAND, M. et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. **Functional & integrative genomics**, v. 15, n. 2, p. 141–61, 2015.
- LANGMEAD, B. et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome biology**, v. 10, n. 3, p. R25, 2009.
- LASKEN, R. S. Genomic sequencing of uncultured microorganisms from single cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 631–640, 2012.
- LASKEN, R. S.; MCLEAN, J. S. Recent advances in genomic DNA sequencing of microbial species from single cells. **Nature reviews. Genetics**, v. 15, n. 9, p. 577–84, 2014.
- LEFEVRE, C. T. et al. Culture-independent characterization of a novel, uncultivated magnetotactic member of the Nitrospirae phylum. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 538–549, 2011.
- LEITE, L. R. et al. Draft Genome Sequence of *Hydrotalea flava* Strain CCUG 51397T. **Genome announcements**, v. 4, n. 3, 2016.
- LIU, D. et al. Role of pH and dissolved mineral species in Pittsburgh No.8 coal flotation system - I. Floatability of coal. **International Journal of Mineral processing**, v. 41, p. 201–214, 1994.
- LLORENS-MARÈS, T. et al. Connecting biodiversity and potential functional role in modern euxinic environments by microbial metagenomics. **The ISME journal**, v. 9, n. 7, p. 1648–61, jul. 2015.
- LO, A. S. et al. A Novel Member of Chitinophagaceae Isolated from a Human Peritoneal Tumor. **Genome announcements**, v. 3, n. 6, 2015.
- LOUIS, B. P. et al. Microbial Diversity Indexes Can Explain Soil Carbon Dynamics as a Function of Carbon Source. **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0161251, 2016.
- LOVLEY, D. R. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation.

Nature reviews. Microbiology, v. 1, n. 1, p. 35–44, out. 2003.

LV, Y.-Y. et al. *Dinghuibacter silviterrae* gen. nov., sp. nov., isolated from forest soil.

International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 66, n. 4, p. 1785–91, abr. 2016.

MACOMBER, L.; IMLAY, J. A. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 20, p. 8344–9, 19 maio 2009.

MAGOČ, T.; SALZBERG, S. L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 27, n. 21, p. 2957–63, 1 nov. 2011.

MAKAROVA, K. S. et al. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 467–477, 2011.

MAKAROVA, K. S. et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. **Nature reviews. Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 722–736, 2015.

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, n. 1, p. 31, 2015.

MARTIJN, J. et al. Single-cell genomics of a rare environmental alphaproteobacterium provides unique insights into Rickettsiaceae evolution. **Isme j**, p. 1–13, 2015.

MARTINEZ-GARCIA, M. et al. High-throughput single-cell sequencing identifies photoheterotrophs and chemoautotrophs in freshwater bacterioplankton. **The ISME journal**, v. 6, n. 1, p. 113–23, 2012.

MEDEIROS, J. D. et al. Taxonomic and functional diversity of microbial community from a mining environment. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. Suppl 8, p. A3, 2015.

MEDEIROS, J. D. et al. Comparative metagenome of a stream impacted by the urbanization phenomenon. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 4–14, 2016.

MÉNDEZ-GARCÍA, C. et al. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAY, p. 1–17, 2015.

MIZUNO, C. M.; RODRIGUEZ-VALERA, F.; GHAI, R. Genomes of planktonic acidimicrobiales: Widening horizons for marine actinobacteria by metagenomics. **mBio**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2015.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in enzymology**, v. 155, p. 335–50, 1987.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, 7 maio 2008.

NEWTON, R. J. et al. **A guide to the natural history of freshwater lake bacteria**. [s.l.: s.n.]. v. 75

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

NYLANDER, J. A. A. **MrModeltest v2. Program distributed by the author** Evolutionary Biology Centre, Uppsala University Sweden, 2004.

PAPIRIO, S. et al. Fluidized-bed denitrification for mine waters . Part I : low pH and temperature operation. p. 425–435, 2014.

PARKS, D. H. et al. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome research**, v. 25, n. 7, p. 1043–55, jul. 2015.

- PAULINO, L. C. et al. Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains isolated from mine wastes in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 80, n. 1, p. 65–75, out. 2001.
- PEREIRA, L. B.; VICENTINI, R.; OTTOBONI, L. M. M. Changes in the bacterial community of soil from a neutral mine drainage channel. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e96605, 2014.
- POMEROY, L. R. . et al. The Microbial loop. **Oceanografia**, v. 20, n. 2, p. 28–33, 2007.
- PYLRO, V. S. et al. Detection of Horizontal Gene Transfers from Phylogenetic Comparisons. **International Journal of Evolutionary Biology**, v. 2012, p. 1–7, 2012.
- PYLRO, V. S. et al. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of microbiological methods**, v. 107, p. 30–7, dez. 2014.
- RAGHUNATHAN, A. et al. Genomic DNA Amplification from a Single Bacterium. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3342–3347, 2005.
- RATH, D. et al. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. **Biochimie**, v. 117, p. 119–128, 2015.
- RAWLINGS, D. E. Heavy metal mining using microbes. **Annual review of microbiology**, v. 56, p. 65–91, 2002.
- RAWLINGS, D. E.; JOHNSON, D. B. The microbiology of biomining: Development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. **Microbiology**, v. 153, n. 2, p. 315–324, 2007.
- RICHTER, M.; ROSSELLO-MORA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 45, p. 19126–19131, 10 nov. 2009.
- RINKE, C. et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. **Nature**, v. 499, n. 7459, p. 431–437, 2013.
- RODRIGUEZ-VALERA, F. et al. Explaining microbial population genomics through phage predation. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 828–36, 2009.
- ROSENBERG, E. The Family Chitinophagaceae. In: **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 493–495.
- RUSCH, D. B. et al. The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: Northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. **PLoS Biology**, v. 5, n. 3, p. 0398–0431, 2007.
- SÁNCHEZ-ANDREA, I. et al. *Desulfosporosinus acididurans* sp. nov.: an acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acidic sediments. **Extremophiles**, v. 19, n. 1, p. 39–47, 2015.
- SHADE, A.; HANDELSMAN, J. Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 4–12, 2012.
- SIDDIQI, M. Z.; IM, W.-T. *Niabella aquatica* sp. nov., isolated from lake water. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 31 mar. 2016.
- SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic analyses: past and future trends. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1153–61, fev. 2011.
- SOLA, C. Clustured regularly interspersed short palindromic repeats (CRISPR) genetic diversity studies as a mean to reconstruct the evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 95 Suppl 1, p. S159-66, jun. 2015.
- STEPANAUSKAS, R. Wiretapping into microbial interactions by single cell genomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. April, p. 2014–2016, 2015.

