



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA – DQB



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR - PPBM

Metagenômica de amostras da comunidade microbiana em um ambiente urbano exposto a resíduos industriais no Riacho dos Macacos em Juazeiro do Norte - CE

Jayze da Cunha Xavier

Crato – CE

2018

JAYZE DA CUNHA XAVIER

Metagenômica de amostras da comunidade microbiana em um ambiente urbano exposto a resíduos industriais no Riacho dos Macacos em Juazeiro do Norte - CE

Dissertação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri-URCA, como requisito para obtenção qualificação da dissertação do mestrado.

Crato-CE

2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri – URCA
Bibliotecária: Ana Paula Saraiva CRB: 3/1000

Xavier, Jayze da Cunha.
X3m Metagenômica de amostras da comunidade microbiana em um ambiente urbano exposto a resíduos industriais no Riacho dos Macacos em Juazeiro do Norte - CE/ Jayze da Cunha Xavier. – Crato-CE, 2018.
69p.; il.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA,
Orientador: Prof. Dr. Leandro Lima Verde

1. Cobre, 2. Zinco, 3. Mi-seq, 4. Shotgun; I. Título.

CDD: 546.6

Metagenômica de amostras da comunidade microbiana em um ambiente urbano exposto a resíduos industriais no Riacho dos Macacos em Juazeiro do Norte - CE

Dissertação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri-URCA, como requisito para obtenção qualificação da dissertação do mestrado.

Jayze da Cunha Xavier

Aprovado em: 13/07/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Leandro Lima Verde (Orientador)

Departamento de Química Biológica - URCA.

Prof. Dr. Henrique Douglas de Melo Coutinho

Departamento de Química Biológica - URCA

Prof^a. Dra. Maria Gorethe de Sousa Lima

UFCA

Suplente:

Prof^a. Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga

Departamento de Ciências Biológicas- URCA.

Crato – CE

2018

RESUMO

Os metais pesados são elementos naturalmente presentes no ambiente. Apesar de alguns serem essenciais ao metabolismo da maioria dos organismos, em concentrações maiores, podem tornar-se altamente tóxicos. Como são geralmente persistentes, muitos desses metais permanecem acumulados no ambiente e na cadeia alimentar dificultando a sua remoção. Alguns microrganismos tornaram-se resistentes aos metais devido a exposição prolongada e excessiva causada por ações antropogênicas como resíduos industriais sem tratamento, mineração, disposição inadequada do lixo, entre outros. O problema da acumulação de metais no ambiente é mundial e nem sempre técnicas físico-químicas são eficientes na sua remoção do ambiente. Uma alternativa viável economicamente em relação a métodos físicos para a retirada dos metais pesados é a utilização de microrganismos resistentes a estes metais, chamado processo de biorremediação. Pesquisas em torno da comunidade de ambientes contaminados são importantes para entender e identificar possíveis bioindicadores de poluição e conhecer a dinâmica da comunidade microbiana presente. Este trabalho tem o objetivo de mapear a comunidade microbiana do Riacho dos Macacos em Juazeiro do Norte-CE, contaminado com metais pesados, verificando a presença e comparando com o Rio Granjeiro considerado local de referência quanto a presença de genes de resistência ao cobre e ao zinco. Foram retiradas 150 g de amostra do solo em triplicada em seguida foi extraído o DNA microbiano com *Power Soil™ Isolation Kit* para posterior sequenciamento do tipo *shotgun* utilizando o *Illumina Mi-seq*, sequenciador de última geração e análise físico-química. Os dados obtidos foram todos filtrados e reunidos no MG-RAST. Foi detectada a presença de genes resistentes a metais como *czc* e abundância de bactérias do filo *Proteobacteria* e *Actinobacteria* e, ambos os ambientes, maior abundância do gênero *Nocardioides* e *Pseudomonas* no Riacho dos Macacos e os gêneros *Pseudomonas* e *Bradyrhizobium* no Rio Granjeiro. Os resultados obtidos ofereceram informações sobre a presença de potenciais genes de resistência a metais pesados, o que proporciona um melhor entendimento da comunidade microbiana na adaptação aos danos ambientais e seu uso como indicadores de qualidade ambiental para estudos mais aprofundados futuramente na área.

Palavras-chave: cobre, zinco, *Mi-seq*, *shotgun*

ABSTRACT

Heavy metals are naturally occurring elements in the environment. Although some are essential to the metabolism of most organisms, in higher concentrations, they can become highly toxic. As they are generally persistent, many of these metals remain accumulated in the environment and the food chain making it difficult to remove them. Some microorganisms have become resistant to metals due to prolonged and excessive exposure caused by anthropogenic actions such as untreated industrial waste, mining, improper waste disposal, among others. The problem of the accumulation of metals in the environment is worldwide and physico-chemical techniques are not always efficient in their removal from the environment. An economically viable alternative to physical methods for the removal of heavy metals is the use of microorganisms resistant to these metals, called a bioremediation process. Researches around the community of contaminated environments are important to understand and identify possible bioindicators of pollution and to know the dynamics of the microbial community present. This work has the objective of mapping the microbial community of the Riacho dos Macacos in Juazeiro do Norte-CE, contaminated with heavy metals, verifying the presence and comparing with the Rio Granjeiro considered a reference site for the presence of resistance genes to copper and zinc. 150 g of soil sample was removed in triplicate and the microbial DNA was extracted with *Power Soil™ Isolation Kit* for later *shotgun* type sequencing using the Illumina Mi-seq, state-of-the-art sequencer and physico-chemical analysis. The obtained data were all filtered and pooled into MG-RAST. The presence of metal resistant genes such as *czc* and abundance of bacteria of the phylum *Proteobacteria* and *Actinobacteria* were detected, and both environments showed greater abundance of the genus *Nocardioides* and *Pseudomonas* in the banks of the Monkey Creek and the genera *Pseudomonas* and *Bradyrhizobium* on the banks of the Rio Granjeiro. The results obtained provided information about the presence of potential resistance genes to heavy metals, which provides a better understanding of the microbial community in the adaptation to environmental damage and its use as indicators of environmental quality for further studies in the area.

Keywords: copper, zinc, Mi-seq, shotgun

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Cu^{2+} - Cobre

Zn^{2+} - Zinco

Hg^{2+} - Mercúrio

Cr^{3+} - Cromo

Pb^{2+} - Chumbo

Ag^{+} - Prata

Ni^{2+} - Níquel

Cd^{2+} - Cádmio

Co^{2+} - Cobalto

UFCA – Universidade Federal do Cariri

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estratégias de remoção biológica bacteriana..... 14

FIGURAS DO ARTIGO

Figura 01- Classificação filogenética dos *reads* obtidos do sequenciamento do metagenoma das amostras do Riacho dos Macacos e Rio Granjeiro. Resultados para filós obtidos pelo MG-RAST utilizando o banco de dados SEED 28

Figura 02 – Abundância das funções apresentadas na análise metagenômica do Riacho dos Macacos e do Rio Granjeiro 30

Figura 03 – Genes de resistência ao zinco encontrados no Riacho dos Macacos (RM) e no Rio Granjeiro (RG) 31

Figura 04 – Genes de resistência ao cobre encontrados no Riacho dos Macacos (RM) e no Rio Granjeiro (RG) 32

Figura 05 – Comparação de genes resistentes mais abundantes encontrados nos gêneros. Número de genes resistentes ao Cobre..... 33

Figura 06 - Comparação de genes resistentes mais abundantes encontrados nos gêneros. Número de genes resistente ao Zinco 35

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	09
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. REFERENCIAL TEÓRICO	11
3.1 Metais Pesados	12
3.2 Técnicas de Remoção	13
3.3 Microrganismos e genes de resistência aos metais pesados	16
4. CAPÍTULO 01 - Análise metagenômica de genes de resistência a metais pesados da comunidade microbiana no riacho dos Macacos em Juazeiro do Norte-CE	19
5. CONCLUSÃO	41
6. REFERÊNCIAS	
ANEXO	

1 INTRODUÇÃO

A expressão “metal pesado” denomina os elementos químicos que possuem massa específica maior que 5 g/cm^3 ou que possuem número atômico superior a 20 (GONÇALVES Jr. et al., 2000). Por outro lado, Duffus (2002) observa que atualmente tem-se utilizado o termo metais traços por alguns serem essenciais para a vida em pequenas concentrações. Metais pesados também podem ser denominados metais tóxicos devido à toxicidade conhecida (NARASIMHULU, 2010; ISSAZADEH, 2013). Eles permanecem por um período indefinido no ecossistema, representando um grande desafio para a remediação, um processo de eliminação dos efeitos nocivos provocados por elementos tóxicos (SOARES; SOARES, 2012).

A contaminação por metais tóxicos representa um importante problema ambiental, pois além da sua presença em atividades naturais tais como emissões vulcânicas e atividades biológicas, quase todas as atividades humanas como mineração, queima de combustíveis fósseis, processos industriais em geral, alimentos processados, eliminação de resíduos domésticos, hospitalares e industriais têm contribuído para o aumento da concentração destes metais no ambiente (ARYAL; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2015).

Sabe-se que em altas concentrações, todos os tipos de metais tóxicos podem causar um grande efeito deletério no ambiente (CHENG, 2003). Este problema pode agravar ainda mais os sistemas de drenagem, tendo influência direta sobre vários aspectos nos recursos hídricos que cortam as cidades e os seus entornos.

Metais pesados como mercúrio (Hg^{2+}), cromo (Cr^{3+}), cobre (Cu^{2+}), zinco (Zn^{2+}), chumbo (Pb^{2+}), prata (Ag^+), níquel (Ni^{2+}) e cádmio (Cd^{3+}) são bem conhecidos por sua toxicidade, efeitos mutagênicos e carcinogênicos sobre os seres humanos e outros sistemas vivos (NIES, 1999, 2003; ADRIANO, 2001; DAS et al, 2008). Eles podem acumular-se em sistemas biológicos e serem introduzidos na cadeia alimentar causando danos ao meio ambiente (HOOKOOM; PUCHOOA, 2013) e ao atingirem os corpos hídricos podem passar de invertebrados bentônicos para moluscos, destes para peixes e conseqüentemente para humanos à medida que se bioacumulam progressivamente (POLAK-JUSZCZAK, 2013).

Muitas bactérias têm conseguido adaptar-se à presença de metais tóxicos e essa capacidade tem sido estudada em algumas pesquisas durante os últimos anos utilizando bactérias isoladas de ambientes contaminados com metais pesados na sua remoção em efluentes industriais (JANSSEN, 2010; MUSTAPHA; HALIMOON, 2015). Dentre os microrganismos identificados estão *Bacillus cereus* no tratamento de efluentes (DHANWAL et al, 2018), *Pseudomonas sp*, *Aeromonas sp* e *Bacillus sp* no tratamento de resíduos de cervejarias (OLJIRA et al, 2018) e *Microbacterium sp.* na remoção de cromo em efluentes (GONZÁLES et al, 2017). Sendo assim, a remoção de metais utilizando metodologias baseadas em microrganismos resistentes a metais pesados por biorremediação, pode fornecer um meio alternativo por razões econômicas e de proteção ambiental (GADD, 2010).

Na região do Cariri cearense os recursos hídricos subterrâneos representam a maior e mais importante fonte de água potável para abastecimento, bem como para as diversas áreas de atividade agrícola, industrial e de lazer (NASCIMENTO, 2012). Cientes deste fato, pesquisadores da Universidade Federal do Cariri – UFCA, estudaram vários pontos de contaminação de metais pesados, provenientes de instalações industriais, nos rios e lagos da cidade de Juazeiro do Norte-CE. Dentre os pontos estudados um dos mais contaminados com metais pesados foi o Riacho dos Macacos e a maior concentração encontrada foi cobre e zinco (SILVA, 2013) motivo pelo qual são os metais estudados nesta pesquisa. Contudo, além da detecção da presença de metais, da microbiota e dos genomas presentes nos ambientes contaminados é de extrema importância para um estudo mais amplo da contaminação e do impacto causado a diversidade microbiana. Este estudo possibilita futuras sugestões de bioindicação de microrganismos presentes em ambientes contaminados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este estudo objetiva averiguar a diversidade dos genes envolvidos na resistência dos metais pesados presentes em maior concentração, cobre e zinco, na comunidade de bactérias de amostras coletadas nas margens do Riacho dos Macacos localizado no município do Juazeiro do Norte-CE contaminado com resíduos industriais e comparar com a comunidade microbiana do Rio Granjeiro localizado no município do Crato-CE, ambiente de referência, onde a presença de metais pesados é reduzida.

2.2 Objetivos Específicos

1. Quantificar o cobre e o zinco nas áreas de estudo.
2. Caracterizar a diversidade da comunidade microbiana presente nas margens do Riacho dos Macacos impactado com metais pesados em relação a comunidade microbiana presente na amostra de solo das margens do Rio granjeiro considerado referência devido a mínima concentração dos metais;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Metais pesados

No grupo dos metais pesados englobam-se metais e metalóides com densidade atômica cinco vezes maior que a da água (5 g/cm^3) como chumbo (Pb^{2+}), Mercúrio (Hg^{2+}), Arsênio (As^{2+}), Cádmio (Cd^{2+}), (Fe^{2+}) e alguns apesar de se tratarem de micronutrientes essenciais para os seres vivos, em maiores concentrações podem causar vários problemas, devido não serem degradáveis como os poluentes orgânicos, pesticidas e fertilizantes (HOOKOOM; PUCHOOA, 2013).

Cada metal possui uma toxicidade específica. O chumbo forma espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e dano celular, além disso, compete com o cálcio, acumula-se nos ossos, afeta o sistema nervoso central, cardiovascular, endócrino, reprodutor e hematopoiético (TCHOUNWOU et al, 2012; LAM et al, 2007). O mercúrio é altamente tóxico, afeta vários tecidos incluindo fígado, rins e sistema nervoso central e assim como o arsênio, também forma metil e tiol prejudiciais, causa doenças de pele e possui efeitos carcinogênicos (FARINA et al, 2007; DAS et al, 2014; JAISHANKAR et al, 2014).

Outros metais tóxicos como o cádmio, a nível celular liga-se a proteínas essenciais afetando a proliferação celular, diferenciação e causando apoptose, já ao organismo causa toxicidades endócrinas e reprodutivas (JAISHANKAR et al, 2014; RANI et al, 2014). O ferro penetra nos órgãos e causa peroxidação lipídica (JAISHANKAR et al, 2014). Assim como os metais cromo e zinco, o ferro influencia na estabilidade das membranas celulares, síntese de ácidos nucleicos e estabilidade do DNA (ZETIC et al, 2001). O Cromo por sua vez, pode causar danos aos rins, fígado, circulação e nervos (KOTAS; STASICKA, 2000). O cromo é capaz de provocar mutações, na sua forma hexavalente (Cr^{+6}) é altamente tóxico e carcinogênico (BOLAN et al, 2003; SOMADUNDARAM et al, 2009).

O zinco está envolvido em funções enzimáticas de plantas, metabolismo dos carboidratos e síntese de proteínas além da sua exposição crônica poder interferir na absorção do cobre levando a letargia e problemas gastrointestinais (TOLER et al, 2005). Pode também influenciar na estabilidade das membranas celulares bem como na síntese de ácidos nucleicos e na estabilização de DNA (ZETIC et al, 2001).

O cobre é um elemento essencial em pequenas quantidades na participação de processos vitais e apenas em altas concentrações é que seus efeitos se tornam danosos dependendo da forma de contaminação, da concentração e do tempo de exposição (KNURA, 2016). Segundo Moraes (2010), o cobre é bastante utilizado como agente oxidante e como corante na fabricação têxtil, além de ser fungicida, inseticida e aditivo do solo.

O $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ interage facilmente com os radicais devido ao potencial eletroquímico, principalmente o oxigênio molecular, propriedade que o torna muito tóxico e causa sensibilidade em muitos microrganismos. Essa toxicidade baseia-se na produção de radicais livres superóxido e na interação com a célula (NIES, 1999). Em humanos o metal pode causar danos ao pâncreas, fígado e rins podendo chegar a morte (SRIVASTAVA et al, 2015).

Este metal atua como co-fator de algumas famílias de proteínas ligantes de metais com baixo peso molecular, denominadas metaloenzimas, encontradas em animais, plantas superiores e microrganismos, sendo os mais resistentes principalmente os procariotos, está envolvido na produção de sementes, resistência a doenças e regulação da água. (WUANA & OKIEMEN, 2011). Estas proteínas estão envolvidas na formação da hemoglobina; no metabolismo de carboidratos, xenobióticos e drogas, além dos mecanismos de antioxidação da célula. O metal é rapidamente absorvido no estômago e no intestino, sua concentração é balanceada no organismo através da atividade de metalotioneínas e chaperonas, que retêm o cobre no citosol mantendo a homeostase (ATSDR, 2004).

Singh e colaboradores (2014), estudaram o impacto de estressores de metal em comunidades microbianas a longo prazo no ambiente e identificaram uma redução da diversidade dos microrganismos e perda de alguns grupos funcionais especializados. Neste contexto é necessário avaliar qual das técnicas disponíveis é mais adequada para a remoção de metais no processo de remediação do ambiente.

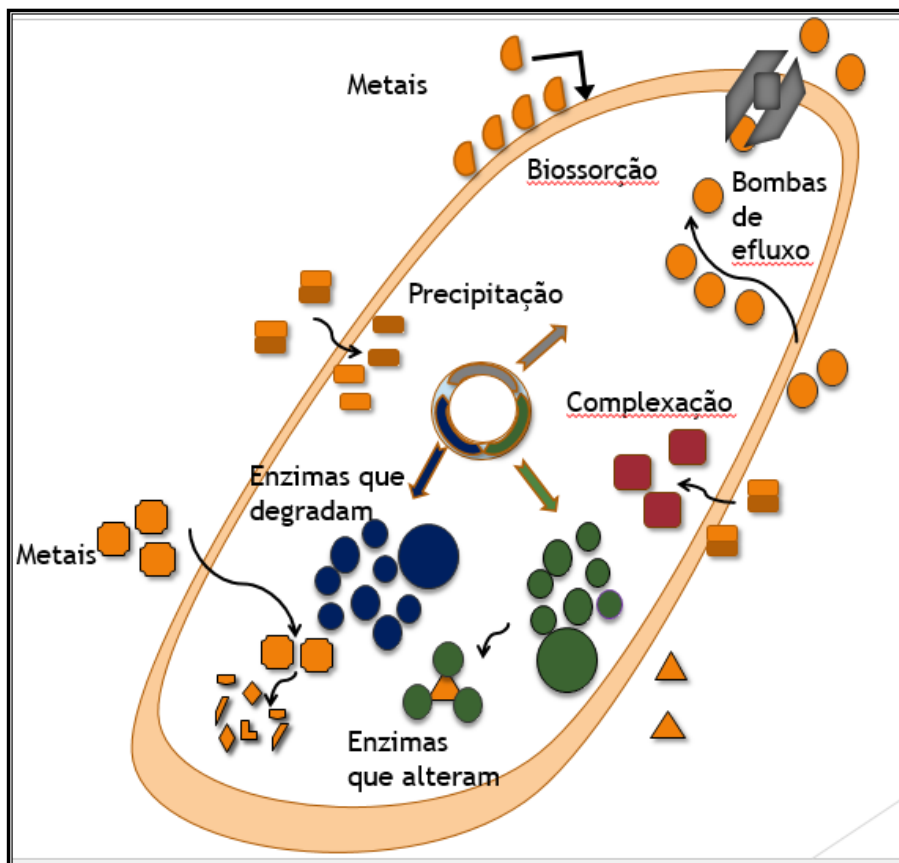
3.2 Técnicas de remoção

As técnicas de remoção de metais tóxicos são de natureza diversa, podendo dividir-se em física, química ou biológica. Dentre as técnicas físicas incluem-se precipitação química (oxidação ou redução), filtração, permuta iônica, osmose reversa, tecnologia de membrana, evaporação e tratamento eletroquímico.

