UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CAMILA GRACYELLE DE CARVALHO LEMES

DIVERSIDADE METAGENÔMICA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE CAVERNAS DE CANGA DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO

OURO PRETO

MINAS GERAIS – BRASIL

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CAMILA GRACYELLE DE CARVALHO LEMES

DIVERSIDADE METAGENÔMICA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE CAVERNAS DE CANGA DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Ouro Preto, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Área de Concentração: Genômica e Proteômica.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Marcio Moreira

OURO PRETO

MINAS GERAIS – BRASIL

2018

L551d Lemes, Camila Gracyelle de Carvalho.
Diversidade metagenômica e potencial biotecnológico de cavernas de canga do Quadrilátero Ferrífero [manuscrito] / Camila Gracyelle de Carvalho Lemes. - 2018.
XIII, 86f.:

Orientador: Prof. Dr. Leandro Marcio Moreira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.
Área de Concentração: Genômica e Proteômica.

1. Genômica. 2. Afloramentos ferruginosos. 3. Biotecnologia . 4. Microrganismos. I. Moreira, Leandro Marcio . II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Titulo.

CDU: 575.111:579

Catalogação: www.sisbin.ufop.br

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

UFOP

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 05 dias do mês de março do ano de 2018, às 13:30 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Camila Gracyelle de Carvalho Lemes, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Leandro Marcio Moreira (Presidente - UFOP), pelo Prof. Andre Augusto Rodrigues Salgado (Membro - Externo), pela Profa. Silvana de Queiroz Silva (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda Camila Gracyelle de Carvalho Lemes 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Diversidade Metagenômica e Potencial Biotecnológico de Cavernas de Canga do Quadrilátero Ferrífero", na área de concentração: Genômica e Proteômica. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro, Prof. Andre Augusto Rodrigues Salgado; segundo, Profa. Silvana de Queiroz Silva; terceiro, Prof. Leandro Marcio Moreira. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 05 de março de 2018.

Presidente: _____

Membro: AAR Salgado

Membro: Silvana Q Silva

Mestrando: Camila G. C. Lemes

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser bom e misericordioso comigo ao longo desta caminhada, que apesar de muitas vezes ter se tornado desgastante, não consigo deixar de ser grata ao pensar nos fatores e nas pessoas que proporcionaram fechar este ciclo.

Aos meus pais, Marta Carvalho e Afonso Lemes, e a toda minha família por comprarem os meus sonhos, e fazer o possível para que eles se tornem realidade, mesmo com todas as adversidades e minha ausência em momentos importantes.

Ao meu querido, Carlos Freitas, por sempre estar ao meu lado, ser um ouvinte fiel de minhas dúvidas e inquietações, ser meu maior incentivador e apoiar meus objetivos. A sua compreensão e parceria, desde que passamos a caminhar juntos, foram imprescindíveis para que eu esteja concretizando esta etapa tão importante.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leandro Moreira, pela oportunidade e confiança, por me acolher no LabGiba, pela paciência quase infinita em explicar, por tantos ensinamentos de vida acadêmica e pessoal e por ser um profissional honesto que almeja a construção de uma sociedade mais justa que inspira. Me sinto privilegiada em ter como mentor um professor que desenvolve sua função com tamanha qualidade.

Ao time do LabGiba, em especial Dra. Érica Felestrino, pela amizade, por toda paciência, disponibilidade em ajudar, pelos incentivos e contribuições pertinentes neste trabalho; a Morghana Villa, que me acolheu e auxiliou na base para realização do nosso projeto, além de ter sido uma excelente companhia nos finais de semana no lab; aos Ma. Isabella Cordeiro, Ma. Renata Assis, Natasha Fonseca, Dra. Angélica Sanchez, Izadora Tabuso, Tainá de Paula e Me. Washington Caneschi por todo apoio incondicional que foi muito além de experimentos. À amizade de Maria Isabella S. Petra por ter sido fundamental neste processo, sempre me incentivando e apoiando.

As amizades do Lab DNA Repair, em especial, Camila Guerra, um presente que recebi para trazer serenidade e clareza aos meus dias, Josielda Gomes, Edna Gonçalves e Lorrana Cachuíte, por sempre se disponibilizarem auxiliar e oferecerem palavras de incentivo e carinho em momentos que se faziam necessários. A Prof. Dra Camila Carrião pelos esclarecimentos e aprendizado.