- SUN, C. L. et al. Metagenomic reconstructions of bacterial CRISPR loci constrain population histories. **The ISME journal**, v. 10, n. 4, p. 858–70, abr. 2016.
- SWAN, B. K. et al. Potential for Chemolithoautotrophy Among Ubiquitous Bacteria Lineages in the Dark Ocean. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1296–1300, 2 set. 2011.
- TAKEUCHI, N. et al. Nature and intensity of selection pressure on crispr-associated genes. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 5, p. 1216–1225, 2012.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- TAN, G. L. et al. Seasonal and spatial variations in microbial community structure and diversity in the acid stream draining across an ongoing surface mining site. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 70, n. 2, p. 277–285, 2009.
- TYSON, G. W.; BANFIELD, J. F. Rapidly evolving CRISPRs implicated in acquired resistance of microorganisms to viruses. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 200–207, 2008.
- VALDÉS, J. et al. Acidithiobacillus ferrooxidans metabolism: from genome sequence to industrial applications. **BMC genomics**, v. 9, p. 597, 2008.
- VALENZUELA, L. et al. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 197–211, 2006.
- VAVOURAKIS, C. D. et al. Metagenomic Insights into the Uncultured Diversity and Physiology of Microbes in Four Hypersaline Soda Lake Brines. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. February, p. 1–18, 2016.
- WANG, Y. et al. Comparison of the Levels of Bacterial Diversity in Freshwater, Intertidal Wetland, and Marine Sediments by Using Millions of Illumina Tags. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8264–8271, 1 dez. 2012.
- WEIGOLD, P. et al. A metagenomic-based survey of microbial (de)halogenation potential in a German forest soil. **Scientific reports**, v. 6, p. 28958, 2016.
- WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 12, p. 6578–83, 9 jun. 1998.
- WILLIAMS, H. T. P. Phage-induced diversification improves host evolvability. **BMC evolutionary biology**, v. 13, p. 17, 2013.
- WRIGHT, A. V.; NUÑEZ, J. K.; DOUDNA, J. A. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. **Cell**, v. 164, n. 1–2, p. 29–44, 2016.
- WU, D. et al. A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. **Nature**, v. 462, n. December, p. 1056–1060, 2009.
- XIE, J. et al. GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of microbial communities in acid mine drainage. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 3, p. 991–999, 2011.

8. ANEXOS

Nesse tópico serão descritas as produções em que atuei como autora e co-autora e os manuscritos que ainda estão em preparação. Também serão listados os trabalhos que colaborei, mas que não são parte dessa tese.

8.1. Anexo I

LEITE, LR; MEDEIROS, JD; FERNANDES, GR; ARAÚJO, F; PYLRO, VS; SALIM, AC; VOLPINI, Â; OLIVEIRA, G; CUADROS-ORELLANA, S. Draft Genome Sequence of *Hydrotalea flava* Strain CCUG 51397 T. *Genome Announcements*, v. 4, p. e00527-16, 2016.



genomeA announcements



Draft Genome Sequence of *Hydrotalea flava* Strain CCUG 51397^T

Laura Rabelo Leite,^a Julliane Dutra Medeiros,^a Gabriel Rocha Fernandes,^a Flávio Araújo,^a Victor Satler Pylro,^a Anna Christina Salim,^a Ângela Volpini,^a Guilherme Oliveira,^a Sara Cuadros-Orellana^a

Renê Rachou Research Center Fiocruz, Genomics and Computational Biology Group, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil^a; Vale Institute of Technology, Belém, Pará, Brazil^b

We report the draft genome sequence of *Hydrotalea flava* CCUG 51397^T, the type strain of the genus *Hydrotalea* (family *Chitinophagaceae*), isolated from water samples in southern Sweden.

Received 26 April 2016 Accepted 28 April 2016 Published 9 June 2016

Citation: Leite LR, Medeiros JD, Fernandes GR, Araújo F, Pylro VS, Salim AC, Volpini Â, Oliveira G, Cuadros-Orellana S. 2016. Draft genome sequence of *Hydrotalea flava* strain CCUG 51397^T. *Genome Announcements* 4(3):e00527-16. doi:10.1128/genomeA.00527-16.