No entanto, a maioria dessas técnicas tornam-se ineficazes em concentrações abaixo de 100 mg/L de metais pesados e devido a solubilidade dos sais de metais pesados dificultarem a separação física (DIXIT et al, 2015). Adicionalmente vários fatores podem influenciar a eficiência das técnicas químicas como o pH, força iônica, concentração iônica, concentração da biomassa e interação entre metais (FOSSATI; BEZANI, 2013).

As estratégias de remoção biológica (Figura 01) podem envolver precipitação do íon metálico (em presença de sulfetos solúveis), complexação (na parede ou em materiais extracelulares), presença de enzimas (redução ou oxidação do metal em compostos menos tóxicos ou sem toxicidade), através da expulsão do metal através de bombas de efluxo (propulsão do metal para fora da célula) e pela biossorção (onde os organismos podem absorver ou adsorver o metal pelo uso de biomassa) (ATSDR, 2004).

Figura 01 – Estratégias de remoção biológica bacteriana



Fonte: própria autora

A biossorção tem a vantagem de não necessitar de suprimentos alimentares para as bactérias, devido aos microrganismos estarem mortos ou inativos, possibilidade de recuperação dos íons metálicos rápida e eficiente. O método também não depende de fatores como pH, temperatura, crescimento microbiano ou revitalização da biomassa como é necessário ao utilizar microrganismos vivos na bioacumulação (ARYAL; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2015).

Outro fator a se avaliar é a viabilidade econômica do processo de remediação dos metais pesados em ambientes contaminados. Técnicas físico-químicas comuns são de alto custo financeiro e em alguns casos inadequadas (MALIK et al, 2004; ABBASI-GARRAVAND; MULLIGAN et al, 2014). Sendo assim, é necessário buscar formas alternativas de remoção desses tóxicos por métodos biológicos. O método mais estudado e utilizado é a biorremediação, onde utiliza a capacidade de metabolização dos metais pesados por microrganismos ativos. O uso de microrganismos para este fim é uma solução viável para a poluição de metais, por ser uma tecnologia sustentável capaz de recuperar a condição natural do solo (ATSDR, 2004; DIXIT et al, 2015)

A eficiência da biorremediação pode ser influenciada por propriedades geológicas do local (material, porosidade, profundidade, relevo), hidrogeológicas (profundidade do aquífero, velocidade da água subterrânea, condutividade elétrica) e químicas (substâncias químicas, nível de contaminação, interação entre espécies e o ambiente) (HASHIM et al, 2011). O processo de biorremediação é complexo, pois além da natureza do meio é influenciado pelo tipo do metal e pelas espécies microbianas que pode variar de acordo com a concentração e disponibilidade dos metais no ambiente (GOBLENZ, 1994).

O processo consiste desde a utilização de microrganismos inatos da área a ser revitalizada até a adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes ou bioaumento com a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos. O benefício desses processos é a transformação metálica em gás carbônico, água e biomassa (BENTO et al, 2003). É importante salientar que cada microrganismo possui propriedades específicas que devem ser avaliadas ao serem envolvidas no processo de remediação.

3.3 Microrganismos e genes de resistência aos metais pesados

Algas, bactérias e fungos além de associações como biofilmes, possuem a capacidade de remover e reter a concentração de metais proporcionando uma base para a criação de novos métodos para redução da poluição inorgânica (SOARES; SOARES, 2012). As propriedades específicas de cada microrganismo podem alterar a especiação dos metais, toxicidade e mobilidade; bem como formação, dissolução ou deterioração mineral. Surge então a aplicação de sistemas biológicos para a limpeza da poluição através da ação de microrganismos com mecanismos que regulam a acumulação de íons de metal para amenizar esse problema ambiental (NARASIMHULU et al, 2010).

Dentre os estudos realizados em bactérias com resistência aos metais pesados, uma das mais estudadas é a estirpe *Cupriavidus metallidurans* CH34, esta espécie foi isolada primeiramente em 1976 de uma fábrica de processamento de metal sendo anteriormente denominada *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia metallidurans* e *Wautersia metallidurans*, (HINNINEN, 2009).

Esta espécie é do gênero *Cupriavidus* constituído por bactérias β -proteobacterias e Gram-negativas, possuindo mais de dez espécies derivadas de diferentes nichos com grande parte tolerantes a metais pesados incluindo o *C. metallidurans* (BYRD et al, 1985; COENYE et al, 1999). É considerada um organismo modelo importante neste campo por suportar concentrações relativamente altas de mais de 20 tipos de metais pesados diferentes (COENYE et al, 2003; JANSSEN et al, 2010).

Janssen e colaboradores (2010), verificaram a prevalência de certos receptores em *Cupriavidus* e outras bactérias relacionadas como uma possível estratégia de adaptação comum a ambientes poluídos. A capacidade do gênero de neutralizar a toxidade de metais se deve aos diversos mecanismos de resistência que possui (MONCHY et al, 2007).

Estratégias diferenciadas são utilizadas pelos microrganismos para obtenção de resistência. Alguns microrganismos sintetizam polímeros extracelulares (EPs) que se ligam aos cátions dos metais tóxicos evitando o contato com componentes sensíveis a estes. Incluem-se neste grupo: *Bacillus firmus*,

Pseudomonas sp., *Cyanobacteria*, *Halomonas sp.* e *Paenibacillus jamilae* (JAROSLAWIECKA; PIOTROWAK-SEGET, 2014).

Outra estratégia utilizada por muitos microrganismos é a troca de DNA pela transferência gênica. Em um estudo pioneiro realizado por Novick e Roth (1968), foi observada a presença de genes que codificam resistência ao zinco, além de outros metais pesados em plasmídeos de *Staphylococcus aureus* entre outras várias espécies documentadas pela transferência de genes envolvidos na resistência a metais pesados.

Outros mecanismos são proteínas regulatórias como a *pbrR* de *C. metallidurans* CH34 que é uma proteína regulatória pertencente a família *MerR* que controla a concentração do zinco e outros metais quando estão em excesso dentro da célula. Os reguladores *ZraS* e *ZraR* são induzidos por altas concentrações de Zn (II) e em *E. coli* estão envolvidos na homeostase do zinco a partir da ativação por fosforilação do *ZraR* pelo *ZraS* (JAROSLAWIECKA; PIOTROWAK-SEGET, 2014).

Posteriormente um trabalho de Wang et al, (2015) demonstrou que a estirpe da bactéria *Cupriavidus giliardii* CR3, apresentou a tolerância a 10 tipos diferentes de metais tóxicos através de autodesintoxicação do efluxo, complexação de metais e redução destes, além de possuir a capacidade de auto-reparo do DNA. Em comparação com o *C. metallidurans* CH34, a *C. giliardii* apresentou alta tolerância a Zn^{2+} , Cr^{3+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} e Ag^{+} .

A *Synechococcus* PCC7942 produz metalotioninas (MT's) que são proteínas responsáveis pela proteção de células contra metais tóxicos e principalmente na homeostase do zinco, estas proteínas são codificadas pelo gene *smt*. Este envolvimento na homeostase foi observado também em *Bacillus cereus*, *Streptomyces sp.*, *Salmonella choleraesius* e *Proteus penneri* (JAROSLAWIECKA; PIOTROWAK-SEGET, 2014).

Outros mecanismos envolvem a biossorção, precipitação, enzimas entre outros como por exemplo, a *Desulfovibrio* spp. complexa o cobre pela produção de sulfato para reduzir sua toxicidade, já a *Klebsiella pneumoniae* tem uma adaptação transitória fisiológica e a *Escherichia coli* tem um aumento de proteínas na membrana, provavelmente relacionado com o transporte metálico. As cianobactérias agem por complexação com metalotianeínas e o *Vibrio alginolyticus* por complexação com proteínas excretadas (ATSDR, 2004).

A tolerância aos metais é alcançada principalmente por efluxo iônico, como também por complexação e redução de metal (JANSSEN et al, 2010). No entanto, os sistemas mais eficazes de resistência a metais tóxicos são denominados bombas de efluxo que são utilizadas pelas bactérias. Como no caso da *E. coli* que utiliza a bomba *zntA* e *Pbr* de *Cupriavidus metallidurans* CH34 (JAROSLAWIECKA; PIOTROWAK-SEGET, 2014). As bombas de efluxo são fundamentais para a fisiologia do organismo, podendo ser encontradas nos três domínios da vida (BLAIR et al, 2014).

Segundo Gillian (2016), os genes presentes no *operon copYZAB* codificam as proteínas *copY*, *copZ*, *copA* e *copB* que atuam juntos para alcançar os níveis de tolerância do cobre na célula. *CopA* e *copB* são duas ATPases da membrana celular que funcionam como bombas de influxo e efluxo respectivamente. *CopY* é um repressor do *operon* e o *copZ* transfere o cobre em excesso para *copB* e *copY*.

Juntos cobre e zinco estão associados a proteína superóxido dismutase com função ligada a enzimas celulares como no citocromo C da cadeia respiratória (WAITE, 2016). Segundo Hynninen et al (2009), em *C. metallidurans* os genes *pbrA* e *pbrB* que estão envolvidos na resistência dos metais, zinco juntamente com chumbo e cádmio, não são específicos e dependentes um do outro.

A proteína CzcR e a proteína CzcD possuem um papel essencial para a indução do *operon czc* que está associado a resistência ao Cd^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} . A CzcD tem identidade com a proteína ZRC-1, que medeia a resistência ao zinco em *Saccharomyces cerevisiae*, os genes *czcA* e o *czcB* codificam proteínas de membrana hidrofóbicas, e CzcC é uma proteína do canal da membrana externa (Nies et al, 1989;1992).

4. CAPÍTULO 1

Neste estudo identificam-se e comparam-se o metagenoma microbiano de amostras coletadas em duas áreas e enfatiza-se o genoma da resistência a metais pesados.

Os resultados obtidos através da pesquisa foram utilizados para a posição de manuscrito devidamente disponibilizado neste capítulo.

No manuscrito, submetido ao periódico *Research in microbiology*, *qualis* B2 da área da biodiversidade encontram-se descritos detalhadamente a metodologia utilizada, bem como os resultados, discussões e as conclusões obtidas.

Metagenômica de genes de resistência a metais pesados da comunidade microbiana no riacho dos Macacos no município do Juazeiro do Norte-CE.

XAVIER, J.C.^{1*}; COSTA, P.E.S.¹; BEZERRA, W. M.²; MELO, V. M. M.²; FALCÃO, R.M.³; BALBINO V.Q.³; OLIVEIRA, V.M.⁴; COUTINHO, H.D.M.¹; VERDE, L.C.L.¹

1. Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil;
2. Microbial Ecology and Biotechnology Lab., Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil
3. Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil
4. Research Center for Chemistry, Biology and Agriculture, Campinas University, Campinas, SP, Brazil.

*Corresponding author Tel.: +5588998006262. E-mail address:jayzecx@gmail.com

RESUMO

Metais pesados são elementos de natureza inorgânica que em certas concentrações podem causar problemas ambientais ao acumularem-se. Apesar de essenciais ao metabolismo da maioria dos organismos, esses metais podem ser tóxicos dependendo da concentração. O acúmulo no ambiente é principalmente devido a ação antrópica de difícil reversão. Neste contexto, bactérias vêm sendo utilizadas para biorremediação do meio ambiente com eficácia. O objetivo deste trabalho foi

mapear a diversidade de genes resistentes a metais no Riacho dos Macacos (área antropizada) comparado a nascente do Rio Grangeiro (ambiente preservado). A amostragem foi realizada com a retirada de 150 g de amostra do solo em triplicata dos referidos ambientes. As amostras foram enviadas ao laboratório para análise físico-química e incubadas para isolamento dos DNA's para posterior sequenciamento do tipo *shotgun*. Os dados foram obtidos pelo MG-RAST e convertidos em gráficos para comparação da diversidade, abundância e distribuição das populações bacterianas. Foram encontrados vários genes ligados a resistência ao cobre como *Cu ATPase*, *multicopper oxidase*, *czc* e ao zinco principalmente a família *czc*. Na análise taxonômica foram encontradas bactérias resistentes aos metais com maior abundância dos filos pertencentes a *Proteobacteria* (49,4%) e *Actinobacteria* (22,97%) e dos gêneros *Nocardioides* (2,99%) e *Pseudomonas* (2,67%) no Riacho dos Macacos. E pertencentes a *Proteobacteria* (58,08%) e *Actinobacteria* (10,80%) e dos gêneros *Pseudomonas* (10,79%) e *Bradyrhizobium* (6,96%) no Rio Grangeiro. Este trabalho é pioneiro na genética microbiana podendo contribuir com a identificação de possíveis bioindicadores de contaminação ambiental.

Key-words: Metagenoma, Resistência bacteriana, tóxicos, degradação.

1 INTRODUÇÃO

Metais pesados fazem parte de um grupo de compostos inorgânicos perigosos sem definição bem estabelecida que podem contaminar gravemente o ambiente principalmente por atividades antrópicas a partir de resíduos de minas, fertilizantes, gasolina, tintas, esgoto, entre outros (Wuana and Okieimen, 2011). Períodos prolongados de deposição de metais elevam sua concentração total e persistência no solo e ambiente, ocasionando sérios danos ao ambiente devido principalmente ao poder recalcitrante e a dificuldade de degradação destes poluentes (Wuana and Okieimen, 2011; Grupta and Diwan, 2017).

Metais como cobre, zinco, ferro, manganês, e cobalto são nutrientes essenciais de procaríotos e eucariotos em baixas concentrações, pois, estão envolvidos em diversos processos biológicos importantes para o metabolismo celular. Em contrapartida, quando em altas concentrações, eles podem alterar consideravelmente o crescimento, a morfologia e o metabolismo celular, contribuindo assim para a diminuição da diversidade biológica ambiental (Zampieri et al, 2016).

O cobre é importante em inúmeros processos fisiológicos em plantas como metabolismo da parede celular, produção de sementes, fotossíntese, respiração e distribuição de carboidratos, resistência a doenças e regulação da água. Normalmente pode provocar sérios problemas no solo em concentrações elevadas, tanto para a biodiversidade como na fertilidade do solo. Contudo, não é bioacumulado na cadeia alimentar e juntamente com o zinco são essencialmente importantes para plantas, microrganismos, animais e seres humanos podendo ambos representar ameaças diretas e indiretas (Wuana and Okieimen, 2011). O zinco faz parte de enzimas, está envolvido no metabolismo de carboidratos, proteínas, fosfatos e RNA, no entanto, sua concentração elevada pode acidificar cursos d'águas e contaminar lençóis freáticos podendo acumular-se em alguns peixes, biomagnificar a cadeia alimentar e interferir na atividade dos solos (Sharma, 2012).

Ao serem arrastados para os corpos de água, os metais poluem os rios e riachos ao longo das cidades, ocasionado pelo despejo de esgotos domésticos e atividades industriais. Este fato é preocupante principalmente pela população residente nas redondezas exposta a um ambiente carregado de resíduos metálicos

tóxicos (Zampieri et al, 2016). Os metais concentram-se em ambiente terrestre e aquático, causando preocupação devido à dificuldade de degradação, para remover o excesso de metais do ambiente através das estratégias desenvolvidas por microrganismos com diferentes tipos de adaptações que os tornam resistentes e capazes de minimizar ou inativar vários contaminantes. Essa tecnologia, denominada biorremediação, utiliza o próprio metabolismo do microrganismo para remover poluentes sem agredir o meio ambiente ou, de forma estimulada, através da adição de nutrientes ou microrganismos específicos ao meio para melhorar a eficiência do processo (Sharma, 2012).

Os metais ao entrarem na célula, dependendo da concentração e das propriedades químicas, podem interagir de várias formas. A célula reage geralmente a altas concentrações pela expressão de sistemas específicos de resistência (Roosa et al, 2014). Neste contexto, várias bactérias evoluíram geneticamente em processo adaptativo adquirindo resistência metálica. Muitos genes como *cadB*, *chrA*, *pbrA*, *MerA* e *NiCoT* foram relatados em sistemas bacterianos de resistência e desintoxicação respectivamente para cádmio, cromo, chumbo, mercúrio e níquel assim como envolvimento no transporte de metais de transição (Das et al, 2016; Janssen, 2010). Esses sistemas desencadeiam respostas biológicas ao contaminante, principalmente por: biossorção nas paredes celulares, aprisionamento em cápsulas extracelulares, precipitação, complexação, oxidação-redução e transporte pela membrana celular (bombas de efluxo) (Sharma, 2012).

Para um estudo mais amplo é necessário o uso da metagenômica que proporciona uma visualização mais completa dos organismos a partir da caracterização da composição da comunidade e seu conteúdo funcional (Keegan et al, 2016). O sequenciamento metagenômico apesar de ser relativamente novo e complicado devido à estrutura complexa dos dados, tem sido importante em pesquisas promissoras identificando a presença de microrganismos resistentes.

Este trabalho tem como objetivo mapear geneticamente a comunidade microbiana presente nas margens do Riacho dos Macacos, contaminado principalmente com cobre e zinco para detectar e avaliar genes resistentes a metais a partir da análise do sequenciamento comparando entre as referidas amostras e as encontradas nas margens do Rio Granjeiro utilizadas como local de referência por tratar-se de área não antropizada.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras

A amostragem foi realizada na margem do riacho dos Macacos no município de Juazeiro do Norte (CE) (-7.212977, -39.303883 MG-RAST ID mgm4765761.3) devido à proximidade com indústrias de fabricação de joias folheadas, de artefatos de alumínio e de curtimento de couros, que trabalham com produtos corrosivos, inflamáveis e tóxicos. E como local de referência as margens do Rio Granjeiro localizado no município de Crato-CE (-7.164863, -39.261734 MG-RAST ID mgm4765758.3) distante da ação humana em local reservado onde a água é menos propícia a contaminação excessiva de metais. Foram retirados aproximadamente 150 g a uma distância de um metro da margem do Riacho dos Macacos com 5 cm de profundidade. A amostragem foi realizada em triplicata com um metro de distância de cada amostra utilizando canos PVC com 10 cm de diâmetro e previamente esterilizados por autoclave. Após a coleta, as amostras foram levadas até o laboratório de Microbiologia da URCA e incubadas a 4 °C para o isolamento do DNA da comunidade microbiana.