A técnica do Laboratório Multiusuário de Genômica, Dra. Luiza Perucci, pela amizade, pelo auxílio imprescindível neste trabalho e por ser um modelo de profissional que é um dos meus exemplos.

Aos integrantes do LBM - UNESP – Câmpus Jaboticabal, em especial, Dra. Flávia Carvalho e Dr. Juan Cepeda, bem como o Prof. Dr. Jesus Ferro, por me receber e me oferecer as melhores condições de trabalho.

Ao Instituto Pristino, em particular, Dr. Flávio Carmo e Dra. Luciana Kamino por auxiliar em atividades deste projeto e prestar diversos esclarecimentos.

Ao grupo SETULAB e ao Laboratório de Bioinformática – USP, pelo auxílio nas análises de bioinformática, em particular, Prof. Dr. João Carlos Setubal e Suzana Guima.

A equipe do LBBM - UFOP, por permitir que parte deste trabalho tenha sido realizado com sua infraestrutura e em especial, Ma. France Anne Dias, Ma. Pollyana Queiroz, Dra. Natália Barbosa e Dr. Victor Oliveira, por compartilhar suas experiências acadêmicas e por tornar esta trajetória mais leve.

A banca examinadora pelo aceite de convite e pelas preciosas contribuições que certamente serão esclarecedoras.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, bem como todos os docentes que acrescentam na minha formação e ao secretário Me. Josino Barbosa que desenvolve seu trabalho com maestria se tornando essencial neste processo.

As amizades de Goiás, que apesar de não estarem presente, foram essenciais me incentivando, apoiando e compreendendo a minha ausência sempre.

As meninas com quem compartilhei a mesma casa em Ouro Preto, Pamela Moraes, Jéssica Azevedo e Nara Macedo pelo apoio e estímulos no dia-a-dia.

A UFOP pelo ensino de qualidade, a CAPES e a FAPEMIG pelo financiamento que tornou este projeto executável.

“É que tem mais chão nos meus olhos
do que cansaço nas minhas pernas,
mais esperança nos meus passos
do que tristeza nos meus ombros,
mais estrada no meu coração
do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS VII

LISTA DE TABELAS X

LISTA DE QUADROS X

LISTA DE ABREVIATURAS XI

RESUMO XII

ABSTRACT XIII

1. INTRODUÇÃO 14

1.1. O Quadrilátero Ferrífero e as cavernas de canga 14

1.2. A importância da microbiota num contexto ecológico 17

1.3. A importância da microbiota numa perspectiva biotecnológica 18

1.4. Metagenômica 20

1.5. Metagenômica em cavernas: uma visão geral 22

2. OBJETIVOS 24

2.1. Objetivo geral 24

2.2. Objetivos específicos 24

3. MATERIAL E METÓDOS 25

3.1. Locais de coleta 25

3.2. Extração de DNA 26

3.3. Quantificação de DNA 26

3.4. Amplificação parcial do gene DNAr 16S e purificação do produto de PCR 27

3.5. Sequenciamento usando plataforma Ion Torrent® 28

3.6. Análises dos dados por ferramentas de bioinformática 29

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 31

4.1. Coleta das amostras 31

4.2. Qualidade do DNA total das amostras 32

4.3. Dados brutos fornecidos do relatório do software Ion reporter 34

4.4. Determinação de α-diversidade 37

4.5. Determinação de β-diversidade 38

4.6. Análise da estrutura e da comunidade bacteriana entre cavernas 46

4.7. Diversidade biológica entre a caverna de quartzito e as cavernas de canga 50

4.8. Análise da diversidade específica entre piso e teto das cavernas 55

4.9. Diversidade das cavernas da Chapada de canga: um reservatório microbiológico a ser preservado 56

4.10. Comparação entre os estratos de coleta na Caverna 2, em Mariana 64

CONCLUSÕES 67

PERSPECTIVAS 68

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O MESTRADO 69

REFERÊNCIAS 73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização geográfica do Quadrilátero Ferrífero em MG, Brasil. Imagem obtida por meio do Atlas Digital Geoambiental (http://www.institutopristino.org.br/atlas). 14