Copyright © 2016 Leite et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Laura Rabelo Leite, laurajleite@cpqrr.fiocruz.br.

Hydrotalea flava CCUG 51397^T was isolated from water samples in southern Sweden, as previously described (1). This strain is a Gram-negative, aerobic, rod-shaped, and nonflagellated cell. According to its phylogeny, based on the 16S rRNA gene sequence analysis (1), this strain showed less than 93% similarity to all described species belonging to the *Chitinophagaceae* family, which suggests the new genera *Hydrotalea* (1). Despite the strong taxonomic support for this clade, few genomes related within have been fully sequenced to date. The sequencing of the *Hydrotalea flava* genome will improve our knowledge about the genetic potential and possible adaptive traits of this taxonomic group.

Genomic DNA from *H. flava* strain CCUG 51397^T was obtained from the Culture Collection of the University of Göteborg (CCUG), Sweden (<http://www.ccug.se>). The DNA was paired-end (2×300 -bp) sequenced on an MiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. The quality control of the sequences was performed with Trimmomatic version 0.32 (2), yielding a total of 5,240,937 quality-filtered reads. High-quality data were *de novo* assembled with Velvet (3), using a *k*-mer size of 201, and also using SPADES (4) with a *k*-mer size of 127. To merge and improve the assembly the Mix software (5) was employed. The draft genome consists of 120 contigs, with the longest one being 288,419 bp long and having an N_{50} of 82,600 bp. The estimated genome size is 3.44 Mb, and the average G+C content is 39.2%.

Genome annotation was performed with the RAST server (6). We identified 3,286 protein-coding sequences and 41 predicted noncoding RNAs (39 tRNA, one 16S rRNA, and one 23S rRNA). Analysis of the gene content of *H. flava* revealed the presence of genes coding for some well-known features of the family *Chitinophagaceae*, for example, chitinase genes, rod-shape-related genes (*mreBCD*, *pbp2*, *rodA*), and gliding motility genes (*glbBCDFGHJN*). The SEED categories showed the presence of adaptive genes involved in resistance to antibiotics and toxic compounds, nitrogen metabolism (denitrification), transposable elements and stress response.

Nucleotide sequence accession numbers. This whole-genome shotgun project has been deposited at DDB/ENA/GenBank un-

der the accession number LUHG00000000. The version described in this paper is the first version, LUHG01000000.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Vale for supporting this research (grant no. 1786221).

FUNDING INFORMATION

This work, including the efforts of Victor Satler Pylro, Laura Rabelo Leite, Julliane Dutra Medeiros, Flávio Araújo, Anna Christina de Matos Salim, and Sara Cuadros-Orellana, was funded by Vale (1786221).

This work was funded by Vale (grant no. 1786221). Vale (<http://www.vale.com/EN/Pages/default.aspx>) is a private mining company that supported this work.

REFERENCES

- Kämpfer P, Lodders N, Falsen E. 2011. *Hydrotalea flava* gen. nov., sp. nov., a new member of the phylum Bacteroidetes and allocation of the genera *Chitinophaga*, *Sedimentibacterium*, *Lactibacter*, *Flavinobacter*, *Flavisolibacter*, *Niabella*, *Niastella*, *Segetibacter*, *Parasegetibacter*, *Terrimonas*, *Ferruginibacter*, *Filimonas* and *Hydrotalea* to the family *Chitinophagaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:518–523. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.023002-0>.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Zerbino DR, Birney E. 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* 18:821–829. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.074492.107>.
- Bankевич A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Strotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <http://dx.doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- Soueidan H, Maurer F, Groppe A, Strand-Paguet P, Tardy F, Citti C, Dupuy V, Nkoloko M. 2013. Finishing bacterial genome assemblies with mix. *BMC Bioinformatics* 14(suppl 1):S16. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-14-S15-S16>.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Ditz T, Edwards RA, Formosa K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Pocztan T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.

FUNDA
Downloaded from <http://genomea.asm.org/> on June 9, 2016 by
OSWALDO CRUZ

8.2. Anexo II

MEDEIROS, JD; LEITE, LR; CUADROS-ORELLANA, S; OLIVEIRA, G. Taxonomic and functional diversity of microbial community from a mining environment. *BMC Bioinformatics*, v. 16, p. A3, 2015.

Medeiros et al. *BMC Bioinformatics* 2015, **16**(Suppl 8):A3
<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/16/S8/A3>



MEETING ABSTRACT

Open Access

Taxonomic and functional diversity of microbial community from a mining environment

Julliane D Medeiros¹, Laura R Leite¹, Sara Cuadros-Orellana², Guilherme Oliveira^{2*}

From Latin American Student Council Symposium 2014 (LA-SCS 2014)
Belo Horizonte, Brazil. 27 October 2014

Background

Biomining uses acidophilic and chemolithotrophic microbes capable of oxidizing iron and sulfur to recover metals of interest from complex minerals. One of the most critical issues in mining environments is the generation of acid mine drainage (AMD) that pollutes water and sediments with acids and metals. The Sulfate-reducing bacteria (SRB) are an alternative to bioremediate contamination of AMD. The current knowledge on the microbial diversity and the metabolic pathways involved in biomining and bioremediation is still limited. In this context, metagenomics has become a valuable tool to investigate previously uncultured microorganisms in environmental samples. The aim of this study was to assess the taxonomic and functional microbial diversity in a mining area in the Brazilian Amazon.