2.2 Análise de Metais do solo

Para quantificação dos metais pesados cobre e zinco, foram coletadas, em triplicata, aproximadamente 150 g de solo nas camadas superficiais, no perfil de 0 a 20 cm, de áreas adjacentes ao Riacho dos Macacos e ao Rio Granjeiro com o auxílio de uma ferramenta não metálica, a fim de evitar contaminação por metais presentes nas ferramentas normalmente utilizadas em revolvimento de solos. A camada de até 20 cm de profundidade foi escolhida em razão desta profundidade conter os maiores teores de elementos químicos e matéria orgânica, bem como a reação entre eles, conforme ressaltam **Aguiar; Marins; Almeida, (2007)**. Ainda no campo, as amostras foram acondicionadas adequadamente e enviadas para o Laboratório de Saneamento da Universidade Federal do Cariri (UFCA).

Em laboratório, as amostras foram secas à temperatura ambiente e, em seguida, destorroadas, trituradas em gral até pó fino e passadas em peneiras para obtenção da fração mais fina (< 0,074 mm) utilizada para a análise química.

A metodologia utilizada para a determinação dos metais pesados foi a digestão em microondas com ácido nítrico concentrado e leitura em espectrofotômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (*Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy – ICP/OES*), método 3051-16, recomendado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (U.S. EPA, 1994).

2.3 Extração do DNA total

O DNA foi extraído da amostragem realizada em triplicata nas duas áreas de estudo adjacentes ao Rio Grangeiro e ao Riacho dos Macacos, quantificados (Tabela 2) e enviados para a Universidade Federal do Ceará onde foi realizado o sequenciamento pela plataforma Illumina *MiSeq* e o tipo gerada de biblioteca foi o de genes funcionais.

As extrações de DNA total das comunidades microbianas das amostras de solo das margens do Riacho dos Macacos e do Rio Grangeiro foram realizadas utilizando o kit de extração de DNA de solo *Power Soil™ DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA), seguindo-se as instruções do fabricante. A concentração e pureza do DNA extraído foram determinados por espectrofotometria (NanoDrop-1000, Thermo Scientific, Willmington, DE, USA)

2.4 Sequenciamento do DNA

A integridade e concentração do DNA obtido das amostras foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com *SYBR® Safe DNA gel stain* (Invitrogen) e o sequenciamento da biblioteca do tipo *shotgun* utilizando a plataforma Illumina *MiSeq* (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA) do DNA total extraído das comunidades foram realizados no Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBiotech) do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC) em parceria e sob a supervisão da Prof^a. D^{ra}. Vânia Maria Maciel Melo. O

DNA foi preparado utilizando o kit *Nextera XT DNA Library Preparation Kit* (24 Samples) (Illumina) e sequenciado utilizando o kit *MiSeq Reagent Kit v2* (600 cycles) (Illumina).

2.5 Análise de Bioinformática

O processo de controle de qualidade foi realizado pelo software FastQC [38]. Todas as bibliotecas tiveram suas bases removidas de acordo com o Trimmomatic (v0.36) [39] de forma a se obter sequências de alta qualidade. As amostras RMA, RMC, RGA, RGB e RGC tiveram como parâmetros LEADING:3 TRAILING:6 SLIDINGWINDOW:4:20 e reads de tamanho menor do que 35bp foram descartados. Para a amostra RMB os mesmos parâmetros foram utilizados, exceto que o tamanho mínimo das reads foi de 75bp. Para construir o metagenoma da comunidade microbiana do solo, metaSPAdes (v3.10.1) [40] foi utilizado em cada amostra para montar as reads em contigs. As bibliotecas RMA, RMC, RGA, RGB e RGC o seguinte conjunto de k-mers foi utilizado : 21, 23, 27 e 33. Valores 65 e 73 de k-mer foram utilizados para montagem da amostra RMB. A escolha dos valores de k-mer seguiram o seguinte critério: não ultrapassar o tamanho da menor read de uma dada amostra. Afim de melhorar a montagem, para gerar scaffolds e preencher gaps, Assembly Improvement (v1.7.0) [41] foi utilizado, tendo como entrada a montagem obtida no estágio anterior com suas respectivas reads trimadas. Após essa etapa, foi utilizado a ferramenta Redundans (v0.12c) [42] para tornar a montagem final menos fragmentada e sem redundâncias de scaffolds.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de contaminação encontrados em ambos os ambientes nas amostras do solo foram nas concentrações 176,4 mg/Kg para Cu^{2+} e 297,3 para Zn^{2+} no Riacho dos Macacos e de 7,3 mg/Kg e 18,5 mg/Kg no Rio Granjeiro para Cu^{2+} e Zn^{2+} respectivamente. Os níveis dos metais em estudo foram relativamente altos comparados com os valores máximos permitidos pela Comunidade Econômica Europeia que são respectivamente de 150 mg/Kg para Cu^{2+} e 140 mg/Kg para Zn^{2+} (Chaudri et al, 1993) e os níveis toleráveis para solos agricultáveis da Polônia são de

300 mg/Kg Zn^{2+} ficando, portanto, no limite de aceitação. Os valores aqui encontrados são menores que os relatados por Levy et al (1992) em Cu^{2+} onde as concentrações variaram de 14 a 1200 mg/Kg e em Zn^{2+} variaram de 44 a 12000 mg/Kg e Chlopecka et al (1996) onde a concentração de Zn^{2+} variou de 13.9 a 2800 mg/Kg, ao avaliarem áreas contaminadas por metais pesados oriundos de mineração e atividades industriais.

Os padrões brasileiros segundo Fadigas e colaboradores (2006) tomando como base as características do solo como Silte, argila, Mn, Fe CTC (capacidade de trocar cations) também confirmam que dos 7 grupos analisados em seu trabalho os valores de cobre e zinco foram inferiores a este estudo. Mesmo considerando o grupo que tolera níveis mais altos de cobre (119 mg/Kg) e zinco (79 mg/Kg) confirmando a alta contaminação por estes metais. Portanto, os resultados do presente estudo indicam um grau de contaminação considerável nas adjacências do Riacho dos Macacos.

3.1 Perfil filogenético do metagenoma

Um total de 100.894 *reads* no RM e 103.509 no RG foram apresentadas, pelo programa MG-RAST, baseadas no banco de dados SEED que indicou alta diversidade bacteriana em apenas 10 g de solo. A metagenômica vem sendo usada para diferentes funções e em vários lugares possui diversos programas que fazem a análise além do MG-RAST como MEGAN (Mitra et al, 2012), PHYLOSHOP (Shah et al, 2011) ou TAX4FON (Aßhauer et al, 2015) com funções variadas como por exemplo, microbiota intestinal (Korem, 2015) ou digestão anaeróbica termofílica em tratamento de água (Wu, 2018).

A análise das sequências de genes funcionais do metagenoma norteadas por todas as bases de dados de anotação disponíveis no MG-RAST revelou que o domínio *Bacteria* foi dominante em ambas as amostras de solo das áreas adjacentes ao Riacho dos Macacos e ao Rio Granjeiro representando 97,97% e 96,5% das sequências, respectivamente. *Eukarya* representou 0,44% e 0,45%, *Archaea* 1,62% e 2,97%, vírus 0,03% e 0,06% e outras sequências 0,005% e 0,007% da abundância do DNA total das amostras do solo próximo ao Riacho dos Macacos e ao Rio Granjeiro, respectivamente. Dos 22 filos bacterianos presentes (Figura 01), os mais abundantes nas proximidades do Riacho dos Macacos foram o *Proteobacteria* com

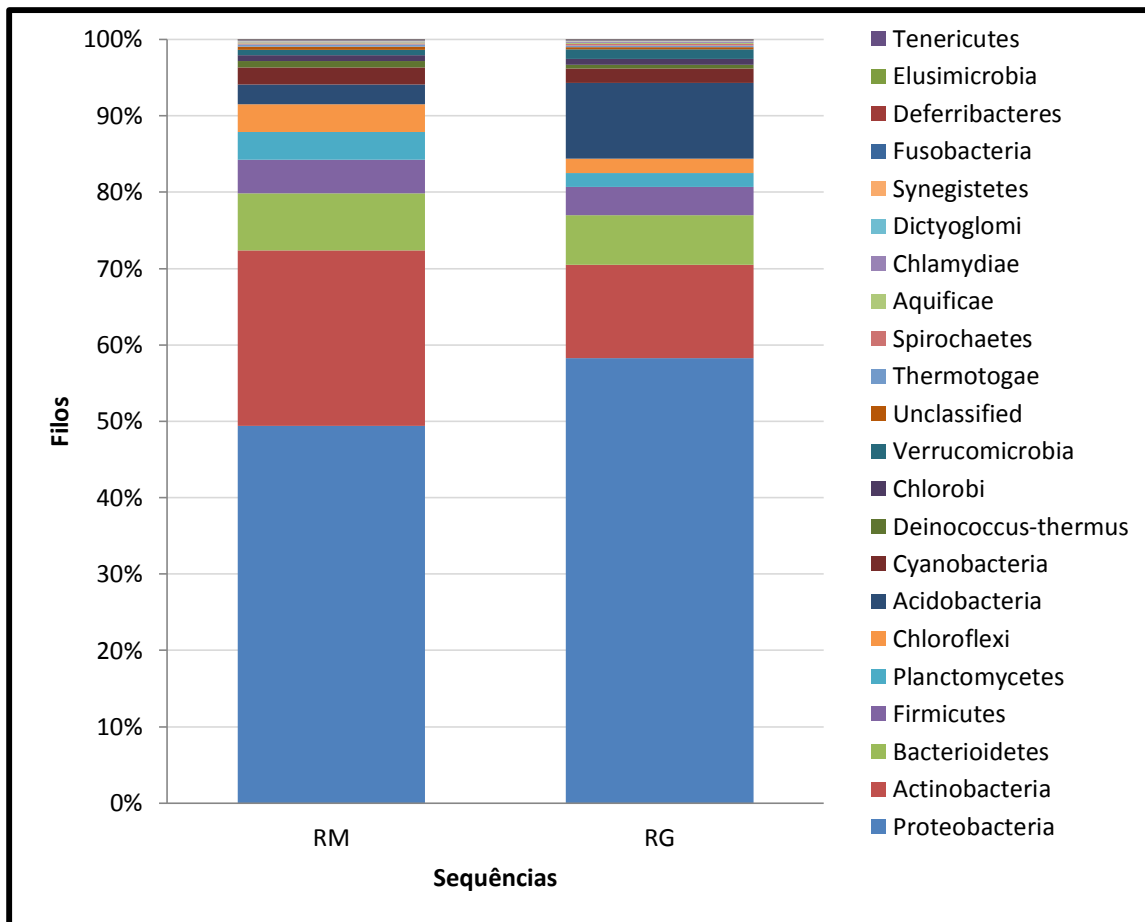
49,40% das sequências corroborando com Chen (2017) que encontrou dominância deste filo pesquisando contaminação por cádmio. Outros estudos também mostraram o mesmo filo em comunidades de ambientes ricos em metais mais abundantes que outros filios (Reis et al, 2016; Chen et al, 2017).

As *Proteobacterias* são Gram-negativas e foram elevadas ao filo e divididas em cinco classes, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria* (Bonner and Castenholz, 2013) sendo o maior e mais diversificado grupo bacteriano com grande diversidade morfológica e metabólica e por isso ocorre em vários ambientes diferentes (Pereira et al, 2006). O segundo filo mais numeroso foi o *Actinobacteria* com 22,97%.

A dominância desses dois filios, correspondem aproximadamente às encontradas em outros estudos (Singleton et al, 2009; Uhlik et al, 2017). Mesmo a pesquisa sendo diferenciada e em locais distintos, sugere-se que uma variedade de solos contaminados contém os mesmos grupos bacterianos dominantes considerando que conseguem suportar ambientes com condições extremas e as Actinobacterias serem onipresentes. O filo compreende 5 classes, 19 ordens, 50 famílias e 221 gêneros, no entanto novos táxons continuam sendo descobertos. São geralmente bactérias Gram-positivas com fenótipos e morfologias distintas (Bonner and Castenholz, 2013).

Paralelamente foi utilizado como local de referência as margens do Rio Granjeiro e nas análises obtidas também indicaram dominâncias nos filios *Proteobacteria* (58,08%) e *Actinobacteria* (10,80%) (Figura 01).

Figura 01- Classificação filogenética dos *reads* obtidos do sequenciamento do metagenoma das amostras das margens do Riacho dos Macacos (RM) e das margens do Rio Granjeiro (RG). Resultados para filios obtidos pelo MG-RAST utilizando o banco de dados SEED (Leitura segue de baixo para cima).



Esta abundância tanto em ambiente urbanizado como no não-urbanizado também foi obtido por um trabalho similar realizado por Medeiros e colaboradores (2016) como era esperado, devido as *Proteobacterias* serem bem conhecidas por possuir sucesso de sobrevivência em ambientes diversos em relação aos outros grupos microbianos do planeta.

No entanto, as co-dominâncias diferiram nos dois ambientes. No urbanizado obtiveram o maior número de sequencias *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* respectivamente (pertencentes a microbiota gastrintestinal de humanos e outros animais), a falta de saneamento em volta do riacho pode ser a causa da presença desses microrganismos nas adjacências do Riacho dos macacos,

coincidindo com o trabalho de Medeiros e colaboradores (2016) que também encontrou esses três filos entre os mais abundantes depois das *Proteobacterias*.

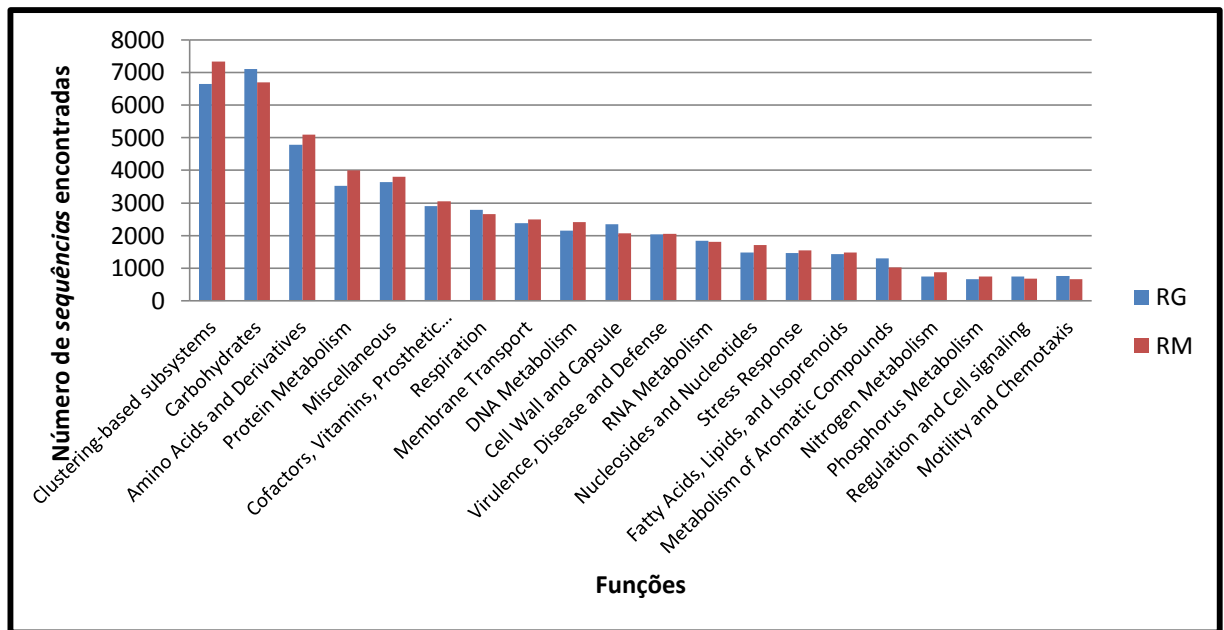
O ambiente não urbanizado (margens do Rio Granjeiro) revelou vários gêneros também encontrados nos estudos de Medeiros e colaboradores (2016), *Bradyrhizobium*, *Candidatus Solibacter*, *Rhodopseudomonas*, *Geobacter*, *Magnetospirillum*. Confirmado em estudos usando diferentes métodos *Bacterioides* são anaeróbicos e sua presença pode, portanto, indicar contaminação recente (Wexler, 2007). Os gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*, também encontrados neste estudo, são geralmente encontrados em diversos nichos e podem causar doenças severas em humanos gerando impactos na saúde humana (McConnell et al, 2013; Valério et al, 2010)

3.2 Categorias funcionais

A análise das categorias funcionais permite avaliar o desempenho e atividade metabólica dos organismos presentes nos ambientes identificando em quais delas estão sendo direcionadas mais energias (Figura 02).

Foram encontradas 28 categorias funcionais diferentes com relações como regulação, metabolismo e transporte refletindo a alta diversidade e atividade microbiana em ambos os ambientes. As categorias com maior atividade foram as de carboidrato; metabolismo de proteína, aminoácidos e derivados; metabolismo de proteína; *micellaneus*, cofatores/vitaminas e respiração nos dois ambientes estudados. Os genes correspondentes a resposta a virulência, doença e defesa não foram consideravelmente alterados passando de 3,73% do RM para 3,68% do RG e resposta ao estresse crescendo de 2,81% no RM para 2,65% do RG. Esses dados sugerem que as bactérias primeiramente ativam genes de sobrevivência para posteriormente ativar os de adaptação as adversidades em busca da sobrevivência do meio inclusive em ambientes mais poluídos.

Figura 02 – Abundância das funções apresentadas na análise metagenômica das margens do Riacho dos Macacos (RM) e das margens do Rio Granjeiro (RG)

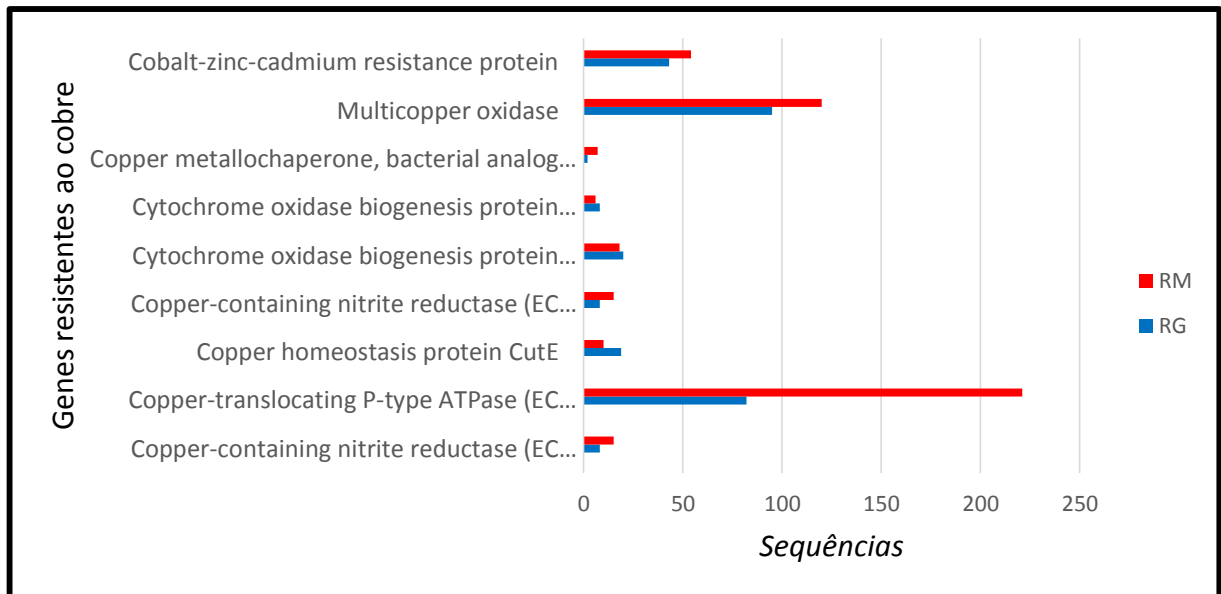


3.3 Genes de resistência ao cobre

Foram encontrados (Figura 03), o *P-tipo ATPase* (CopA) que refere-se a bombas de efluxo e influxo predominantemente de cátions incluindo o Cobre (Fagan and Saier, 1994) e *multicopperoxidase* responsável pela bomba de efluxo (Lu et al, 2017).