Figura 2. Perfil morfológico das entradas de uma das cavernas de canga. Foto: Flávio Fonseca do Carmo. 16

Figura 3. Regiões conservadas e hipervariáveis no gene 16S. As regiões conservadas (C1 -C9) estão representadas em azul e as regiões hipervariáveis são apresentadas em amarelo (V1-V9). É demonstrado um exemplo de oligonucleotídeo com barcode para a amplificação da região V4-V5, usando para isso os oligonucleotídeos F (senso) e R (antisenso). Note que o oligonucleotídeo F é composto de três estruturas fundamentais, um adaptador, a sequência que codifica para o código de barras e o oligo universal de anelamento. Fonte: Adaptado de Del Chierico *et al.* (2015). 21

Figura 4. Localização no QF das cavernas onde foram realizadas as coletas. Três cavernas localizadas na Chapada de Canga, Mariana- MG, Brasil. Imagem obtida por meio do Atlas Digital Geoambiental (http://www.institutopristino.org.br/atlas). 26

Figura 5. Esquematização das etapas adotadas no *pipeline* para análise da região V4-V5 do gene 16S, adaptado do BMP. 29

Figura 6. Demonstração visual do DNA após a extração. 33

Figura 7. Demonstração visual do DNA após as etapas de amplificação. 33

Figura 8. Demonstração visual do DNA amplificado e purificado. 33

Figura 9. Relatório da corrida do sequenciamento obtido do Software Ion Reporter. Mais de 6 milhões de *reads* filtrados e usáveis foram obtidos da corrida do Ion Torrent®. Nesta visualização esquemática, a porcentagem de carregamento atingiu 76% da capacidade do chip, obtendo um rendimento final de 1,13 G. Abaixo, é demonstrado que os *reads* apresentam distribuição bimodal, um conjunto em torno de 100 a 150 pb e outro conjunto de *reads* de 400-450 pb. 34

Figura 10. Curva de rarefação representando a estimativa de riqueza de OTUs entre as cavernas de canga e controle. 37

Figura 11. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando a distância métrica não ponderada para as cavernas. Em destaque, no círculo azul as amostras da caverna controle, no círculo verde amostra 12, teto da caverna 3 (Mariana 3) e no círculo vermelho amostra 27, piso da caverna 8 (Serra da Moeda) 41

Figura 12. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando a distância métrica não ponderada para as origens das amostras coletadas. Em destaque dentro do círculo azul, amostras da caverna controle, dentro do círculo vermelho a amostra 27, piso pertencente a caverna 8(Serra da Moeda) e dentro do círculo verde a amostra 12, teto da caverna 3 (Mariana 3). 42

Figura 13. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando a distância métrica ponderada para as origens das amostras coletadas (piso ou teto). Em destaque dentro do círculo azul, as amostras controle, em vermelho a amostra 27 da caverna 8(Serra da Moeda), em verde a amostra 12 da caverna 3 (Mariana 3) e em roxo a amostra 24 da caverna 6 (Lavras Novas). 44

Figura 14. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando a distância métrica ponderada para as cavernas. Em destaque dentro do círculo azul, as amostras controle, no círculo vermelho a amostra 27 da caverna 8(Serra da Moeda), no círculo verde a amostra 12, teto da caverna 3 (Mariana 3) e no círculo roxo amostra 24, teto da caverna 6 (Lavras Novas). 45

Figura 15. Diversidade microbiana em nível de filos entre as amostras de cavernas de canga e controle (C7). Os colchetes na cor preta representam o solo, na cor laranja são tetos e na cor azul representa um espeleotema. 46

Figura 16. Análise comparativa em nível de gênero entre a caverna 1 (Mariana 1) e a caverna 7 (controle). Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software STAMP. 51

Figura 17. Análise comparativa em nível de gênero entre a caverna 2 e a caverna 7 (controle). Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software STAMP. 52

Figura 18. Análise comparativa em nível de gênero entre a caverna 7(controle) e caverna 3. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software STAMP. 53

Figura 19. Análise comparativa em nível de gênero entre a caverna 7(controle) e caverna 5. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software STAMP. 53