Results

We collected acid mining drainage water; sediment and water from the surface and 15 meters depth of a tailings dam that received ~90 million tons of chalcopyrite mining waste. The prokaryotic biomass from water samples was concentrated on filters with 0.22 μm pores. Metagenomic DNA was isolated and the V4 region of the 16S rRNA was amplified. Shotgun and amplicon libraries were sequenced on Ion Torrent platform. We used Qiime to cluster the sequences into OTU and we observed that the microbial diversity was higher on the sediments and AMD metagenomes (Sediment - Chao:1988; Shannon:6.05 / AMD - Chao:2375; Shannon:5.03) compared to the water (Chao:370; Shannon:4.16). MG-RAST was used to classify the reads (representative hit, identity cut-off >=75%) Biomining uses acidophilic and chemolithotrophic microbes capable of oxidizing iron and sulfur to recover metals of

interest from complex minerals. We collected acid mining drainage water; sediment and water from the surface and 15 meters depth of a tailings dam that received ~90 million tons of chalcopyrite mining waste. The prokaryotic biomass from water samples was concentrated on filters with 0.22 μm pores (>=75%), and the results indicate the dominant phyla on water metagenomes were Proteobacteria (49.3%), Actinobacteria (31.6%) and Bacteroidetes (7.6%). The most abundant phyla in sediments were Proteobacteria (48.7%) Bacteroidetes (17.2%) and Firmicutes (7.5%). We analyzed OTUs from specific SRB-families (Thermodesulfobionaceae, Desulfobacteraceae, Syntrophaceae, Peptococcaceae, Desulfuromonadaceae, Desulfomicrobiaceae) and there was an enrichment of these families in sediment and AMD samples. Blastx against NR was used for functionally classify reads in MEGAN using the SEED and KEGG hierarchy.

Conclusions

Despite the prevalence of housekeeping functions, we observed reads matching relevant adaptive traits, such as sulfur oxidation, ABC transporters and resistance to metal. Our data indicate the potential for biomining and bioremediation on the studied environments, however new rounds of sequencing must be done for more conclusive results.

Authors' details

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil. ²CPqRR/Fiocruz, Minas Gerais, Brazil.

Published: 30 April 2015

doi:10.1186/1471-2105-16-S8-A3

Cite this article as: Medeiros et al.: Taxonomic and functional diversity of microbial community from a mining environment. *BMC Bioinformatics* 2015 **16**(Suppl 8):A3.

* Correspondence: oliveira@bio.org

¹CPqRR/Fiocruz, Minas Gerais, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Medeiros et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

8.3. Anexo III

DALL'AGNOL, H; NANCUCHEO, I; JOHNSON, DB; OLIVEIRA, R; LEITE, L; PYLRO, VS; HOLANDA, R; GRALL, B; CARVALHO, N; NUNES, GL; TZOTZOS, G; FERNANDES, GR; **DUTRA, J**; ORELLANA, SC; OLIVEIRA, G. Draft Genome Sequence of - *Acidibacillus ferrooxidans* - ITV01, a Novel Acidophilic Firmicute Isolated from a Chalcopyrite Mine Drainage Site in Brazil. *Genome Announcements*, v. 4, p. e01748-15, 2016.



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

genomeAnnouncements



Draft Genome Sequence of “*Acidibacillus ferrooxidans*” ITV01, a Novel Acidophilic Firmicute Isolated from a Chalcopyrite Mine Drainage Site in Brazil

Hivana Dall'Agnol,^{a*} Ivan Nancucheo,^a D. Barrie Johnson,^b Renato Oliveira,^a Laura Leite,^c Victor S. Pylro,^c Roseanne Holanda,^b Barry Grall,^b Nelson Carvalho,^a Gisele Lopes Nunes,^a George Tzotzos,^{a*} Gabriel Rocha Fernandes,^c Julliane Dutra,^c Sara Cuadros Orellana,^c Guilherme Oliveira^a

Vale Institute of Technology, Belém, Pará, Brazil^a; College of Natural Sciences, Bangor University, Bangor, United Kingdom^b; René Rachou Research Center, Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil^c

* Present address: Hivana Dall'Agnol, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil; George Tzotzos, Independent Researcher, Vienna, Austria.

Here, we report the draft genome sequence of “*Acidibacillus ferrooxidans*” strain ITV01, a ferrous iron- and sulfide-mineral-oxidizing, obligate heterotrophic, and acidophilic bacterium affiliated with the phylum Firmicutes. Strain ITV01 was isolated from neutral drainage from a low-grade chalcopyrite from a mine in northern Brazil.

Received 18 January 2016 Accepted 20 January 2016 Published 17 March 2016

Citation Dall'Agnol H, Nancucheo I, Johnson DB, Oliveira R, Leite L, Pylro VS, Holanda R, Grall B, Carvalho N, Nunes GL, Tzotzos G, Fernandes GR, Dutra J, Orellana SC, Oliveira G. 2016. Draft genome sequence of “*Acidibacillus ferrooxidans*” ITV01, a novel acidophilic firmicute isolated from a chalcopyrite mine drainage site in Brazil. *Genome Announc* 4(2): e01748-15. doi:10.1128/genomeA.01748-15.

Copyright © 2016 Dall'Agnol et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Guilherme Oliveira, guilherme.oliveira@iv.org.