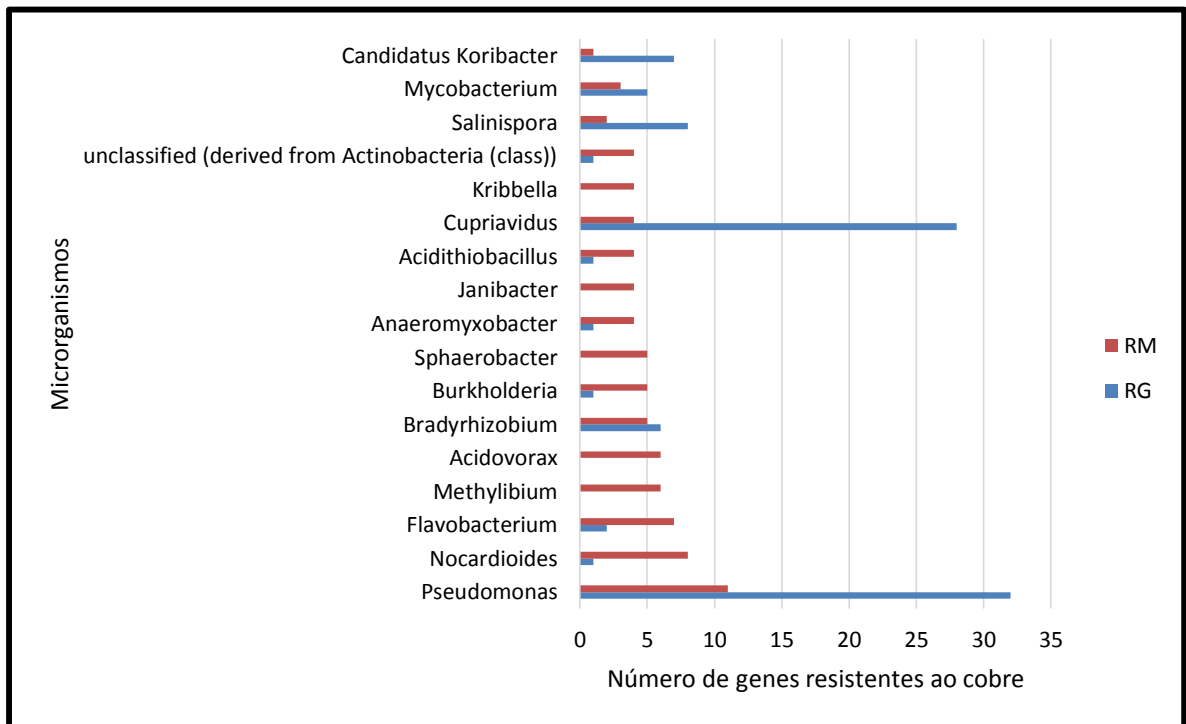
Em *Escherichia coli* o *Cu(I)-translocating P-type ATPases* também denominado *copA*, foi relatado em trabalhos anteriores pela homeostase ao cobre (Petersen and Moller, 2000) e resistência ou transporte de cobre (Fan et al, 2001).

Figura 03 – Genes de resistência ao cobre encontrados nas margens do Riacho dos Macacos (RM) e nas margens do Rio Granjeiro (RG)



O cobre curiosamente, possui maior frequência de genes nas margens do Riacho dos Macacos em relação ao Rio Granjeiro mostrando a sua contaminação por um processo seletivo eficiente apesar de aparecerem também, no entanto, em menor quantidade na maioria das vezes nas margens do Rio Granjeiro. Foi feita também uma análise comparativa dos genes resistentes em maior quantidade e correlacionados aos gêneros encontrados relativos ao cobre (Figura 04) e relativos ao zinco (Figura 06).

Figura 04 – Comparação de genes resistentes mais abundantes encontrados nos gêneros. Número de genes resistentes ao Cobre



Como podemos observar na figura, os gêneros *Kribbella*, *Janibacter*, *Sphaerobacter*, *Acidovorax* e *Methylibium* são possíveis candidatos a bioindicadores de contaminação devido aparecerem apenas no ambiente antropizado.

Outros também que estão bastante adaptados ao ambiente antropizado são *Burkholderia*, *Acidithiobacillus*, *Anaeromyxobacter*, *Flavobacterium* e *Nocardioides* e aparecem bem restritos no ambiente não antropizado.

Corroborando com este trabalho foram encontrados também genes de resistência a cobre para *Pseudomonas*, *Nocardioides*, *Methylbium* e *Borkholderia* (Gillian, 2015; Thomas et al, 2009), *Flavobacterium* (Kou et al, 2018), *Anaeromyxobacter* porém em pequenas quantidades (Thomas et al, 2009). Curiosamente o gênero *Cupriavidus*, reconhecidamente resistente a altas concentrações de metais, foi encontrado no Rio Granjeiro em maiores concentrações, resultado similar foi encontrado por (Janssen, 2010), este fato pode ter sido devido a fatores limitantes do local que possam ter influenciado seu crescimento.

3.5 Genes de resistência ao zinco

O zinco é o metal mais utilizado apesar de não ser o mais disponível na crosta terrestre e devido a suas funções estruturais, catalítica e de sinalização é um fator limitante de sobrevivência bacteriana tanto na falta como no excesso (Cunden and Nolan 2018)

Os mecanismos homeostáticos de entrada, distribuição e excreção do zinco são mais eficientes que a maioria dos metais, e por ser necessário para o sistema de transcrição bacteriana toda bactéria necessita de zinco (Vallee and Falchuk, 1993) por isso quanto maior a diversidade mais genes de zinco serão encontrados no local o que justifica a maior abundância de genes relativos ao zinco nas margens do Rio Granjeiro em relação as margens do Riacho dos Macacos reportados na figura 05.

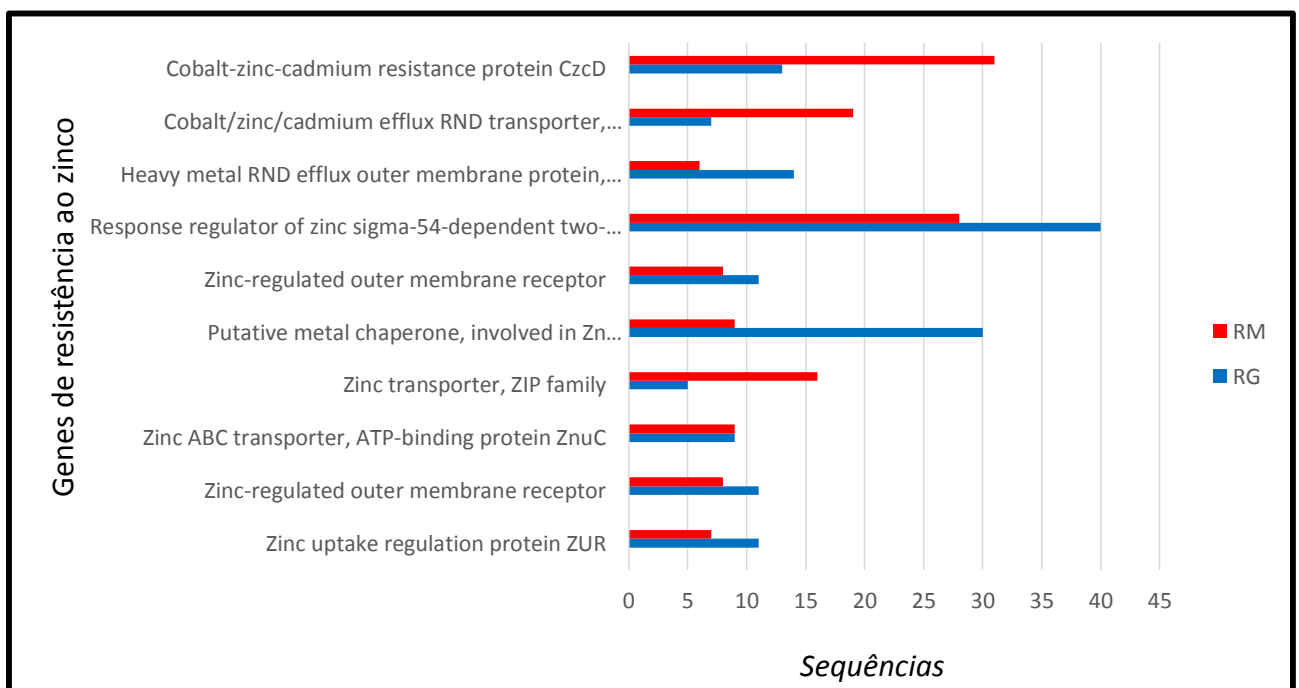


Figura 05 – Genes de resistência ao zinco encontrados nas margens do Riacho dos Macacos (RM) e do Rio Granjeiro (RG)

Os genes mais abundantes na resistência ao zinco foram respectivamente *czcD*, importante bomba de efluxo cádmio-cobalto-zinco (Nies, 2003), *czcB* e *ZIP* e o regulador de zinco sigma-54 dependente, que se tratam de sistemas de efluxo.

Os sistemas de efluxo incluem o transenvelope dirigido pela divisão de nodulação por resistência (RND), facilitadores (CDF) e ATPases do tipo P (Legatzki, 2003). Entre estes sistemas de efluxo, as ATPases do tipo P constituem uma grande família de proteínas, algumas foram sugeridas como sendo envolvidas na homeostase do metal em microrganismos (Lutsenko, 1995). Em bactérias Gram-negativas possuem função principalmente no controle da concentração e toxicidade do metal, característica esta que possivelmente possibilita maior flexibilidade de exploração ambiental e patogenicidade.

As bactérias Gram-positivas estão entre os três grupos com baixa frequência de proteínas RND. *CzcA* sozinho medeia pouca resistência, portanto, o mecanismo de ação das proteínas RND em Gram-positivas por funcionar como sistemas de efluxo de subunidade única podem ser diferentes da maioria das bactérias Gram-negativas (Nies, 2003).

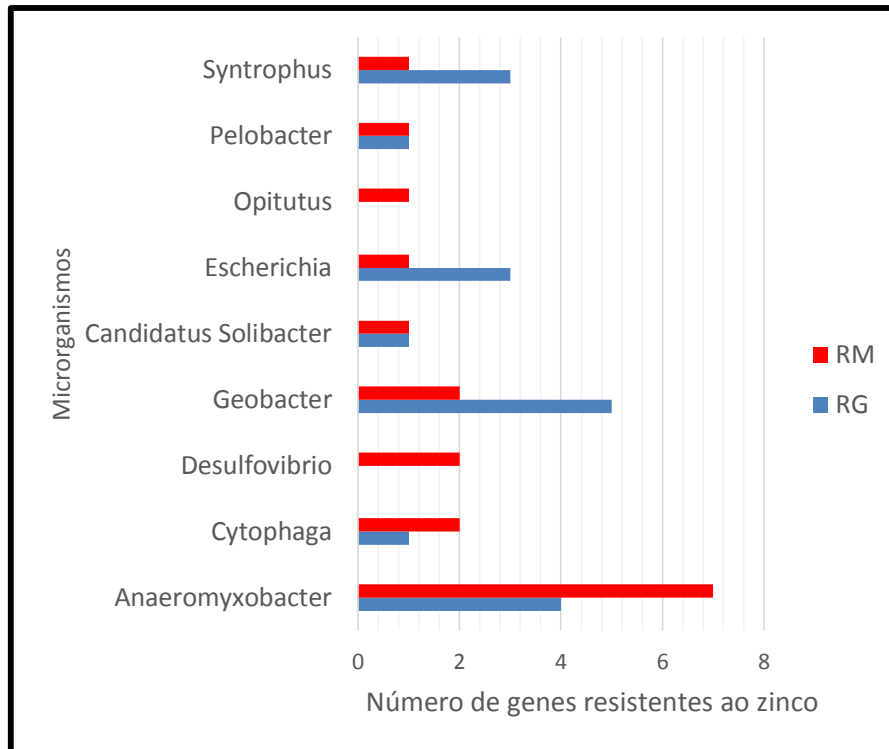
Bombas de efluxo foram amplamente estudados em *Cupriavidus metallidurans*, como produtos de genes não específicos *czcCBA* e o sistema análogo *cusCBA*, sendo que o primeiro funciona na desintoxicação de cádmio, zinco e cobalto e o segundo funciona em desintoxicação de cátions monovalentes, como prata e cobre (Hernandez-Arriaga et al, 2009). *Cupriavidus metallidurans* CH34 possuiu várias outras denominações anteriores e é também uma das estirpes mais estudadas (Hynninen et al, 2009). Apesar do conhecimento ser restrito em torno da comunidade de bactérias resistentes a esses tipos de metais, esta espécie é considerada um organismo modelo nesta área (Janssen, 2010; Monchy et al, 2007).

A *Czc* é uma bomba de efluxo quimiosmótica para Cd^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} , basicamente proteínas da membrana interna (*CzcA*), da membrana externa (*CzcC*) e membrana (*CzcB*) que estão todas envolvidas no transporte de cátions do citoplasma via periplasma para fora da célula (Silver and Phung, 1996).

Já o sistema sigma dependente de zinco trata-se de uma proteína que se liga através da especificidade e auxilia na expressão da RNA polimerase, faz parte do mecanismo de transcrição dos genes bacterianos, metabolismo de ácidos

nucléicos, carboidratos, lipídios e outros processos biológicos fundamentais (Vallee and Falchuk, 1993).

Figura 06 - Comparação de genes resistentes mais abundantes encontrados nos gêneros. Número de genes resistente ao Zinco



Como podemos observar na figura acima, os gêneros *Desulfovibrio* e *Opiritutus* são também possíveis candidatos a bioindicadores de contaminação devido aparecerem apenas no ambiente antropizado. *Anaeromyxobacter* também em relação ao zinco apresentou-se mais bem adaptado no ambiente antropizado em relação ao não-antropizado.

Os genes resistentes relativos ao zinco foram encontrados em maior quantidade em *Geobacter*, *Syntropus* e *Escherichia* e maiores em relação as margens do Rio Granjeiro. Provavelmente devido a particularidade do zinco de ser co-fator de várias enzimas que fazem parte do metabolismo da expressão gênica. Portanto, a falta de zinco compromete todo o sistema de transcrição da bactéria, por isso a expressão de genes relacionados ao zinco ser maior aonde a diversidade é

maior. Resultados equivalentes em *Geobacter*, porém relacionados ao cobre, foram demonstrados no trabalho de metatranscriptoma realizado por (Kou et al, 2018).

4 CONCLUSÃO

Os dados metagenômicos revelaram que os genes envolvidos na resistência aos metais possuem relações diferenciadas como regulação, transporte, metabolismo, resistência a metais entre outros refletindo a abundância metabólica da comunidade em busca da sobrevivência.

Os filos mais abundantes foram *Proteobacteria* e *Actinobacteria* conhecidamente resistentes a ambientes variados por sua diversidade metabólica em ambos os ambientes e os gêneros *Nocardioides* e *Pseudomonas* mais abundantes, nesta ordem, nas margens do Riacho dos Macacos. Já nas margens de referência, Rio Granjeiro, os gêneros mais abundantes foram *Pseudomonas* e *Bradyrhizobium*. Os gêneros *Anaeromixobacter* e *Geobacter* foram os mais abundantes com genes de resistência ao zinco e *Pseudomonas* e *Nocardioides* com maior abundancia de genes de resistência para cobre. Os genes mais abundantes foram da família *czcD*, envolvido na resistência ao zinco e *P-type ATPase* ou *CopA* eficiente para cobre. A análise metagenômica foi eficiente permitindo a partir das informações apresentadas servir como base para estudos adicionais sobre os efeitos do metal em comunidades microbianas e avaliar possíveis bactérias indicadoras no processo de biorremediação. Sendo necessários trabalhos futuros com metatranscriptoma para complementar o estudo devido a complexidade dos resultados e das variáveis do estudo como genes, organismos, características do solo entre outras.

5 BIBLIOGRAFIA

Andrews, S. FastQC A Quality Control tool for High Throughput SequenceData (2014)

- Aßhauer KP, Wemheuer B, Daniel R, Meinicke P (2015) Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*. 1;31(17):2882-2884.
- Bert L. Vallee and Kenneth H. Falchuk (1993) The Biochemical Basis of Zinc Physiology. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS* Vol. 73, No. 1, Printed in S.A.
- Bolger, A. M. and Lohse, M. and Usadel, B. (2014). Trimmomatic - a flexible trimmer for Illumina sequence data. In *Bioinformatics*, 30 (15), pp. 2114-2120.
- Booner D R, Castenholz RW (2013); *Bergey's manual de sistematic bacteriology*. Editores. Volume 1 Garrity, G.M. editor in chief - 2ª. edição.
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*. 45(3):198-207.
- Chaudri AM, McGrath SP, Giller KE, Rietz E, Sauerbeck DR (1993) Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soil previously treated with metal-contaminated sewage sludge. *Soil Biol. Biochem*. 25:301-309.
- Chen Z, Zheng Y, Ding C, Ren X, Yuan J, Sun F, Li Y (2017) Integrated metagenomics and molecular ecological network analysis of bacterial community composition during the phytoremediation of cadmium-contaminated soils by bioenergy crops. *Ecotoxicol Environ Saf*. ;145:111-118.
- Chlopecka A, Bacon JR, Wilson MJ, Kay J (1996). Assessment of form of Cd, Zn and Pb in contaminated calcareous and gleyed soils in Southwest Poland. *Science of The Total Environment*. 188(2-3): 253-262.
- Chun-yu Jiang, Xia-fang Sheng, Meng Qian, Qing-ya Wang (2008) Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere* Volume 72, Issue 2, Pages 157-164
- Das S, Dash HR, Chakraborty J (2016) Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100(7):2967-84.
- Fagan MJ and Saier MH Jr. (1994). *P-type ATPases* of eukaryotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J Mol Evol*. 38(1):57-99.
- Fan B, Grass G, Rensing C, Rosen BP (2001) *Escherichia coli* CopA N-terminal Cys(X)(2)Cys motifs are not required for copper resistance or transport. *Biochem Bio-phys Res Commun* 286: 414-418.
- Gillian DC, Roosa S, Kunath B, Billon G, Wattiez R (2015). The long-term adaptation of bacterial communities in metal-contaminated sediments: a metaproteogenomic study. *Environmental microbiology* 17:1991-2005.