Figura 20. Análise comparativa em nível de gênero entre a caverna 7(controle) e caverna 6. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software STAMP. 54

Figura 21. Análise comparativa em nível de gênero entre a caverna 7(controle) e caverna 8. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software STAMP. 54

Figura 22.Análise comparativa em nível de gênero entre solo (piso) e teto. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software STAMP. 55

Figura 23. Localização da Chapada de Canga. (A) Relação entre localização e contexto ambiental da Chapada de Canga. O retângulo branco destaca a região onde se localiza a chapada. No seu interior, a região demarcada por um retângulo pontilhado em amarelo destaca os pontos onde se localizam as cavernas amostradas neste estudo e detalhadas em B. Os números em vermelhos identificam: 1 – Serra do Caraça; 2 – Complexos minerários de extração da empresa Samarco™ e Vale™; 3 – Complexo minerário da empresa Vale™; 4 – Barragem de rejeitos de Germano; 5 – Barragem de rejeitos de Fundão (recentemente rompida); 6 – Campo de extração de minérios da empresa Vale™ Mina Timbopeba; 7 – Distrito de Bento Rodrigues. (C e D) Destacam as respectivas áreas degradadas assinaladas em A. Fonte: Villa *et al.* (2017). 56

Figura 24. Capa do Livro Chapada de Canga: Patrimônio natural e cultural de relevante interesse para a conservação. Nosso grupo de pesquisa contribuiu escrevendo um capítulo para este livro, intitulado "Microbiota associada à Chapada de Canga: patrimônio genético mineiro com potencial negligenciado", em que apresentamos resultados dessas três cavernas de isolados bacterianos que possuem capacidade de resistir a formas de arsênio, um metaloide pesado, muito presente nos solos e rios da região. 57

Figura 25. Diagrama de Venn representando as três cavernas da Chapada de canga, em Mariana. As amostras de piso/solo e teto demonstram diferenças de abundância e de diversidade entre as cavernas. 59

Figura 26. Diagrama de Venn dos diferentes pontos de coleta caverna 2, localizada na Chapada de canga, em Mariana. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos (em verde) ligados ao barcode (em roxo) e adaptador (em azul) utilizados neste trabalho. 27

Tabela 2. Total de reads gerados por amostra após o sequenciamento parcial do gene 16S no PGM. 36

Tabela 3. Maiores abundâncias relativas em nível de gênero nas cavernas. 48

Tabela 4. OTUs classificadas nos pisos das cavernas de canga, em Mariana. 60

Tabela 5. OTUs classificadas nos tetos cavernas de canga, em Mariana. 62

Tabela 6. OTUs classificadas no piso(solo), teto e espeleotema na caverna 2, na chapada de canga, em Mariana. 65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Alguns dos trabalhos relatando estudos de metagenômica em cavernas.....21

Quadro 2. Localização dos pontos de coleta.....24

Quadro 3. Localização e identificação das amostras.....30

LISTA DE ABREVIATURAS

µL– Microlitro

ACC – Amiciclopropano1- carboxilato

BPCV – Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal

CNC – Cadastro Nacional de Cavernas

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EUA- Estados Unidos da América

Km – quilômetro

$MgCl_2$ – Cloreto de Magnésio

mL – mililitro

mm – milímetro

mM - miliMol

NGS – Sequenciamento de Nova Geração

nm – nanômetro

OTU- *Operational Taxonomic Units*

pb – pares de bases

PCoA- *Principal Coordinates Analysis*

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PGM - Personal Genome Machine