Extreme acidophiles include a large number of species of bacteria, archaea, and some eukaryotic microorganisms that have an optimal pH for growth of <3.0. They are commonly found in geothermal and volcanic areas and also in metal mining sites (mineral spots and drainage waters [1]). Acidophilic bacteria include species of sulfide mineral-oxidizing Gram-positive bacteria, including low-G+C-content Firmicutes of the genera *Sulfobacillus* and *Alicyclobacillus*. These organisms represent a storehouse of physiological, metabolic, and genetic diversity, with many species being able to switch between autotrophic and heterotrophic metabolism or to grow mixotrophically. Many species can use ferrous iron, elemental sulfur, and reduced inorganic sulfur compounds as electron donors (lithotrophy), and some species can also obtain energy from organic substances (organotrophy) [1]. Some apparently novel strains of acidophilic iron-oxidizing Firmicutes were previously isolated from sulfidic mineral waste [2], and more recently, the novel genus “*Acidibacillus*” and binomial species “*Acidibacillus ferrooxidans*” proposed for these and other closely related isolated mesophilic species that oxidized ferrous iron but not elemental sulfur [3]. One of these novel strains, ITV01, had been isolated from an acidic stream draining from a low-grade chalcopyrite ore pile in a mine located in the southern border of the Carajás belt, Pará State, Brazil, in December 2013.

Sequencing of the “*A. ferrooxidans*” ITV01 genome was performed on an Ion Personal Genome Machine (PGM) (Thermo Fisher Scientific). Two libraries were produced. The first was constructed from DNA fragmented by sonication and the second from enzymatically fragmented genomic DNA. The two libraries generated 2,342,447 and 2,502,004 reads, respectively. A total of 1.7 Gb of fragment reads were produced, with an average length of 300 bp. Raw sequences were trimmed based on quality criteria (Phred Q ≥ 20) using PRINSEQ, and homopolymers >6 bp were

discarded [4]. After trimming, 88% of the reads of the first library and 90% of the second library passed quality control (~567-fold genome coverage). Draft *de novo* genome assemblies were generated using Newbler (454 Sequencing) and SPAdes [5], merged using the Mtx Pipeline [6]. The final assembly produced 72 contigs, with a total length of 3,164,591 bp and a contig N_{50} of 104,067 bp. The average DNA G+C content was 52.1%.

Protein-coding sequences (CDSs) and tRNA genes were predicted by PATRIC [7]. Functional annotations of 3,402 protein-coding genes were obtained, with 1,786 genes having known functions and 1,616 encoding hypothetical proteins. In addition, one copy each of 16S rRNA and 23S rRNA, two copies of 5S rRNA, and 58 tRNA genes were predicted using RNAMmer [8] and tRNAscan-SE [9].

Nucleotide sequence accession numbers. This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession no. LPVJ00000000. The version described in this paper is version LPVJ01000000.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Vale. The funders had no role in the study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication. CNPq supported R.O. and G.L.N. (grant 459913/2014-0).

FUNDING INFORMATION

This work, including the efforts of Hivana Dall'Agnol, Ivan Nancucheo, D. Barrie Johnson, Renato Oliveira, Laura Leite, Victor S. Pylro, Nelson Carvalho, Gisele Lopes Nunes, George Tzotzos, Gabriel Rocha Fernandes, Julliane Dutra, Sara Cuadros Orellana, and Guilherme Oliveira, was funded by Vale. This work, including the efforts of Renato Oliveira and Gisele Lopes Nunes, was funded by MCTI | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (459913/2014-0).

Vale (<http://www.vale.com/EN/Pages/default.aspx>) is a private mining company that supported this work.

8.4. Anexo IV

CUADROS-ORELLANA, S; LEITE, LR; SMITH, A; MEDEIROS, JD; BADOTTI, F; FONSECA, PLC; VAZ, ABM; OLIVEIRA, G; GOES-NETO, A. Assessment of Fungal Diversity in the Environment using Metagenomics: a Decade in Review. *Fungal Genomics and Biology*, v. 3, p. 1-13, 2013.



Assessment of Fungal Diversity in the Environment using Metagenomics: a Decade in Review

Sara Cuadros-Orellana¹, Laura Rabelo Leite², Ash Smith¹, Julliane Dutra Medeiros², Fernanda Badotti^{1,4}, Paula LC Fonseca^{1,4}, Aline BM Vaz^{3,4}, Guilherme Oliveira³ and Aristóteles Góes-Neto^{1,4*}

¹Research Centre René Rachou, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) - Belo Horizonte, MG, Brazil

²Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

³State University of Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, BA, Brazil

Abstract

Fungi are ubiquitous inhabitants of soil and aquatic environments, and they establish and maintain either parasitic or symbiotic relationships with animals and plants. They are major players in nutrient cycling, especially in organic matter decomposition, and they are major sources of biologically active substances. However, their full metabolic potential is yet to be unveiled, and fungal enzymes could be of great use in myriad of applications from industrial processes to natural products. The global number of species in the fungal kingdom has been estimated in the range of one to a few million, but it is likely larger, as suggested by recent metagenomic studies that revealed the existence of fungal diversity hotspots. In this review, we describe the main advances in the study of fungal diversity, present statistics of the main metagenomic databases with regard to the representativeness of fungal phyla, and discuss the future directions in this field.