- Gupta P and Diwan B (2017). Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports* 13: 58–71.
- Hernández-Arriaga A M, Rubio-Lepe T S, Espinosa M, Solar G (2009). Repressor *CopG* prevents access of RNA polymerase to promoter and actively dissociates open complexes. *Nucleic Acids Research*. 37(14):4799–4811.
- Hynninen A, Touzé T, Pitkänen L, Mengin-Lecreulx D, Virta M (2009) An efflux transporter *PbrA* and a phosphatase *PbrB* cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria. *Mol Microbiol*. 74(2): 384–394.
- Janssen PJ et al (2010). The Complete Genome Sequence of *Cupriavidus metallidurans* Strain CH34, a Master Survivalist in Harsh and Anthropogenic Environments. *Plos One*. 5(5): e10433.
- Ji B, Qin H, Guo S, Chen W, Zhang X, Liang J (2018) Bacterial communities of four adjacent fresh lakes at different trophic status. *Ecotoxicol Environ Saf*. Aug 15;157:388-394.
- Keegan KP, Glass EM, Meyer F (2016). MG-RAST, a Metagenomics Service for Analysis of Microbial Community Structure and Function. *Methods Mol Biol*. 1399:207-233.
- Korem T, Zeevi D, Suez J, Weinberger A, Avnit-Sagi T, Pompan-Lotan M, Matot E, Jona G, Harmelin A, Cohen N, Sirota-Madi A, Thaiss CA, Pevsner-Fischer M, Sorek R, Xavier RJ, Elinav E, Segal E (2015). Growth dynamics of gut microbiota in health and disease inferred from single metagenomic sample *Science*.349 (6252): 1101-1106.
- Kou S, Vincent G, Gonzalez E, Pitre FE, Labrecque M, Brereton NJB (2018)The Response of a 16S Ribosomal RNA Gene Fragment Amplified Community to Lead, Zinc, and Copper Pollution in a Shanghai Field Trial. *Front Microbiol*. 1;9:366.
- Legatzki A, Grass G, Anton A, Rensing C, Nies DH (2003) Interplay of the Czc System and Two P-Type ATPases in Conferring Metal Resistance to *Ralstonia metallidurans*. *Journal of bacteriology*. 185 (15): 4354-4361.
- Leszek P. Pryszcz and Toni Gabaldón (2016) Redundans: an assembly pipeline for highly heterozygous genomes. *NAR*. doi: 10.1093/nar/gkw294
- Levy DB, Barbarick KA, Siemer EG and Sommers LE (1992). Distribution and Partitioning of Trace Metals in Contaminated Soils near Leadville, Colorado. *Journal of Environmental Quality Abstract*. 21(2): 185-195.
- Lisa S. Cunden and Elizabeth M. Nolan 2018, Bioinorganic Explorations of Zn (II) Sequestration by Human S100 Host-Defense Proteins. *Biochemistry* 57, 1673–1680
- Lu M, Jiao S, Gao E, Song X, Li Z, Hao X, Rensing C, Wei G (2017) Transcriptome Response to Heavy Metals in *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020 Reveals New Metal Resistance Determinants That Also Promote Bioremediation by *Medicago lupulina* in Metal-Contaminated Soil. *Appl Environ Microbiol*. 29;83(20): e01244-17.

- Lutsenko S and Kaplan JH (1995). Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry*, 34: 15607–15613.
- McConnell MJ, Actis L, Pachón J (2013). *Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbial Rev.* 37:130-155.
- Medeiros JD, Cantão ME, Cesar DE, Nicolas MF, Diniz CG, Silva VL, Vasconcelos ATR, Coelho CM (2016). Comparative metagenome of a stream impacted by the urbanization phenomenon. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47: 835-845.
- Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, Paczian T, Rodriguez A, Stevens R, Wilke A, Wilkening J, Edwards RA (2008). The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 9:386.
- Mitra S, Stärk M, Huson DH (2011) Analysis of 16S rRNA environmental sequences using MEGAN. *BMC Genomics*.12 Suppl 3:S17.
- Monchy S, Benotmane MA, Janssen P, Vallaeyts T, Taghavi S, Lelie D, Mergeay M (2007) Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* Are Specialized in the Maximal Viable Response to Heavy Metals. *Bacteriol.* 189(20): 7417-7425.
- Mulla SI, Sun Q, Hu A, Wang Y, Ashfaq M, Eqani SAMAS, Yu CP (2016) Evaluation of Sulfadiazine Degradation in Three Newly Isolated Pure Bacterial Cultures. *PLoS One*. 11(10): e0165013.
- Nascimento DC (2012) Juazeiro do Norte/CE e o desafio da sustentabilidade urbana: entre o crescimento e o desenvolvimento. Monografia de Conclusão de Curso de Especialização lato Sensu em Geografia e Meio Ambiente, Universidade Regional do Cariri – URCA.
- Nies D (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 27:313–339
- Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, et al. (2017) MetaSPades: a new versatile metagenomic assembler, *genome.Res*;27:824-834.
- Page AJ, De Silva, N., Hunt M, Quail MA, Parkhill J, Harris SR, Otto TD, Keane JÁ (2016) Robust high throughput prokaryote de novo assembly and improvement pipeline for Illumina data, *Microbial Genomics*, doi: 10.1099/mgen.0.000083.
- Pereira RM, Silveira EL da, Scaquitto DC, Pedrinho EAN; Val-Moraes SP, Wickert E, Carareto-Alves LM; Lemos EGM (2006) Molecular characterization of bacterial populations of different soils. *Brazilian Journal Microbiology* São Paulo. 37 (4).
- Petersen C and Moller LB (2000). Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, *CopA*, and a *MerR*-like transcriptional activator, *CopR*. *Gene* 261: 289–298.
- Reis MP, Dias MF, Costa PS, Avila MP, Leite LR, Araújo FMV de, Salim ACM Bucciarelli-Rodríguez M, Oliveira G, Chartone-Souza E, Nascimento AMA

- (2016) Metagenomic signatures of a tropical mining-impacted stream reveal complex microbial and metabolic networks. *Chemosphere* 161: 266 e 273.
- Roosa S, Wauven CV, Billon G, Matthijs S, Wattiez R, Gillan D (2014). The *Pseudomonas* community in metal-contaminated sediments as revealed by quantitative PCR: a link with metal bioavailability. *Research in Microbiology* 165.
- Shah N, Tang H, Doak TG, Ye Y.(2011) Comparing bacterial communities inferred from 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomics. *Pac Symp Biocomput.* 2011:165-76.
- Sharma S (2012). Bioremediation: Features, Strategies and applications. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science.* Vol. 2 (2).
- Shi Z, Cao Z, Qin D, Zhu W, Wang Q, Li M, Wang G. (2013) Correlation models between environmental factors and bacterial resistance to antimony and copper. *PLoS One.* 29;8(10):e78533.
- Silver S, Phung T (1996). Bacterial Heavy Metal Resistance: New Surprises. *Annual Review of Microbiology.* Vol. 50:753-789.
- Singleton D R, Ramirez LG, Aitken MD (2009). Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon degradation gene cluster in a phenanthrene degrading *Acidovorax* strain, *Appl. Environ. Microbiol.* 75.
- Thomas SH1, Padilla-Crespo E, Jardine PM, Sanford RA, Löffler FE (2009) Diversity and distribution of anaeromyxobacter strains in a uranium-contaminated subsurface environment with a nonuniform groundwater flow. *Appl Environ Microbiol.* 75(11):3679-87.
- Uhlik O, Wald J, Strejcek M, Musilova L, Ridl J, Hroudova M, Vlcek C, Wang FF, Cheng ST, Wu Y, Ren BZ, Qian W (2017). A Bacterial Receptor PcrK Senses the Plant Hormone Cytokinin to Promote Adaptation to Oxidative Stress. *Cell Rep.*
- Valério E, Chaves S, Tenreiro R (2010). Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: a review. *Toxins* 2:2359-2410.
- Warner DM and Levy SB (2011). SoxS Increases the Expression of the Zinc Uptake System ZnuACB in an *Escherichia coli* Murine Pyelonephritis Model. *Journal of Bacteriology* p. 1177–1185.
- Wexler HM (2007). *Bacterioides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev.* 20:593-621.
- Wu Y, Cui E, Zuo Y, Cheng W, Chen H (2018) Fate of antibiotic and metal resistance genes during two-phase anaerobic digestion of residue sludge revealed by metagenomic approach. *Environmental Science and Pollution Research.* 25(14): 13956–13963.
- Wuana AR and Okieimen EF (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation.

International Scholarly Research Network. *ISRN Ecology*. Volume 2011. Article ID 402647, 20 pages doi:10.5402/2011/402647

Zampieri B Del B, Pinto AB Schultz L, Oliveira MA de, Oliveira AJFC de (2016). Diversity and Distribution of Heavy Metal-Resistant Bacteria in Polluted Sediments of the Araçá Bay, São Sebastião (SP), and the Relationship Between Heavy Metals and Organic Matter Concentrations. *Microb Ecol*. New York. 72: 582.

5. CONCLUSÃO

- Devido a importância que o Riacho dos Macacos possui para a cidade de Juazeiro do Norte, o estudo da contaminação deste ambiente por cobre e zinco através de suas comunidades microbianas permitiu a obtenção de informações sobre o nível de contaminação *in situ* através dos microrganismos e as consequências disso no desenvolvimento de estratégias de remediação ou de prevenção da contaminação neste ambiente. Que para cobre foram 176,4 mg/Kg no Riacho dos Macacos e 7,3 mg/Kg no Rio Granjeiro e para zinco 297,3 mg/Kg no Riacho dos Macacos e 18,5 mg/Kg no Rio Granjeiro.
- Para entender a comunidade microbiana neste ambiente foi necessário aplicar técnicas moleculares que é uma ferramenta poderosa e pouco explorada na região para detecção rápida e mais específica, focando a análise em genes específicos de resistência a metais pesados.
- Os filos mais abundantes foram *Proteobacteria* e *Actinobacteria* conhecidamente resistentes e naturalmente encontrados em ambientes com características distintas devido a possuir um metabolismo diversificado. Foram encontrados os gêneros *Pseudomonas* e *Nocardioides* com resistência para cobre e genes com resistência ao zinco mais abundante em *Aneromixobacter* e *Geobacter* principalmente.

- Os genes mais abundantes foram da família *czcD*, apesar de não específico, eficiente para zinco e *P-type ATPase* ou *CopA* eficiente para cobre. Os dados sugerem que as bactérias habitantes do local conseguiram adaptar-se ao longo do tempo apesar da predominância do estresse metálico. Os resultados do presente trabalho demonstram o potencial de uma abordagem metagenômica para demonstração da diversidade microbiana em outros ambientes poluídos, em busca de uma melhor compreensão do papel dos microrganismos no processo de biodegradação.
- Estudos futuros mais aprofundados são necessários para entender o papel das bactérias no processo de limpeza ambiental e os mecanismos de adaptação utilizados por eles como estratégia de sobrevivência.

6. REFERÊNCIAS

- ABBASI-GARRAVAND E & MULLIGAN CN 2014. Using micellar enhanced ultrafiltration and reduction techniques for removal of Cr (VI) and Cr (III) from water. **Separation and Purification Technology** 132: 505–512.
- ADRIANO DC (2001) Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals. 2nd Edition, **Springer**, New York, 867.
- ARYAL M & LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M (2015) Bioremoval of heavy metals by bacterial biomass **Environ Monit Assess** 187:4173.
- ATSDR (2004) - **Toxicological profile for copper**. New York, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 314 p.
- BENTO FM, CAMARGO FAO, OKEKE B et al (2003) Biorremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo. 34 (1): 65-68.
- BLAIR JMA, RICHMOND GE, PIDDOCK LJV (2014) Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. **Future Microbiol.** 9(10).
- BOLAN NS, ADRIANO DC, NATESAN R, et al (2003) Effects of organic amendments on the reduction and phytoavailability of chromate in mineral soil. **Journal of Environmental Quality** 32: 120–128.
- BYRD J J, ZEPH LR, CASIDA LE (1985) Bacterial control of *Agromyces ramosus* in soil. **Can J Microbiol** 31: 1157–1163.
- COENYE T, FALSEN E, VANCANNEYT M et al (1999) Classification of some *Alcaligenes faecalis*-like isolates from the environment and human clinical samples as *Ralstonia gilardii* sp. **Int J Syst Bacteriol** 49: 405–413.
- COENYE T, GORIS J, VOS P et al (2003) Classification of *Ralstonia pickettii*-like isolates from the environment and various clinical samples as *Ralstonia insidiosa* sp. **Int J Syst Evol Microbiol** 5: 1075–1080.
- DAS, N; VIMALA, R; KARTHIKA, P (2008) Biosorption of heavy metals—An overview. **Indian Journal of Biotechnology** 07: 159-169.
- DHANWAL P, KUMAR A, DUDEJA S, BADGUJAR H, CHAUHAN R, KUMAR A, DHULL P, CHHOKAR V, BENIWAL V (2018) Biosorption of Heavy Metals from Aqueous Solution by Bacteria Isolated from Contaminated Soil. **Water Environ Res.** v.90 n.5 p.424-430.
- DIXIT R, WASIULLAH DM, PANDIYAN K, et al (2015) Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. **Sustainability** 7: 2189-2212.
- DUFFUS, J. H. “Heavy metals”: a meaningless term? Pure and Applied Chemistry (2002) IUPAC Technical Report, v. 74, n. 5, p. 793-807.

FARINA M, ASCHNER M, SYVERSEN T, et al (2007) Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 40: 285–291.

FOSSATI J, BIZANI D (2013) Estudo do bioprocesso utilizando bactérias aeróbias no tratamento da drenagem ácida da mineração de carvão. **Dissertação (mestrado). Canoas: Centro Universitário La Salle.** 2013. 120p.

GADD GM (2010) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation Division of Molecular. **Microbiology.** College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee. v.156 p.609–643.

GOBLENZ A, WOLF K, BAUDA, P (1994) The role of glutathione biosynthesis in heavy metal resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **FEMS Microbiol Rev.** v.14 p.303–308.

GONÇALVES Jr, A. C., LUCHESE, E. B., LENZI, E (2000) Avaliação da fitodisponibilidade de cádmio, chumbo e cromo, em soja cultivada em Latossolo Vermelho Escuro tratado com fertilizantes comerciais. *Química Nova*, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 173-177.

GONZÁLEZ AJ, CAIMÁN C, GORINO N, FORTUNATO MS, RADICE M, GÓMEZ C, MUJICA C, MARQUINA L, GALLEGO A, KOROL SE(2017) Biotransformation of chromium (VI) in liquid effluents by resistant bacteria isolated from the Matanza-Riachuelo basin, in Argentina. **Environ Technol.** v.10 p.1-8.

HASHIM MA, MUKHOPADHYAY S, SAHU JN, et al (2011) Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. **Journal of Environmental Management** v.92 p.2355–2388.

HOOOOM M & PUCHOOA D (2013) Isolation and Identification of Heavy Metals Tolerant Bacteria from Industrial and Agricultural Areas in Mauritius. **Current Research in Microbiology and Biotechnology** v.1 p.119-123.

HYNNINEN A, TOUZÉ T, PITKÄNEN L, et al (2009) An efflux transporter *PbrA* and a phosphatase *PbrB* cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria. **Molecular Microbiology** v.74 n.2 p.384–394.

ISSAZADEH K , JAHANPOUR N, POURGHORBANALI F, et al (2013) Heavy metals resistance by bacterial strains. **Annals of Biological Research** v.4 n.2 p.60-63.

JAISHANKAR M, TSETEN T, ANBALAGAN N, et al (2014) Toxicity: mechanism and health effects of some heavy metals, Interdiscip. **Toxicol.** v.7 p.60–72,

JANSSEN PJ et al (2010) The Complete Genome Sequence of *Cupriavidus metallidurans* Strain CH34, a Master Survivalist in Harsh and Anthropogenic Environments. **PLOS ONE.** v.5 n.5 p.e10433.

JAROSŁAWIECKA A and PIOTROWSKA-SEGET Z (2014) Lead resistance in micro-organisms. **Microbiology** v.160 p.12–25.

KOTAS J & STASICKA Z (2000) Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. **Environmental Pollution** (*Barking, Essex: 1987*) v.107 p.263–283.

LAM TV, AGOVINO P N X, ROCHE L (2007) Linkage study of cancer risk among lead-exposed workers in New Jersey. **Science of the Total Environment** v.372 n.2 p.455–462.

LEGATZKI A, GRASS G, ANTON A, RENSING C, NIES DH (2003) Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. **Journal of Bacteriology** 185: 4354–4361.

LUTSENKO S and KAPLAN JH (1995). Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. **Biochemistry**. 34: 15607–15613.

MALIK A. (2004) Metal bioremediation through growing cells. **Environ International**. 30(2): 261-278.

MONCHY S, BENOTMANE MA, JANSSEN P, et al (2007) Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. **J. Bacteriol.** V.189: 7417–7425.

MORAES, P. P. F. de (2010) **Análise Geoquímica-Ambiental dos Solos de Veredas da Bacia do Rio do Formoso, Município de Buritizeiro, Minas Gerais, Brasil**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geologia do Instituto de Geociências da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de mestre em Geologia. Belo Horizonte – MG.

MUSTAPHA MU AND HALIMOON N (2015) Screening and isolation of heavy metal tolerant bacteria in industrial effluent. **Procedia Environmental Sciences** v.30 p.33 – 37.

NARASIMHULU K, RAO PS, VINOD AV (2010) Isolation and Identification of Bacterial Strains and Study of their Resistance to Heavy Metals and Antibiotics. **J Microbial Biochem Technol.** v.2 n.3 p.074-076.

NASCIMENTO DC (2012) **Juazeiro do Norte/CE e o desafio da sustentabilidade urbana: entre o crescimento e o desenvolvimento**. Monografia de Conclusão de Curso de Especialização lato Sensu em Geografia e Meio Ambiente, Universidade Regional do Cariri – URCA.

NIES DH (1992) CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus*. **J Bacteriol.** v.174 n 24 p. 8102-8110.

NIES DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. **Appl Microbiol Biotechnol** v. 51 p730±750.

NIES DH (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEI Microbiol Rev** v.27 p. 313–339.

NIES DH, NIES A, CHU L, et al (1989) **Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus***. Proc Natl Acad Sci USA. v.86 n.19 p.7351-7355.

NOVICK RP, ROTH C (1968) Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** v.95 n.4 p.1335-1342.

OLJIRA T, MULETA D, JIDA M (2018) Potential Applications of Some Indigenous Bacteria Isolated from Polluted Areas in the Treatment of Brewery Effluents. **Biotechnol Res Int.** v.11 p.9745198.

POLAK-JUSZCZAK L (2013) Trace metals in flounder, *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758), and sediments from the Baltic Sea and the Portuguese Atlantic coast. **Environmental Science and Pollution Research.** v.20 p.7424–7432.

RANI A, KUMAR A, LAL A, et AL (2014) Cellular mechanisms of Cd-induced toxicity: A review. **International Journal of Environmental Health Research** v.24 n.4 p.378–399.

SILVA CC, HAYDEN H, SAWBRIDGE T, MELE P, DE PAULA SO, et al. (2013) Identification of Genes and Pathways Related to Phenol Degradation in Metagenomic Libraries from Petroleum Refinery Wastewater. **PLoS ONE** v.8 n.4 p.e61811.