Keywords: Fungal diversity; Next-generation sequencing; ITS; Environmental genomics; Metagenomics

Abbreviations: AD: Atopic Dermatitis; AFTOL: Assembling the Fungal Tree of Life; BLAST: Basic Local Alignment Search Tool; BOLD SYSTEMS: Barcode of Life Data Systems; CAMERA: Community Cyberinfrastructure for Advanced Microbial Ecology Research & Analysis; CloVR: Cloud Virtual Resource; DDB: DNA Data Bank of Japan; DFPV: Database of Fungal Virulence Factors; DOE/US: United States Department of Energy; EMBL: European Molecular Biology Laboratory; Fungi DB: Fungal and Oomycete Genomics Resources; GI: Gastrointestinal; GOLD: Genomes Online Database IMG/HMP M: Integrated Microbial Genomes with Human Microbiome Project; IMG/M: Integrated Microbial Genomes with Microbiome Samples; INSd: International Nucleotide Sequence Databases; ITS: Internal Transcribed Spacer; ITS1: Ribosomal Internal Transcribed Spacer 1; ITS2: Ribosomal Internal Transcribed Spacer 2; ITSone DB: Collection of the fungal ribosomal RNA Internal Transcribed Spacer 1; LSU: Large Subunit; MEGAN: MEtaGenome Analyzer; MG-RAST: Metagenomics RAST Server (RAST: Rapid Annotation using Subsystem Technology); NCBI: National Center for Biotechnology Information; NGS: Next Generation Sequencing; OUT: Operational Taxonomic Unit; PCR: Polymerase Chain Reaction; PHYMYCO-DB: Fungi phylogenetic sequences database; PlutoF: Web Based Workbench for Ecological and Taxonomic Research; QIIME: Quantitative Insights into Microbial Ecology; RDP: Ribosomal Database Project; SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms; SSU: Small Subunit; UNITE: Fungal rDNA; ITS: sequence database; WGS: Whole Genome Shotgun

Introduction

Fungal diversity studies have traditionally relied on morphologic and other phenotypic characteristics, and these were for many years the main criteria for fungal classification [1]. However, due to the instability of morphological traits, the existence of intermediate forms and the phenotypic overlap between different taxa [2], these methods alone do not enable a reliable identification of fungi at lower taxonomic levels [3], even at the light of modern techniques [4]. Molecular taxonomy has partially solved this problem, allowing for better species classification of fungi [2,3,5-7], even though some authors believe the ribosomal DNA

sequence alone is not inherently superior to morphological taxonomy [8]. Thus, the use of hybrid approaches has been the methodological choice in many studies [6,7].

The development of whole shotgun genome sequencing in the late 1990s boosted eukaryote genomics, and a main landmark in this field was the sequencing and assembly of the first fungal genome: that of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [9]. The number of complete fungal genomes sequenced has increased considerably since then (more than 2,400 fungal genome projects were registered at GOLD (Genomes Online Database) at the time of writing this manuscript), together with the number of fungal sequences in environmental DNA databases, as reviewed herein. This increase reflects the advances in the area of metagenomics (also referred to as environmental genomics or community genomics) - a culture-independent approach for the study of genomes collectively recovered from the environment [10-13]. The term "environment" here is used in a broad sense, comprising all typical environmental compartments (air, soil, sediments, continental, oceanic, and ground water) as well as the external and internal surfaces and microenvironments within macroorganisms [14].

The idea of collectively analyzing microbial communities and directly assessing their genomes is not new [15-17]. It can be traced back to a period long before the first organism had its genome completely sequenced [18] or the term "metagenomics" was officially coined and first appeared in a scientific work [19].

*Corresponding author: Aristóteles Góes-Neto, State University of Feira de Santana (UEFS), Av. Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, Feira de Santana, BA, Brazil, 44036-900, Tel: 55 75 31618296; Fax: 55 75 3161 8132; E-mail: arigoesneto@gs.unq.br

Received July 23, 2013; Accepted November 15, 2013; Published November 18, 2013

Citation: Cuadros-Orellana S, Leite LR, Smith A, Medeiros JD, Badotti F, et al. (2013) Assessment of Fungal Diversity in the Environment using Metagenomics: a Decade in Review. *Fungal Genom Biol* 3: 110. doi:10.4172/2165-8056.1000110

Copyright: © 2013 Cuadros-Orellana S, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

8.5. Anexo V

Artigo publicado não relacionado à tese.

PYLRO, VS; OLIVEIRA, FS; MORAIS, DK; CUADROS-ORELLANA, S; PAIS, FS; **MEDEIROS, JD**; GERALDO, JA; GILBERT, J; VOLPINI, AC; FERNANDES, GR. ZIKV - CDB: A Collaborative Database to Guide Research Linking SncRNAs and ZIKA Virus Disease Symptoms. PLoS Neglected Tropical Diseases (Online), v. 10, p. e0004817, 2016.

RESEARCH ARTICLE

ZIKV – CDB: A Collaborative Database to Guide Research Linking SncRNAs and ZIKA Virus Disease Symptoms

Victor Sattler Pyro^{1,6*}, Francislton Silva Oliveira^{1,6}, Daniel Kumazawa Moraes¹, Sara Cuadros-Orellana¹, Fabiano Sviatopolk-Mirsky Pais¹, Julliane Dutra Medeiros¹, Juliana Assis Geraldo¹, Jack Gilbert^{2,3,4}, Angela Cristina Volpini¹, Gabriel Rocha Fernandes^{1*}

1 Biosystems Informatics and Genomics Group, René Rachou Research Center (CPqRR-FIOCRUZ), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Department of Ecology and Evolution, The University of Chicago, Chicago, Illinois, United States of America, **3** Argonne National Laboratory, Institute for Genomic and Systems Biology, Argonne, Illinois, United States of America, **4** Department of Surgery, The University of Chicago, Chicago, Illinois, United States of America

* These authors contributed equally to this work.

* victor.pyro@cpqrr.fiocruz.br (VSP); gabriel.fernandes@cpqrr.fiocruz.br (GRF)



OPEN ACCESS

Citation: Pyro VS, Oliveira FS, Moraes DK, Cuadros-Orellana S, Pais FS-M, Medeiros JD, et al. (2016) ZIKV – CDB: A Collaborative Database to Guide Research Linking SncRNAs and ZIKA Virus Disease Symptoms. PLoS Negl Trop Dis 10(6): e0004817. doi:10.1371/journal.pntd.0004817

Editor: Ken E. Olson, Colorado State University, UNITED STATES

Received: March 18, 2016

Accepted: June 7, 2016

Published: June 22, 2016

Copyright: This is an open access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the [Creative Commons CC0 public domain dedication](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Data Availability Statement: All files are available from the ZIKV-CDB database at <http://zikv-cdb.cpqrr.fiocruz.br>.

Funding: FAPEMIG, CNPq and CAPES funded this work. FSMP received research fellowship from the CNPq (process number 16822/2014-7). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

In early 2015, a ZIKA Virus (ZIKV) infection outbreak was recognized in northeast Brazil, where concerns over its possible links with infant microcephaly have been discussed. Providing a causal link between ZIKV infection and birth defects is still a challenge. MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs (sncRNAs) that regulate post-transcriptional gene expression by translational repression, and play important roles in viral pathogenesis and brain development. The potential for flavivirus-mediated miRNA signalling dysfunction in brain-tissue development provides a compelling hypothesis to test the perceived link between ZIKV and microcephaly.

Methodology/Principal Findings

Here, we applied *in silico* analyses to provide novel insights to understand how Congenital ZIKA Syndrome symptoms may be related to an imbalance in miRNAs function. Moreover, following World Health Organization (WHO) recommendations, we have assembled a database to help target investigations of the possible relationship between ZIKV symptoms and miRNA-mediated human gene expression.

Conclusions/Significance

We have computationally predicted both miRNAs encoded by ZIKV able to target genes in the human genome and cellular (human) miRNAs capable of interacting with ZIKV genomes. Our results represent a step forward in the ZIKV studies, providing new insights to support research in this field and identify potential targets for therapy.

8.6. Anexo VI

SILVA, UC; MEDEIROS, JD; LEITE, LR; MORAIS, DK; CUADROS-ORELLANA, S; OLIVEIRA, CA; LANA, UGP; GOMES, EA; DOS SANTES, VL. Long-term rock phosphate fertilization impacts the microbial communities of maize rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*. 8:1266, 2017



Long-Term Rock Phosphate Fertilization Impacts the Microbial Communities of Maize Rhizosphere

Ubiana C. Silva¹, Julliane D. Medeiros², Laura R. Leite², Daniel K. Morais^{2,3}, Sara Cuadros-Orellana^{2,4}, Christiane A. Oliveira⁵, Ubiraci G. de Paula Lana⁶, Eliane A. Gomes⁷ and Vera L. Dos Santos^{1*}

¹ Microbiology Department, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ² Biosystems Informatics and Genomics Group, René Rachou Research Center, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Brazil, ³ Microbiology Institute, Czech Academy of Sciences – CAS, Prague, Czechia, ⁴ Centro de Biotecnología de los Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Católica del Maipo, Talca, Chile, ⁵ Embrapa Milho and Sorgo, São Carlos, Brazil

Phosphate fertilization is a common practice in agriculture worldwide, and several commercial products are widely used. Triple superphosphate (TSP) is an excellent soluble phosphorus (P) source. However, its high cost of production makes the long-term use of crude rock phosphate (RP) a more attractive alternative in developing countries, albeit its influence on plant-associated microbiota remains unclear. Here, we compared long-term effects of TSP and RP fertilization on the structure of maize rhizosphere microbial community using next generation sequencing. Proteobacteria were dominant in all conditions, whereas Oxalobacteraceae (mainly *Massilia* and *Herbaspirillum*) was enriched in the RP-amended soil. *Klebsiella* was the second most abundant taxon in the RP-treated soil. *Burkholderia* sp. and *Bacillus* sp. were enriched in the RP-amended soil when compared to the TSP-treated soil. Regarding fungi, Glomeromycota showed highest abundance in RP-amended soils, and the main genera were *Scutellospora* and *Rhizoglomerula*. These taxa are already described as important for P solubilization/acquisition in RP-fertilized soil. Maize grown on TSP and RP-treated soil presented similar productivity, and a positive correlation was detected for P content and the microbial community of the soils. The results suggest changes of the microbial community composition associated to the type of phosphate fertilization. Whilst it is not possible to establish causality relations, our data highlights a few candidate taxa that could be involved in RP solubilization and plant growth promotion. Moreover, this can represent a shorter path for further studies aiming the isolation and validation of the taxa described here concerning P release on the soil plant system and their use as bioinoculants.