SILVA TR, VERDE, LCL, Dos SANTOS NETO EV, OLIVEIRA, VM (2013) Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields. **Int Biodeter Biodegr** v.81p.57–70.

SINGH BK, QUINCE C, MACDONALD CA et al (2014) Loss of microbial diversity in soils is coincident with reductions in some specialized functions. **Environ. Microbiol.** v.16 p.2408–2420.

SOARES EV & SOARES HMVM (2013) Cleanup of industrial effluents containing heavy metals: a new opportunity of valorising the biomass produced by brewing industry. **Appl Microbiol Biotechnol** v. 97 p.6667–6675.

SRIVASTAVA S, AGRAWAL SB, MONDAL MK (2015) A review on progress of heavy metal removal using adsorbents of microbial and plant origin. **Environmental Science and Pollution Research** v.22 p.15386–15415.

TCHOUNWOU PB, YEDJOU CG, PATLOLLA AK et al (2012) Heavy metal toxicity and the environment. In Andreas, L.(ed.) **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology.** Springer, Basel, Switzerland v.111 p.133–164.

TOLER HD, MORTON JB, CUMMING JR (2005) Growth and metal accumulation of mycorrhizal sorghum exposed to elevated copper and zinc. **Water, Air Soil Pollut.** v.64 p.155-172.

WANG X, CHEN M, XIAO J, et al (2015) Genome Sequence Analysis of Naphthenic Acid Degrading and Metal Resistant Bacterium *Cupriavidus gilarii* CR3. **PLOS ONE.** v.10 n.8 p.e0132881.

ZETIC VG; STEHLIK-TOMAS V, GRBA S, et al (2001) Chromium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and isolation of glucose tolerance factor from yeast biomass. **J. Biosci.** v.26 p.217-223.

ANEXO

Manuscript Number:

Title: Metagenomics of heavy metal resistance genes from a microbial community in urban waste contaminated environment

Article Type: Full-length research article

Keywords: Metagenome; Bacterial resistance; Heavy metals

Corresponding Author: Dr. Henrique Douglas Coutinho, Professor

Corresponding Author's Institution: URCA

First Author: Henrique Douglas Coutinho, Professor

Order of Authors: Henrique Douglas Coutinho, Professor; Jayze Xavier

Abstract: The aim of this study was to map the metal resistant genes from communities in the Riacho dos Macacos compared to those from Rio Grangeiro, used as control environment with low heavy metals concentration. Sampling was performed by removing the soil in triplicates from the aforementioned environments. The samples using the Illumina Miseq system, in addition to physicochemical analysis. The data were deposited on MG-RAST and analyzed. Various genes relating to copper resistance such as Cu ATPase, multicopper oxidase, *czc* as well as genes relating to zinc resistance mainly from the *czc* family, were found. In the resistance gene taxonomic analysis, the most common bacterial phyla were Proteobacteria with 49.4% and 59.08%, and Actinobacteria with 22.97% and 10.80%, in Riacho dos Macacos and Rio Grangeiro, respectively. From the most abundant genes, *Nocardioides* (2.99%) and *Pseudomonas* (2.67%) were found in Riacho dos Macacos and *Pseudomonas* (10.79%) and *Bradyrhizobium* (6.96%) were found in Rio Grangeiro. This study is pioneering in the heavy metal resistant gene mapping area in the Cariri region, contributing to the identification of possible environmental contamination bioindicators.

Cover Letter

Dear editor, I would like to submit to be evaluated by the referees of **RESEARCH IN MICROBIOLOGY** the **ARTICLE** entitled **Metagenomics of heavy metal resistance genes from a microbial community in urban waste contaminated environment**. I affirm that all authors are according with this submission, that this article is not being considered for publication elsewhere and that the copyright will be under authorization of the publisher. There is no conflict of interest of any author. This article is according with to the international, national and institutional rules considering biodiversity rights. On behalf all other authors, I affirm that all agree with this submission.

HENRIQUE DOUGLAS MELO COUTINHO
Corresponding author

1 **Metagenomics of heavy metal resistance genes from a microbial community in**
2 **urban waste contaminated environment**

3 **XAVIER, J.C. ^{1*}; COSTA, P.E.S. ¹; HISSA, D.C. ²; MELO, V. M. M. ²; FALCÃO,**
4 **R.M. ³; BALBINO V.Q. ³; MENDONÇA L.A.R. ⁴; LIMA, M.G.S. ⁴; COUTINHO,**
5 **H.D.M. ¹; VERDE, L.C.L. ¹**

6 1. Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, CE,
7 Brazil;

8 2. Microbial Ecology and Biotechnology Lab., Federal University of Ceara,
9 Fortaleza, CE, Brazil

10 3. Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

11 4. UFCA-Department of Civil Engineering, UFC - Campus do Cariri, Brazil..

12 *Corresponding author Tel.: +5588998006262. E-mail address:jayzecx@gmail.com

13 **ABSTRACT**

14 The aim of this study was to map the metal resistant genes from communities in the
15 Riacho dos Macacos compared to those from Rio Grangeiro, used as control
16 environment with low heavy metals concentration. Sampling was performed by
17 removing the soil in triplicates from the aforementioned environments. The samples
18 using the *Illumina Miseq* system, in addition to physicochemical analysis. The data
19 were deposited on MG-RAST and analyzed. Various genes relating to copper resistance
20 such as *Cu ATPase*, *multicopper oxidase*, *czc* as well as genes relating to zinc resistance
21 mainly from the *czc* family, were found. In the resistance gene taxonomic analysis, the
22 most common bacterial phyla were *Proteobacteria* with 49.4% and 59.08%, and
23 *Actinobacteria* with 22.97% and 10.80%, in Riacho dos Macacos and Rio Grangeiro,
24 respectively. From the most abundant genes, *Nocardioides* (2.99%) and *Pseudomonas*
25 (2.67%) were found in Riacho dos Macacos and *Pseudomonas* (10.79%) and
26 *Bradyrhizobium* (6.96%) were found in Rio Grangeiro. This study is pioneering in the
27 heavy metal resistant gene mapping area in the Cariri region, contributing to the
28 identification of possible environmental contamination bioindicators.

29
30 Key-words: Metagenome, Bacterial resistance, Heavy metals.

31
32 1. INTRODUCTION

33 Heavy metals are part of a group of dangerous inorganic compounds, without a
34 well-established definition, which are capable of severely contaminating the
35 environment, mainly by anthropic activities such as mining, fertilizer, gasoline, ink and
36 sewer wastes, among others (Wuana and Okieimen, 2011). Prolonged periods of metal
37 depositing increase their total concentration and duration in the soil as well as the
38 environment, causing serious damages to the environment mainly due to their
39 recalcitrant power and the difficult degradation of these pollutants (Grupta and Diwan,
40 2017).

41 Metals such as copper, zinc, iron, potassium, magnesium, manganese, calcium
42 and cobalt are essential nutrients for prokaryotic and eukaryotic organisms at low
43 concentration, since these are involved in many important biological cellular
44 metabolism processes. However, at high concentrations these can considerably change
45 growth, morphology and cellular metabolism, contributing to a decrease in biological
46 diversity (Zampieri et al., 2016).

47 Within heavy metals, copper (Cu^{2+}) is necessary for many physiological
48 processes in plants, such as cell wall metabolism, seed production, photosynthesis,
49 respiration, carbohydrate distribution, disease resistance and water regulation (Lu et al,
50 2017; Chen et al, 2015). Normally, copper is present in drinkable water from Cu^{2+} tubes
51 and at high concentrations, it can provoke serious soil problems, both for its biodiversity
52 and fertility. Nevertheless, copper is not accumulated in the food chain and when
53 together with Zn^{2+} these are especially important to plants, microorganisms, animals
54 and human beings, both being capable of representing direct and indirect threats
55 (Sharma, 2012). Zinc (Zn^{2+}) is a part of enzymes, being involved in hydrocarbon,
56 protein, phosphate and RNA metabolism, however, high zinc concentrations can acidify
57 water and contaminate water beds, which may lead to accumulation in fish,
58 biomagnification of the food chain and soil activity interference (Wuana and Okieimen,
59 2011).

60 Metals dragged by the rain pollute rivers and creeks along cities because of
61 domestic sewage disposal and industrial activities. This is a matter of concern,
62 especially for surrounding resident populations exposed to an environment loaded with
63 toxic metallic residues (Zampieri et al, 2016). The metals concentrate in aquatic and
64 terrestrial environment, causing concern due to degradation difficulties in the removal
65 of excess metal through strategies developed by microorganisms with different

66 adaptations, which makes them resistant and capable of minimizing or inactivating
67 many contaminants. This technology, known as bioremediation, uses the
68 microorganismal metabolism to remove pollutants without environmental damage or,
69 by stimulation, through the addition of nutrients or specific microorganisms to the
70 environment to improve the process efficiency (Sharma, 2012).

71 Metals entering the cell, depending on their concentration and chemical
72 properties, can interact in various ways. Cells usually react to high concentrations by
73 expressing specific resistance systems (Roosa et al, 2014). In this context, many
74 bacteria genetically evolved an adaptation process acquiring metallic resistance.
75 Various genes such as *cadB*, *chrA*, *pbrA*, *MerA* and *NiCoT* have been reported in
76 bacterial resistance and detoxification systems, respectively, against cadmium,
77 chromium, lead, mercury and nickel, as well as in the involvement of transition metal
78 transport (Das et al, 2016; Janssen, 2010). These systems trigger biological responses to
79 the contaminant, especially by: cell wall biosorption, extracellular capsule entrapment,
80 precipitation, complexation, oxidation-reduction and cell membrane transport (efflux
81 pumps) (Sharma, 2012).

82 For wider studies, metagenomics use is necessary to provide a complete
83 organismal visualization through the characterization of the community composition
84 and their functional content (Keegan et al, 2016). Metagenomic sequencing, despite
85 being relatively new and complicated due to complex data structures, has been
86 important in promising (Palheta, 2017) studies identifying the presence of resistant
87 microorganisms (Drewniak et al, 2016).

88 The aim of this study is to map the microbial community present in Riacho
89 dos Macacos, which is contaminated by heavy metals, to analyze the diversity,
90 abundance and distribution of copper and zinc resistant genes compared to the microbial
91 community found in Rio Grangeiro with low heavy metal concentration, which was
92 used as the control group. The results obtained offer new information regarding heavy
93 metal resistance gene diversity in extreme environments permitting better
94 comprehension surrounding microbiological function in environmental cleansing and
95 the molecular adaptation mechanisms.

96

97 2. MATERIALS AND METHODS

98

99 2.1 Sample collection

100

101 Samples were collected from the Riacho dos Macacos margin, at Juazeiro do
102 Norte (CE) (-7.212977, -39303883 MG-RAST ID mgm4765761.3) due to the
103 proximity to veneered jewels, aluminum artifacts and leather tanning factories which
104 work with corrosive, flammable and toxic products. Other samples were collected from
105 the Rio Grangeiro margin, at Crato (CE) (-7.164863, -39.261734 MG-RAST ID
106 mgm4765758.3) on a reserved place where water contamination by excessive heavy
107 metals is less likely. 5 cm deep samples with approximately 150 g were removed a
108 meter from the collection site margins. The sampling was performed in triplicates, with
109 a meters distance from each sample using previously autoclave sterilized PVC pipes
110 with 10 cm diameter. After the collection, the samples were taken to a laboratory and
111 incubated at 4°C for DNA isolation of the microbial community and heavy metal
112 concentration sample analysis.

113

114 2.2 Soil metal analyzes

115

116 To analyze the heavy metals copper and zinc, approximately 150 g of soil
117 from the superficial layers, roughly 0 to 20 cm, from neighboring areas in the Riacho
118 dos Macacos and Rio Grangeiro with the aid of a non-metallic tool, so as to not
119 contaminate the sample with metals present in tools normally used in soil retrieval, were
120 collected in triplicates. A layer of up to 20cm depth was chosen since this depth
121 contains the greatest chemical element and organic matter concentrations, as well as the
122 reactions between them, as highlighted by Aguiar, Marins, Almeida (2007). Still in the
123 field, the samples were adequately conditioned and sent to the Sanitation laboratory of
124 the Federal University of Cariri (UFCA).

125

126 In the laboratory, the samples were dried at room temperature, crushed and
127 ground in a mortar to a fine powder before being passed through a sieve to obtain the
128 finest fraction (<0.074mm) utilized for chemical analysis.

129

130 Microwave digestion with concentrated nitric acid was the methodology used
131 for heavy metal determination in conjunction with Inductively Coupled Plasma-Optical
132 Emission Spectroscopy (ICP/OES) for readings, method 3051-16, recommended by the
133 United States Environmental Protection Agency (US EPA, 1994).

132

133 2.3 DNA extraction

134

135 Total soil community DNA was extracted from 0.25 g of each soil sample using the
136 MoBio PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, CA, USA) according to the
137 manufacturer's instructions. Purity of the extracted DNA was checked using a Nanodrop ND-
138 1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and DNA
139 concentration was determined using Qubit[®] 2.0 fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
140 Integrity of the DNA was confirmed by electrophoresis in a 0.8 % agarose. All DNA samples
141 were stored at -20 °C until used in downstream analyses.

142 2.4 Metagenomic DNA sequencing

143 Shotgun metagenome libraries were constructed using a *Nextera XT DNA Sample*
144 *Preparation Kit* (Illumina) as recommended by the manufacturer and sequenced by Illumina
145 MiSeq (Illumina, San Diego, CA) technology at the Center for Genomics and Bioinformatics
146 (CeGenBio) of the Drug Research and Development Center (NPDM), at the Federal University
147 of Ceará, Brazil. Analysis and annotation of output data were carried out by MG-RAST
148 (Rapid Annotation using Subsystems Technology for Metagenomes) server (Meyer et al. 2008).

149

150 2.5 Bioinformatic analysis

151

152 The data generated from sample sequencings were processed where the first
153 step involved a dereplication filter to remove artificially propagated sequences produced
154 during sequencing (Gomez-Alvarez et al., 2009). The second step eliminated low
155 quality sequences, evaluated by the presence of more than 5 bases with a Phred rating of
156 less than 15 (COX et al, 2010). The last step was based on sequence length and
157 ambiguous pollutants, where sequences with more than twice the standard deviation
158 and/or which contained ambiguous baseline targets were removed. This filtration and
159 preparation process was carried out in partnership with Prof. Dr. Valdir de Balbino from
160 the Bioinformatics and Bioevolution Laboratory of the Federal University of
161 Pernambuco (UFPE).

162 The triplicate results were united in one archive and metagenomics data
163 annotation was performed using the MG-RAST (*Meta Genome Rapid Annotation using*
164 *Subsystem Technology*, v 4.0.3) (<http://metagenomics.nmpdr.org>) server. This pipeline
165 provides many phylogenetic and metabolic reconstruction methods, protein similarity
166 analysis, protein classification and functional annotation (MEYER et al, 2008). The

167 sequences were functionally annotated using the SEED Subsystem database, with
168 maximum *e-Value* equal to $10 e^{-5}$, 60% minimum identity and a minimum alignment
169 length of 15 measured amino acids for proteins. In the present study, DNA dataset
170 (MG-RAST ID: mgm 4765761.3 (RM) and mgm 4765758.3(RG)) was used for the
171 analyses.

172

173 3 RESULTS AND DISCUSSION

174

175 The heavy metal concentration levels of copper and zinc found on the both
176 environments are 176.4 mg/Kg and 297.3 mg/Kg, respectively, at Riacho dos Macacos
177 and 7.3 mg/Kg and 18.5 mg/Kg, respectively, at Rio Grangeiro. The heavy metal levels
178 found at Riacho dos Macacos were relatively high, compared to the maximum values
179 allowed by the European Economic Community, which are 150 mg/Kg for Cu^{2+} and
180 140 mg/Kg for Zn^{2+} (Chaudri et al, 1993). The low heavy metal concentration
181 quantified in the control sample shows this environment is not contaminated by heavy
182 metals and can be used as a control group in community comparisons.

183

184 3.1 Metagenome Phylogenetic Profile

185

186 In this study, samples were collected from Riacho dos Macacos (RM) and Rio
187 Grangeiro (RG) to perform metagenomic sequencing to investigate the genetic profile
188 of metal resistance in these environments. A total of 100,894 RM *contigs* and 103,509
189 RG *contigs* were generated and deposited in the MG-RAST database.

190 The MG-RAST functional gene sequence analysis showed *Bacteria* was the
191 dominant domain in both environments representing 97.97% and 96.5% of sequences at
192 Riacho dos Macacos and Rio Grangeiro, respectively. *Eukarya* represented 0.44% and
193 0.45%, *Archea* 1.62% and 2.97%, viruses 0.03% and 0.06%, and other sequences
194 0.005% and 0.007% from the total DNA abundance at Riacho dos Macacos and Rio
195 Grangeiro respectively. The bacterial sequences were affiliated with 22 different phyla
196 (Figure 01). The most abundant phyla in Riacho dos Macacos was *Proteobacteria* with
197 49.09% of sequences which corroborates with Chen (2017), who found dominance from
198 this phyla when researching cadmium contamination. Other studies have also shown the
199 same phylum with greater abundance than other phyla in environment communities
200 with high heavy metal concentrations (Reis et al, 2013; Chen et al, 2017).

201 *Proteobacteria* are Gram-negative bacteria which can be separated into five classes,
202 *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*
203 and *Epsilonproteobacteria*, this being the biggest and most diversified bacterial group
204 with great morphological and metabolic diversity, which is why they occur in many
205 environments (Bonner and Castenholz, 2013; Pereira et al, 2006).

206 *Actionobacteria* was the second more abundant phyla with 22.97%, with the
207 dominance of these two phyla being reported in other studies (Singleton et al, 2009;
208 Uhlik et al, 2012). Even though different studies were carried out in different places,
209 they suggest that contaminated soils have the same dominant bacterial groups, taking
210 into account their ability to handle extreme environments and their omnipresent
211 characteristic. However generally, these are Gram-positive bacteria with distinct
212 morphology and phenotype (Bonner and Castenholz, 2013).

213 In the Rio Grangeiro control samples, the analysis also indicated dominance
214 by the *Proteobacteria* (58.08%) and *Actinobacteria* (10.80%) phyla (figure 1). This
215 abundance both in urban and non-urban environments was obtained by a similar study
216 by Medeiros and collaborators (2016) where this was expected given that
217 *Proteobacteria* possess the capacity to survive within diverse environments around the
218 world.

219 Although codominances differ from both environments, in the urban
220 environment *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* and *Firmicutes* (belonging to human and
221 other animal's intestinal microbiota) obtained a greater number of sequences,
222 respectively. A lack in adequate sanitation may be the cause of their presence in Riacho
223 dos Macacos, coinciding with the study by Medeiros and collaborators (2016), which
224 found these three phyla within the most abundant, after *Proteobacteria*.

225 The non-urban environment (Rio Grangeiro) revealed many genera also
226 found in the study by Medeiros and collaborators (2016) such as *Bradyrhizobium*,
227 *Candidatus*, *Solibacter*, *Rhodopseudomonas*, *Geobacter*, *Magnetospirillum*. The
228 *Pseudomonas* and *Burkholderia* genera, also found in this study, are commonly found
229 in various niches and can cause severe diseases in humans affecting human healthy
230 (McConnell et al, 2013; Valério et al, 2010).