Keywords: microbial community, maize rhizosphere, rock phosphate

INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is one of the main cereals produced in the world, with approximately 900 million tons produced annually (United State Department of Agricultural, 2017). Phosphorus (P) is an essential nutrient for this crop, especially in the flowering and grain filling stages (Vasconcellos et al., 2000) and to ensure this production, millions of tons of P fertilizer are added to soils each year

OPEN ACCESS

Edited by:

Diana Elizabeth Marco,
National Scientific and Technical
Research Council (CONICET),
Argentina

Reviewed by:

Aymé Spor,
INRA, UMR1347 Agroécologie,
France
David Dowling,
Institute of Technology Carlow, Ireland

*Correspondence:

Vera L. Dos Santos
vorabio@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Symbiosis,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 27 April 2017

Accepted: 23 June 2017

Published: 11 July 2017

Citation:

Silva UC, Medeiros JD, Leite LR,
Morais DK, Cuadros-Orellana S,
Oliveira CA, de Paula Lana UG,
Gomes EA and Dos Santos VL
(2017) Long-Term Rock Phosphate
Fertilization Impacts the Microbial
Communities of Maize Rhizosphere.
Front. Microbiol. 8:1266.
doi: 10.3389/fmicb.2017.01266

8.7. Anexo VII – Outras publicações

Artigos em preparação:

LEITE, LR; **MEDEIROS, JD**; PYLRO, VS; ARAUJO, F; SALIM, AC; VOLPINI, A; ORELLANA, SC; OLIVEIRA, G; FERNANDES, GR. Linking biodiversity and potential functional role in a copper mine tailings dam.

Premiação:

Prêmio Paulo Sodero Martins- Melhor trabalho oral na área de Genômica e Bioinformática, 61° Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, Setembro 2015. Trabalho intitulado “Single-cell amplified genomes from acid mine drainage in the Brazilian Amazon”.

Resumos publicados em eventos:

MEDEIROS, JULLIANE D; LEITE, L. R. ; OLIVEIRA, F. S. ; PYLRO, V. S. ; FERNANDES, G. R. ; OLIVEIRA, G. ; CUADROS-ORELLANA, SARA . Insights into the population history of free-living bacteria as counted by their CRISPR inventory. In: International Society for Microbial Ecology-ISME, 2016, Montreal. International Society for Microbial Ecology, 2016.

LEITE, L. R. ; **MEDEIROS, JULLIANE DUTRA** ; PYLRO, V. S. ; OLIVEIRA, G. ; FERNANDES, G. R. ; CUADROS-ORELLANA, S. . Functional diversity in a copper acid mine drainage: metagenomics and single cell analysis. In: International Society for Microbial Ecology-ISME, 2016, Montreal. International Society for Microbial Ecology, 2016.

OLIVEIRA, F. S. ; PYLRO, V. S. ; MORAIS, D. K. ; CUADROS-ORELLANA, S. ; PAIS, F. S. ; **MEDEIROS, JULLIANE DUTRA** ; GERALDO, J. A. ; GILBERT, J. A. ; VOLPINI, A. A. ; FERNANDES, G. R. . ZIKV-CDB: A collaborative database to help understanding symptoms induced by ZIKA virus infection mediated by small noncoding RNAs. In: ISMB, 2016, Orlando. ISMB, 2016.

LEITE, L. R. ; **MEDEIROS, JULLIANE DUTRA** ; FERNANDES, G. R. ; ARAUJO, F. ; PYLRO, V. S. ; SALIM, A. C. M. ; VOLPINI, A. A. ; CUADROS-ORELLANA, S. ; OLIVEIRA, G. . Microbial diversity in a copper mine tailings dam. In: ISMB, 2016, Orlando. ISMB, 2016.

MEDEIROS, J. D.; LEITE, L. R. ; CUADROS-ORELLANA, S. ; PYLRO, V. S. ; FERNANDES,

G. R. ; OLIVEIRA, G. Single-cell amplified genomes from acid mine drainage in the Brazilian Amazon. In: 61 Congresso Brasileiro de Genética, 2015, Águas de Lindóia. 61 Congresso Brasileiro de Genética, 2015.

ALMEIDA, V. M. ; **MEDEIROS, J. D.** ; FERNANDES, G. R. ; LEITE, L. R. ; CUADROS-ORELLANA, S. ; PYLRO, V. S. ; OLIVEIRA, G. . Study of microbial community from a mining environment. In: 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis. 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015.

MEDEIROS, J. D.; LEITE, L. R. ; CUADROS-ORELLANA, S. ; OLIVEIRA, G. . Metagenomics of a mining environment in the Brazilian Amazon. In: 20th International Microbial Genomes Conference, 2014, Lake Arrowhead. 20th International Microbial Genomes Conference, 2014.

CUADROS-ORELLANA, S. ; LEITE, L. R. ; **MEDEIROS, J. D.** ; OLIVEIRA, G. . Metagenomics for Biotechnology in the Mining Industry. In: 15th International Symposium on Microbial Ecology, 2014, Seoul. 15th International Symposium on Microbial Ecology, 2014.

OLIVEIRA, G. ; LEITE, L. R. ; **MEDEIROS, JULLIANE DUTRA** ; BADOTTI, F. ; CUADROS-ORELLANA, S. . Compiling Genetic Parts for Synthetic Biology. In: Plant and Animal Genome Conference, 2014, San Diego. Plant and Animal Genome Conference, 2014.