231

232 3.2 Functional categories

233

234 Functional category analysis allows the evaluation of performance and
235 metabolic activity of the organisms present in the identified environments, thus
236 identifying which ones are more active (figure 2).

237 28 functional categories related to regulation, metabolism and transport were
238 found, reflecting the high diversity and microbial activity. The more active categories
239 identified were those from carbohydrate; protein, amino acids and derivatives
240 metabolism; miscellaneous, cofactors/vitamins and respiration in both studied
241 environments.

242

243 3.3 Copper resistant genes

244

245 The presence of *P-type ATPase* (CopA) which refers to efflux and influx pumps,
246 predominantly of cations including Copper (Fagan and Saier, 1994), and
247 *multicopperoxidase* responsible for the efflux pump (Lu et al, 2017) suggests a positive
248 correlations.

249 In *Escherichia coli* the *Cu(I)-translocating P-type ATPases* also denominated as
250 *copA* was reported in previous studies as being involved in copper homeostasis
251 (Petersen and Moller, 2000) and copper transport resistance (Fan et al, 2001).

252 Corroborating with this study, copper resistance genes were also found in
253 *Pseudomonas*, *Nocardioides*, *Methylbium*, *Borkholderia* (Gillian, 2015; Thomas et al,
254 2009), *Flavobacterium* (Kou et al, 2018) and *Anaeromyxobacter*, although at low
255 quantities (Thomas et al, 2009). Curiously, the *Cupriavidus* genus, known to be
256 resistant to high metal concentrations, was found at Riacho dos Macacos. A similar
257 result was obtained by Janssen, (2010), which may be due to environmental limiting
258 factors which would influence its growth.

259

260 3.5 Zinc resistant genes

261

262 The most abundant zinc resistant genes were, respectively, *czcD*, a major
263 cadmium-cobalt-zinc efflux pump (Nies, 2003), *czcB*, *ZIP* and the sigma-54 zinc
264 dependent regulator, which deal with efflux systems.

265 The efflux systems include trans-envelope targeted by the resistance division
266 nodulation (RND), facilitators (CDF) and P-type ATPases (Legatzki, 2003). Within the
267 efflux systems, P-type ATPases constitute a large family of proteins with some being

268 suggested to be involved in metal homeostasis processes in microorganisms (Lutsenko,
269 1995). Gram-negative bacteria possess various functions, including those relating to
270 metal toxicity, a feature which probably allows greater flexibility for environmental
271 exploration and pathogenicity.

272 Gram-positive bacteria are among the three groups with low RND protein
273 frequency. *CzcA* alone provides low resistance, thus, the RND protein action
274 mechanism in Gram-positive bacteria, by functioning as a single subunit efflux system,
275 may be different from most Gram-negative bacteria (Nies, 2003).

276 Efflux pumps were widely studied with *Cupriavidus metallidurans*, with
277 *czcCBA* and the analogue system *cusCBA* as non-specific gene product, where the first
278 works on cadmium, zinc and cobalt detoxification and the second works on monovalent
279 cations detoxification, such as silver and copper. *Cupriavidus metallidurans* CH34
280 possesses several other previous denominations and is also one of the most studied
281 strains (Hynninen et al, 2009). Although knowledge restrictions regarding bacterial
282 communities resistant to these metal types exist, this specie is considered a model
283 organism in this area (Janssen, 2010; Monchy et al, 2007).

284 *Czc* is a Cd^{2+} , Zn^{2+} and Co^{2+} chemiosmotic efflux pump, essentially being
285 internal membrane (*CzcA*), outer membrane (*CzcC*) and membrane (*CzcB*) proteins, of
286 which all are involved in cation transport from the cytoplasm, via the periplasm, out of
287 the cell (Silver and Phung, 1996).

288 Zinc resistant genes were found at higher quantities in *Geobacter*, *Syntropus*
289 and *Escherichia* and at higher quantities in comparison to Rio Granjeiro. Equivalent
290 results were demonstrated in a *Geobacter* metatranscriptome study (Kou et al, 2018),
291 however with regards to copper.

292 A comparative analysis of the resistant genes found in higher quantities
293 and those correlated to the genera found was also performed (figure 5). These genera
294 were identified as strong bioremediators especially those associated with plants,
295 favoring their growth even under stress conditions such as in the presence of these
296 metals in studies with *Pseudomonas sp* (Rajkumar and Freitas, 2008; Dabrowska et al,
297 2017; Hasssan et al, 2017), *Burkholderia sp.* (Jiang et al, 2008), *Bradihizobium* (Dary et
298 al, 2010) and *Micobacterium* (Pereira et al, 2015) with the degradation function of their
299 *Nocardioides* aromatic compounds being examined (Zhao et al, 2018) and of family
300 *Geobacteriaceae* (Drewniak et al, 2016).

301

302 4. CONCLUSION

303

304 Metagenomics data revealed that genes involved with metal resistance have
 305 differentiated characteristics such as regulation, transport, metabolism, metal resistance,
 306 among others, reflecting the community's metabolic abundance in search of survival.

307 The most abundant phyla were *Proteobacteria* and *Actinobacteria*, known to
 308 be resistant to various environments because of its metabolic diversity, with the most
 309 abundant genera being *Nocardioides* and *Pseudomonas*, in this order, for Riacho dos
 310 Macacos. As for the control, Rio Grangeiro, the same phyla were verified as the most
 311 abundant while the most abundant genera were *Pseudomonas* and *Bradyrhizobium*. The
 312 *Anaeromixobacter* and *Geobacter* genera were identified as the most abundant with zinc
 313 resistant genes and *Pseudomonas* and *Nocardioides* with greater abundance of copper
 314 resistant genes. The most abundant genes belonged to the *czcD* family, involved in zinc
 315 resistance and *P-type ATPase* or *CopA*, which are efficient against copper. The
 316 metagenomic analysis was efficient allowing the presented information to serve as a
 317 basis for further studies on metal effects in microbial communities, as well as to
 318 evaluate possible indicative bacteria for the bioremediation process.

319

320 5. REFERENCES

321

322 Aguiar, J.E.; Marins, R.V.; Almeida, M.D. (2007). Comparação de metodologias de
 323 digestão de sedimentos marinhos para caracterização da geoquímica de metais-
 324 traço na plataforma continental Nordeste oriental brasileira. *Geochimica*
 325 *brasiliensis*, 21(3): 304-323, 2007.

326 Abhauer KP, Wemheuer B, Daniel R, Meinicke P.(2015)Tax4Fun: predicting functional
 327 profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*. 1;31(17):2882-4.

328 Booner D R, Castenholz RW(2013); Bergey's manual de sistematic bacteriology.
 329 Editores. Volume 1 Garrity, G.M. editor in chief - 2^a. edição.

330 Bruins MR, Kapil S, Oehme FW (2000) Microbial resistance to metals in the
 331 environment. *Ecotoxicol Environ Saf*. 45(3):198-207.

332 Chaudri AM, McGrath SP, Giller KE, Rietz E, SAUERBECK DR. Enumeration of
 333 indigenous Rhizobium leguminosarum biovar trifolii in soil previously treated
 334 with metal-contaminated sewage sludge. *Soil Biol. Biochem*. 25:301-309, 1993.

335 Chen C, Song Y, Zhuang K, Li L, Xia Y, Shen Z (2015) Proteomic Analysis of Copper-
 336 Binding Proteins in Excess Copper-Stressed Roots of Two Rice (*Oryza sativa* L.)
 337 Varieties with Different Cu Tolerances C.Plosone, 1-19, 2015.

- 338 Chen Z, Zheng Y, Ding C, Ren X, Yuan J, Sun F, Li Y (2017) Integrated metagenomics
339 and molecular ecological network analysis of bacterial community composition
340 during the phytoremediation of cadmium-contaminated soils by bioenergy crops.
341 *Ecotoxicol Environ Saf.* ;145:111-118. <http://doi:10.1016/j.ecoenv.2017.07.019>.
- 342 Chlopecka A, Bacon JR, Wilson MJ, Kay J (1996). Assessment of form of Cd, Zn and
343 Pb in contaminated calcareous and gleyed soils in Southwest Poland. *Science of*
344 *The Total Environment*. Volume 188, Issues 2–3, Pages 253-262.
- 345 Dabrowska, G, Hryniewicz, K, Trejgell, A and Baum, C (2017). The effect of plant
346 growth-promoting rhizobacteria on the phytoextraction of Cd and Zn by *Brassica*
347 *napus* L. *Int. J. Phytoremediation* 19: 597–604.
- 348 Dary M, Chamber-Pérez MA, Palomares, AJ, and Pajuelo E (2010). “In situ”
349 phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated
350 with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J. Hazard. Mater.* 177:
351 323–330.
- 352 Das S, Dash HR, Chakraborty J (2016) Genetic basis and importance of metal resistant
353 genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with
354 toxic metal pollutants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100(7):2967-84.
355 Doi:10.1007/s00253-016-7364-4.
- 356 Drewniak L, Krawczyk PS, Mielnicki S, Adamska D, Sobczak A , Lipinski L, Burec-
357 Drewniak W and Sklodowska A (2016) Physiological and Metagenomic Analyses
358 of Microbial Mats Involved in Self-Purification of Mine Waters Contaminated
359 with Heavy Metals. *Frontiers in Microbiology* vol 7.
- 360 F Meyer, D Paarmann, M D’Souza, R Olson, EM Glass, M Kubal, T Paczian, A Rodriguez, R
361 Stevens, A Wilke, J Wilkening and RA Edwards. The metagenomics RAST server – a
362 public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes.
363 *BMC Bioinformatics.* 2008; 9: 386. doi:10.1186/1471-2105-9-386
- 364 Fagan MJ and Saier MH Jr. (1994). *P-type ATPases* of eukaryotes and bacteria:
365 sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J Mol Evol.* 38(1):57-
366 99.
- 367 Fan B, Grass G, Rensing C, Rosen BP (2001) *Escherichia coli CopA* N-terminal
368 Cys(X)(2)Cys motifs are not required for copper resistance or transport. *Biochem*
369 *Bio-phys Res Commun* 286: 414–418.
- 370 Fang Q, Fan Z, Xie Y, Wang X, Li K, Liu Y.(2016) Screening and Evaluation of the
371 Bioremediation Potential of Cu/Zn-Resistant, Autochthonous *Acinetobacter* sp.
372 FQ-44 from *Sonchus oleraceus* L. *Front Plant Sci.* 30;7:1487.
- 373 Gillian DC, Roosa S, Kunath B, Billon G, Wattiez R (2015). The long-term adaptation
374 of bacterial communities in metal-contaminated sediments: a metaproteogenomic
375 study. *Environmental microbiology* 17:1991-2005.
- 376 Gupta P and Diwan B (2017). Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal
377 removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies.
378 *Biotechnology Reports* 13: 58–71.

- 379 Hansda A, Kumar V, Anshumali (2017) Cu-resistant *Kocuria sp.* CRB15: a potential
380 PGPR isolated from the dry tailing of Rakha copper mine. *Biotech* 7:132
- 381 Hassan, TU, Bano, A, and Naz, I. (2017). Alleviation of heavy metals toxicity by the
382 application of plant growth promoting rhizobacteria and effects on wheat grown
383 in saline sodic field. *Int. J. Phytoremediation* 19: 522–529.
- 384 Hernández-Arriaga A M, Rubio-Lepe T S, Espinosa M, Solar G (2009). Repressor
385 *CopG* prevents access of RNA polymerase to promoter and actively dissociates
386 open complexes. *Nucleic Acids Research*.
- 387 Hynninen A, Touzé T, Pitkänen L, Mengin-Lecreulx D, Virta M (2009) An efflux
388 transporter *PbrA* and a phosphatase *PbrB* cooperate in a lead-resistance
389 mechanism in bacteria. *Mol Microbiol.* 74(2): 384–394.
- 390 Janssen PJ et al (2010). The Complete Genome Sequence of *Cupriavidus metallidurans*
391 Strain CH34, a Master Survivalist in Harsh and Anthropogenic Environments.
392 *Plos One*.
- 393 Jarosławiecka A and Piotrowska-Seget Z (2014) Lead resistance in microorganisms.
394 *Microbiology*, 160, 12–25.
- 395 Jiang CY¹, Sheng XF, Qian M, Wang QY.(2008) Isolation and characterization of a
396 heavy metal-resistant Burkholderia sp. from heavy metal-contaminated paddy
397 field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal
398 accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere.* 72(2):157-64.
- 399 Keegan KP, Glass EM, Meyer F (2016). MG-RAST, a Metagenomics Service for
400 Analysis of Microbial Community Structure and Function. *Methods Mol Biol*.
- 401 Korem T, Zeevi D, Suez J, Weinberger A, Avnit-Sagi T, Pompan-Lotan M, Matot E,
402 Jona G, Harmelin A, Cohen N, Sirota-Madi A, Thaiss CA, Pevsner-Fischer M,
403 Sorek R, Xavier RJ, Elinav E, Segal E (2015). Growth dynamics of gut
404 microbiota in health and disease inferred from single metagenomic sample
405 *Science*. Vol. 349, Issue 6252, pp. 1101-1106.
- 406 Kou S, Vincent G, Gonzalez E, Pitre FE, Labrecque M, Brereton NJB (2018)The
407 Response of a 16S Ribosomal RNA Gene Fragment Amplified Community to
408 Lead, Zinc, and Copper Pollution in a Shanghai Field Trial. *Front Microbiol.*
409 1;9:366. [http://doi: 10.3389/fmicb.2018.00366](http://doi:10.3389/fmicb.2018.00366).
- 410 Legatzki A, Grass G, Anton A, Rensing C, Nies DH (2003) Interplay of the Czc
411 System and Two P-Type ATPases in Conferring Metal Resistance to *Ralstonia*
412 *metallidurans*. *Journal of bacteriology.* vol. 185 no. 15 4354-4361.
- 413 Levy DB, Barbarick KA, Siemer EG and Sommers LE (1992). Distribution and
414 Partitioning of Trace Metals in Contaminated Soils near Leadville, Colorado.
415 *Journal of Environmental Quality Abstract*.
- 416 Lu M, Jiao S, Gao E, Song X, Li Z, Hao X, Rensing C, Wei G(2017) Transcriptome
417 Response to Heavy Metals in *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020 Reveals
418 New Metal Resistance Determinants That Also Promote Bioremediation by

- 419 *Medicago lupulina* in Metal-Contaminated Soil. *Appl Environ Microbiol.*
420 29;83(20). pii: e01244-17. [http://doi: 10.1128/AEM.01244-17](http://doi:10.1128/AEM.01244-17).
- 421 Lutsenko S and Kaplan JH (1995). Organization of P-type ATPases: significance of
422 structural diversity. *Biochemistry*, 34, 15607–15613.
- 423 McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors
424 contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbial*
425 *Rev.*2013;37:130-155.
- 426 Medeiros JD, Cantão ME, Cesar DE, Nicolas MF, Diniz CG, Silva VL, Vasconcelos
427 ATR, Coelho CM (2016). Comparative metagenome of a stream impacted by the
428 urbanization phenomenon. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47, 835-845.
- 429 Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, Paczian T, Rodriguez
430 A, Stevens R, Wilke A, Wilkening J, Edwards RA (2008). The metagenomics
431 RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional
432 analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 9:386.
- 433 Mitra S, Stärk M, Huson DH (2011) Analysis of 16S rRNA environmental sequences
434 using MEGAN. *BMC Genomics*.12 Suppl 3:S17. [HTTP://doi: 10.1186/1471-](http://doi:10.1186/1471-2164-12-S3-S17)
435 [2164-12-S3-S17](http://doi:10.1186/1471-2164-12-S3-S17).
- 436 Monchy S, Benotmane MA, Janssen P, Vallaeys T, Taghavi S, Lelie D, Mergeay M
437 (2007) Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* Are
438 Specialized in the Maximal Viable Response to Heavy Metals. *Bacteriol.* vol.
439 189 no. 20 7417-7425.
- 440 Nascimento DC (2012) Juazeiro do Norte/CE e o desafio da sustentabilidade urbana:
441 entre o crescimento e o desenvolvimento. Monografia de Conclusão de Curso de
442 Especialização lato Sensu em Geografia e Meio Ambiente, Universidade Regional
443 do Cariri – URCA.
- 444 Nies D (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol*
445 *Rev* 27:313–339
- 446 Palheta, Janyne Stephanie de Oliveira Análise de sequências de DNA Metagenômico
447 de solos da Floresta Atlântica Paranaense: Implicações ecológicas e
448 biotecnológicas. Dissertação de mestrado. Curitiba, 2017.
- 449 Pereira RM, Silveira EL da, Scaquitto DC, Pedrinho EAN; Val-Moraes SP, Wickert E,
450 Carareto-Alves LM; Lemos EGM (2006) Molecular characterization of bacterial
451 populations of different soils. *Brazilian Journal Microbiology* vol.37 no.4 São
452 Paulo. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000400007>
- 453 Pereira, SIA, Barbosa, L., and Castro, P. M. L. (2015). Rhizobacteria isolated from a
454 metal polluted area enhance plant growth in zinc and cádmium contaminated soil.
455 *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 12, 2127–2142.

- 456 Petersen C and Moller LB (2000). Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by
457 a *P-type ATPase*, *CopA*, and a *MerR*-like transcriptional activator, *CopR*. *Gene*
458 261: 289–298.
- 459 Rajkumar M, Freitas H. (2008) Influence of metal resistant-plant growth-promoting
460 bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy
461 metals. *Chemosphere*. 2008 71(5):834-42.
- 462 Reis MP, Dias MF, Costa PS, Avila MP, Leite LR, Araújo FMV de, Salim ACM
463 Bucciarelli-Rodriguez M, Oliveira G, Chartone-Souza E, Nascimento AMA
464 (2016) Metagenomic signatures of a tropical mining-impacted stream reveal
465 complex microbial and metabolic networks. *Chemosphere* 161: 266e273.
466 [http://dx.doi.org/10.1016/j.](http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.042)
- 467 Roosa S, Wauven CV, Billon G, Matthijs S, Wattiez R, Gillan D (2014). The
468 *Pseudomonas* community in metal-contaminated sediments as revealed by
469 quantitative PCR: a link with metal bioavailability. *Research in Microbiology*
470 165.
- 471 Shah N, Tang H, Doak TG, Ye Y.(2011) Comparing bacterial communities inferred
472 from 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomics. *Pac Symp*
473 *Biocomput*. 2011:165-76.
- 474 Sharma S (2012). Bioremediation: Features, Strategies and applications. *Asian Journal*
475 *of Pharmacy and Life Science*. Vol. 2 (2).
- 476 Silver S, Phung T (1996). Bacterial Heavy Metal Resistance: New Surprises. *Annual*
477 *Review of Microbiology*. Vol. 50:753-789
- 478 Singleton D R, Ramirez LG, Aitken MD (2009). Characterization of a polycyclic
479 aromatic hydrocarbon degradation gene cluster in a phenanthrene degrading
480 *Acidovorax* strain, *Appl. Environ. Microbiol.* 75.
- 481 Thomas SH1, Padilla-Crespo E, Jardine PM, Sanford RA, Löffler FE (2009) Diversity
482 and distribution of anaeromyxobacter strains in a uranium-contaminated
483 subsurface environment with a nonuniform groundwater flow. *Appl Environ*
484 *Microbiol.* 75(11):3679-87.
- 485 Uhlik O, Wald J, Strejcek M, Musilova L, Ridl J, Hroudova M, Vlcek C, Wang
486 FF, Cheng ST, Wu Y, Ren BZ, Qian W (2017). A Bacterial Receptor PcrK Senses
487 the Plant Hormone Cytokinin to Promote Adaptation to Oxidative Stress. *Cell*
488 *Rep*.
- 489 Valério E, Chaves S, Tenreiro R. Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic
490 environments: a review. *Toxins* 2010;2:2359-2410.
- 491 Warner DM and Levy SB (2011). SoxS Increases the Expression of the Zinc Uptake
492 System ZnuACB in an *Escherichia coli* Murine Pyelonephritis Model. *Journal of*
493 *Bacteriology* p. 1177–1185.

- 494 Wexler HM. *Bacterioides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev.*
495 2007; 20:593-621.
- 496 Wu Y, Cui E, Zuo Y, Cheng W, Chen H (2018) Fate of antibiotic and metal resistance
497 genes during two-phase anaerobic digestion of residue sludge revealed by
498 metagenomic approach. *Environmental Science and Pollution Research.* pp 1–
499 8| <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1598-x>.
- 500 Wuana AR and Okieimen EF (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review
501 of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation.
502 International Scholarly Research Network. *ISRN Ecology*. Volume 2011.
- 503 Zampieri B Del B, Pinto AB Schultz L, Oliveira MA de, Oliveira AJFC de (2016).
504 Diversity and Distribution of Heavy Metal-Resistant Bacteria in Polluted
505 Sediments of the Araçá Bay, São Sebastião (SP), and the Relationship Between
506 Heavy Metals and Organic Matter Concentrations. *Microb Ecol.* New York.
- 507 Zhao X, Fan F, Zhou H, Zhang P, Zhao G.(2018) Microbial diversity and activity of an
508 aged soil contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioprocess Biosyst*
509 *Eng.* 41(6):871-883.
510
511

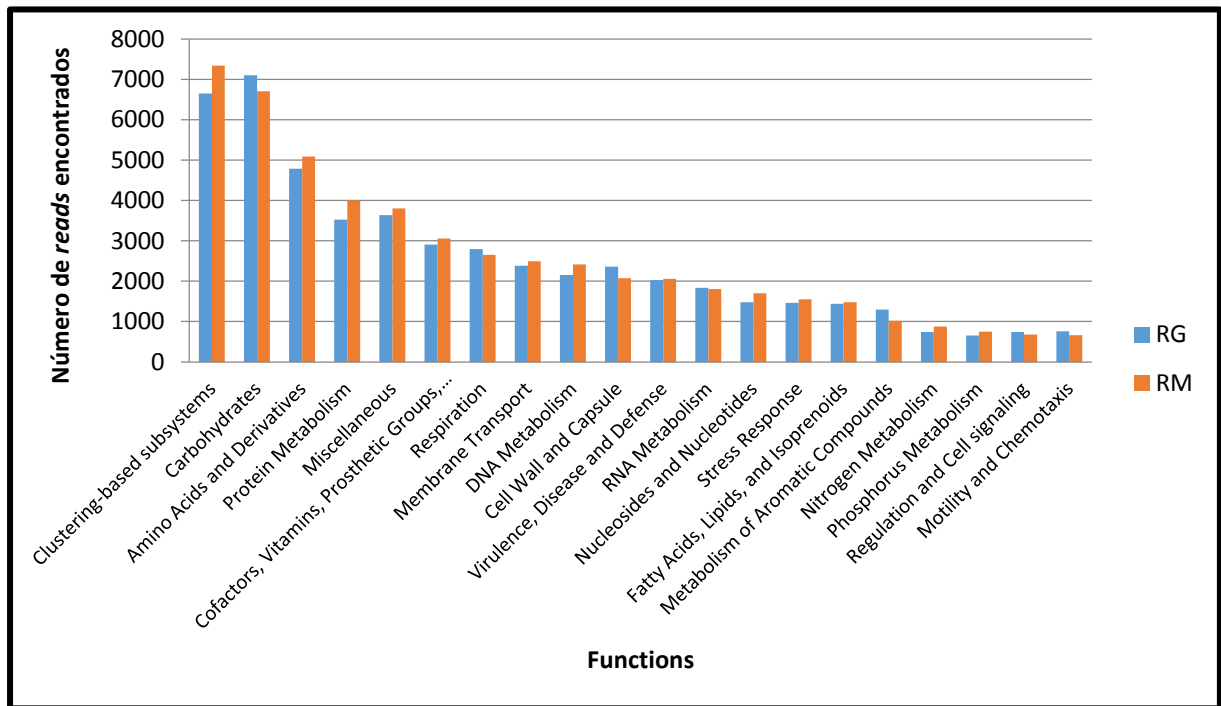


Figure 1.

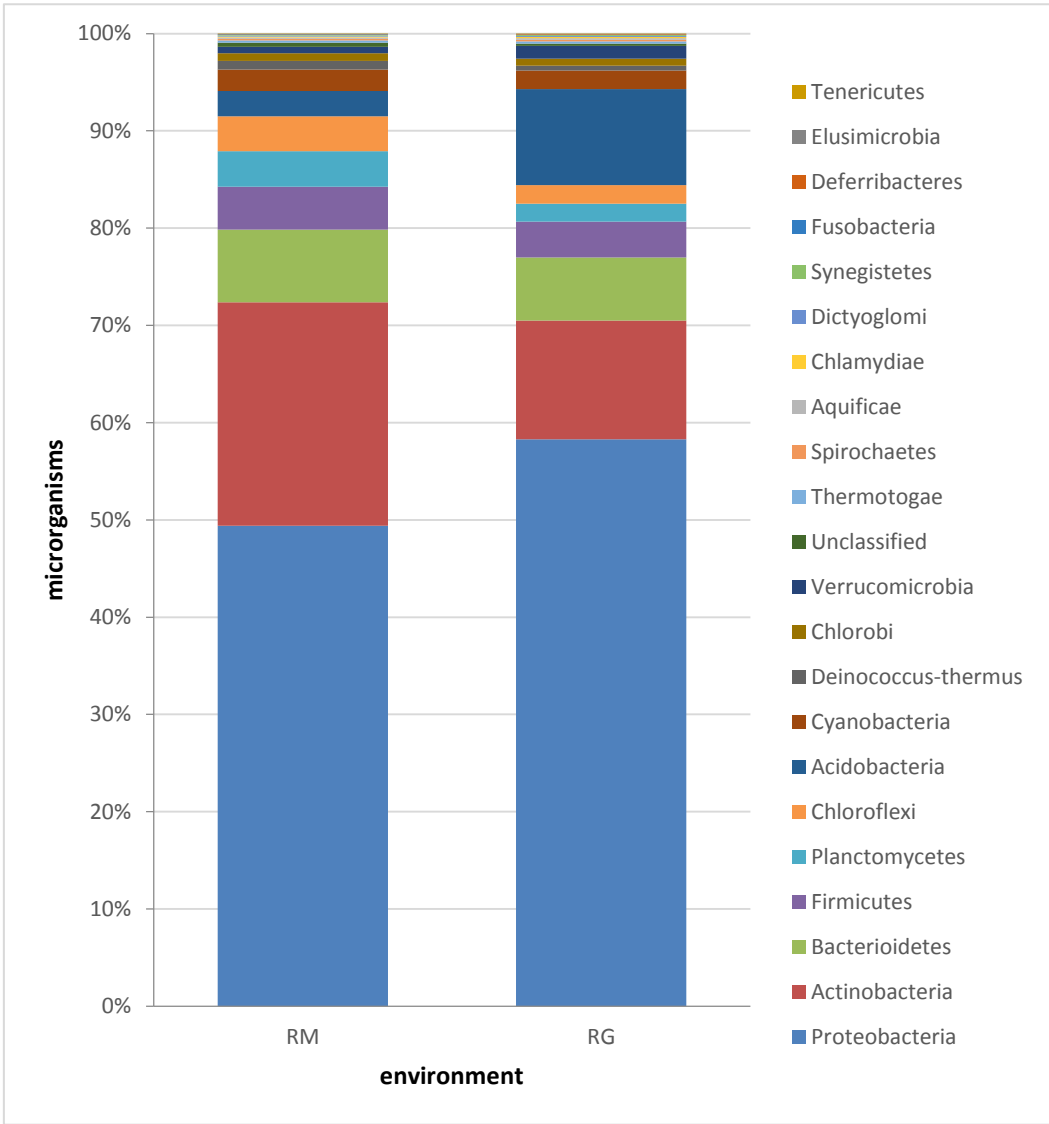


Figure 2.

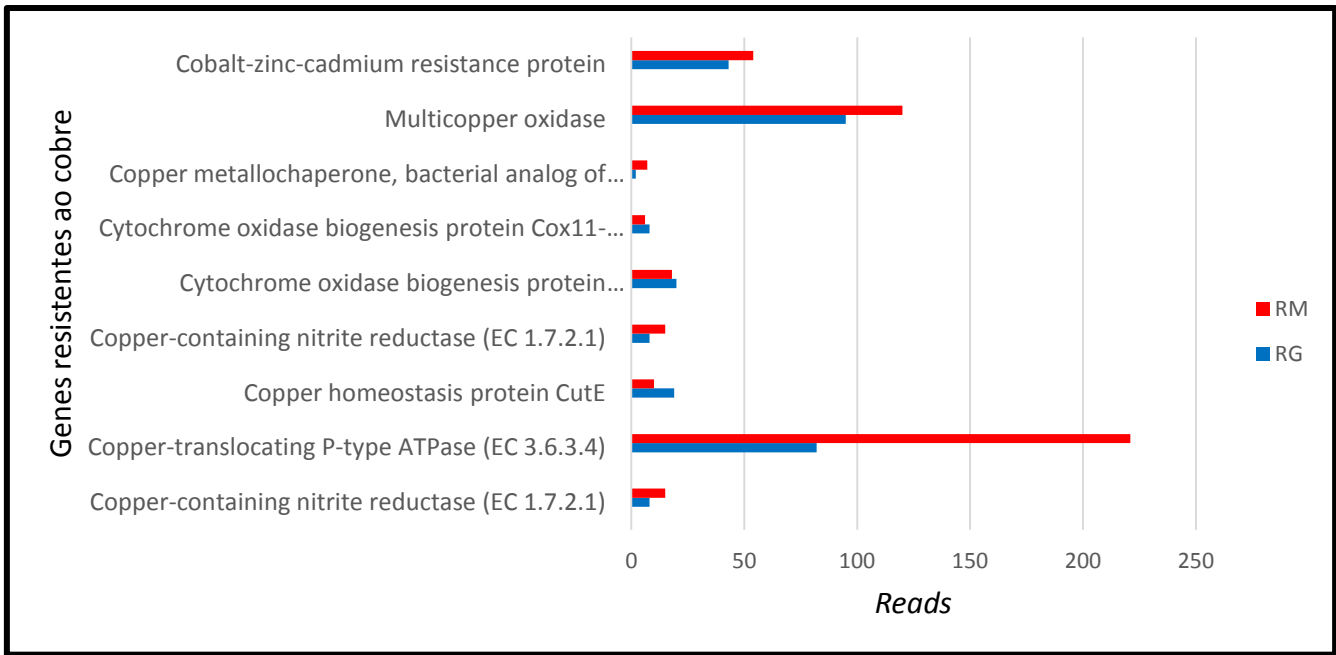


Figure 3.

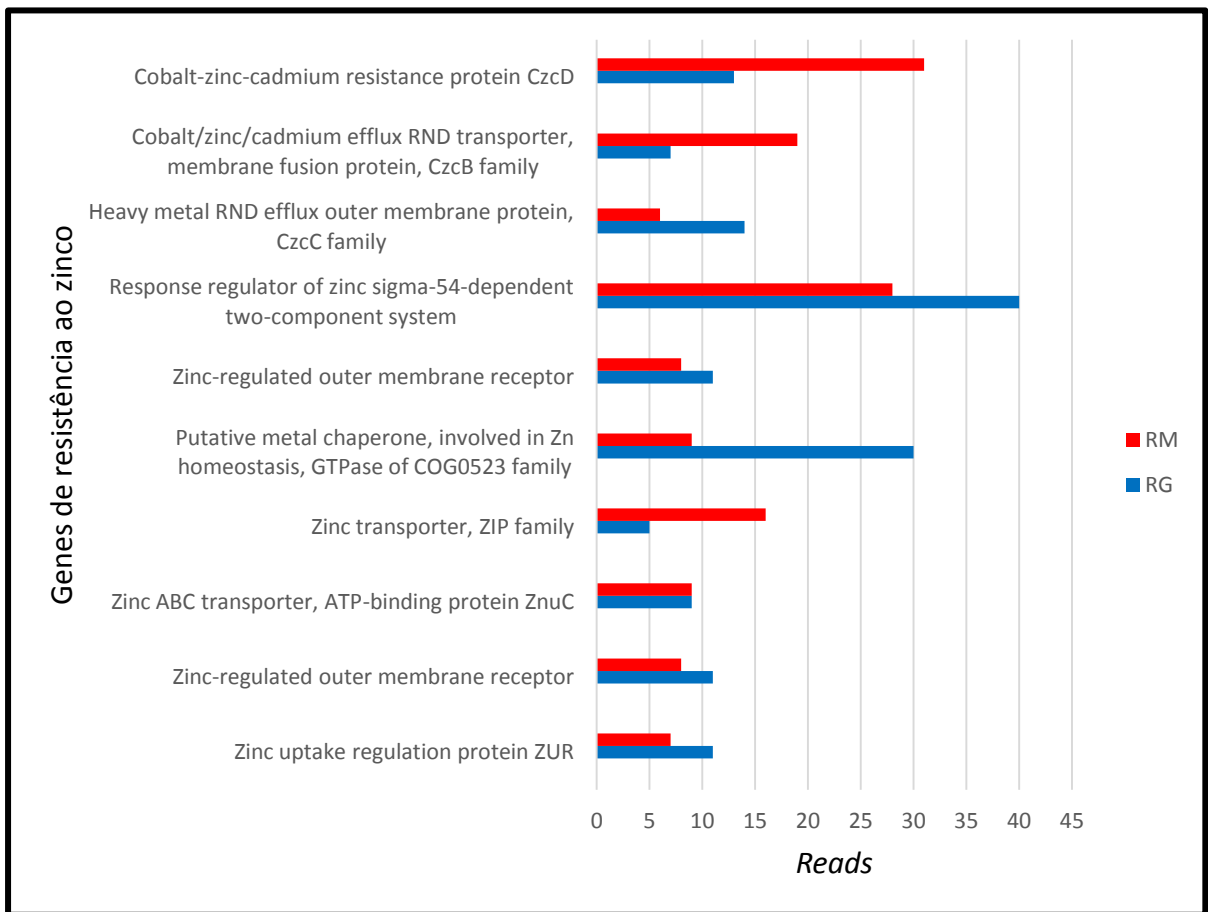


Figure 4.

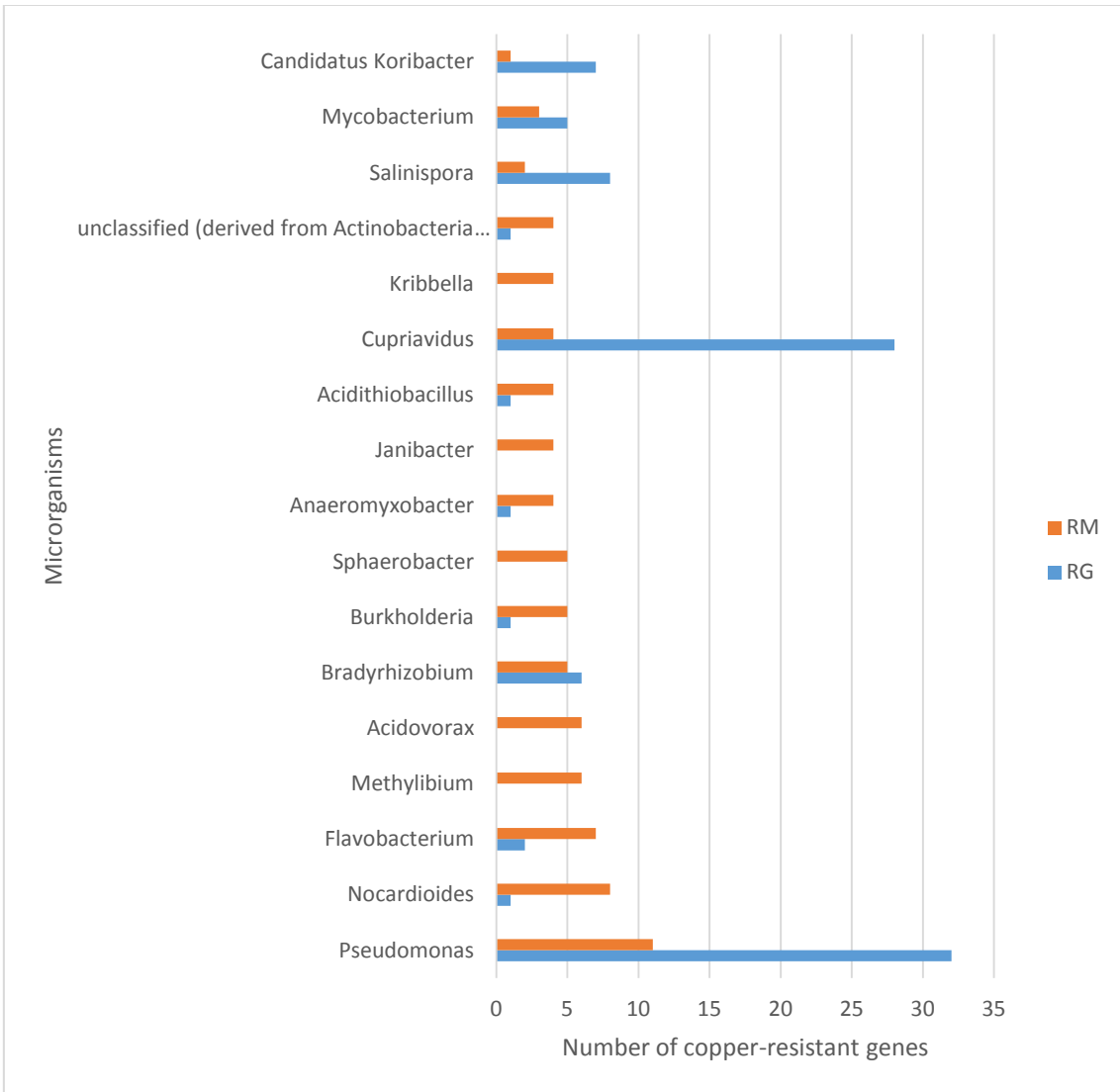


Figure 5.

Figure 6.