QF – Quadrilátero Ferrífero

QIIME - *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*

DNAr – DNA ribossomal

RNA – Ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossomal

Stamp- *Statistical Analyses of Metagenomic Profiles*

TBE – Tris-borato-EDTA

UV – Ultravioleta

RESUMO

O Quadrilátero Ferrífero (QF) possui alta concentração de minérios em seu solo, o que tem propiciado um elevado extrativismo que se contrapõe à sua importância biológica. Nesta área, cavernas de cangas apresentam-se como ambientes com características geomorfológicas únicas. Poucas destas cavernas foram catalogadas e um número ainda mais reduzido foi incorporado em estudos biológicos, o que torna esse geossistema ferruginoso um ambiente altamente propício para novas descobertas de cunho microbiológico e biotecnológico. O objetivo deste trabalho foi investigar a diversidade bacteriana e o potencial biotecnológico em cavernas de canga associadas a afloramentos ferruginosos por metagenômica DNAr 16S. Para isso, foram coletadas amostras do piso e do teto de 7 cavernas de canga e 1 caverna de quartzito (controle) na região do QF, em condições estéreis. O DNA total foi extraído e a região V4-V5 da subunidade ribossomal 16S foi sequenciada usando plataforma PGM™. Um total de 6 milhões de leituras foram identificadas. Análise de α-diversidade revelou que as cavernas de canga apresentam maior riqueza em relação à caverna controle. Análise de β-diversidade demonstrou que as cavernas de canga e a de quartzito apresentam classificações filogenéticas distantes, ainda mais quando os estratos piso e teto foram avaliados independentemente. Esta diversidade ficou evidenciada em nível de gênero, muitos dos quais já descritos na literatura como sendo potenciais organismos de interesse biotecnológico, por exemplo *Actinoallomurus*, *Cystobacter* e outros. Uma análise mais aprofundada de três das cavernas selecionadas, todas inseridas na região da Chapada de canga no município de Mariana, mostrou que apesar de geograficamente estarem muito próximas, apresentam riqueza e diversidade significativamente diferentes entre si. Estes resultados colocam em destaque pela primeira vez um patrimônio genético mineiro ainda desconhecido em estudos biológicos e evidenciam a necessidade de incorporação desta área em programas de conservação, ainda mais por estar sobre iminente pressão pela ação antrópica.

Palavras-chave: Afloramentos ferruginosos, biotecnologia, cavidades naturais, microrganismos.

ABSTRACT

The Iron Quadrangle (IQ) has a high concentration of ores in its soil, which has led to high extractivism activity that contrasts with its biological importance. In this area, canga caves present themselves as environments with unique geomorphological characteristics. Few of these caves have been cataloged and an even smaller number have been incorporated into biological studies, which makes this ferruginous geosystem a highly conducive environment for new microbiological and biotechnological discoveries. The objective of this work was to investigate the bacterial diversity and biotechnological potential of canga caves associated to ferruginous outcrops by metagenomic 16S rDNA. For this, samples of floor and ceiling of 7 canga caves and 1 quartzite cave (control) were collected in the QF region under sterile conditions. Total DNA was extracted and the V4-V5 region of the 16S ribosomal subunit was sequenced using PGM ™ platform. A total of 6 million reads were identified. Analysis of α-diversity revealed that the caves of canga present greater wealth in relation to the control cave. β-diversity analysis showed that canga and quartzite caves present distant phylogenetic classifications, especially when the floor and ceiling strata were independently evaluated. This diversity was evidenced at the genus level, many of which have already been described in the literature as potential organisms of biotechnological interest, for example *Actinoallomurus*, *Cystobacter* and others. A more in-depth analysis of three of the selected caves, all inserted in the Chapada of Canga region in the municipality of Mariana, showed that although geographically they are very close, they present significantly different richness and diversity among them. These results highlight for the first time a genetic patrimony of Minas Gerais that is still unknown in biological studies and evidences the need to incorporate this area into conservation programs, even more because it is about imminent pressure by anthropic action.

Keywords: Ferruginous outcrops, biotechnology, natural cavities, microorganisms.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Quadrilátero Ferrífero e as cavernas de canga

O Quadrilátero Ferrífero (QF) localiza-se na região Centro-Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil, e corresponde uma área de aproximadamente 7.200 km^2 (DORR, 1969)(Figura 1). Encontra-se inserido em uma área compartilhada por dois *hotspots* da biodiversidade brasileira, o Cerrado e a Mata Atlântica (MYERS *et al.*, 2000), ou seja são áreas que abrigam uma enorme diversidade com espécies endêmicas, mas em contrapartida estão entre as áreas mais devastadas do mundo (MITTERMEIER *et al.*, 1999), sendo considerado a principal unidade ferrífera do país devido a sua riqueza mineral (CARMO e KAMINO, 2015).

Esta região é circundada por importantes serras: ao norte pelo alinhamento da Serra do Curral, a sul pelas serras de Ouro Branco e Itatiaia, a oeste pela Serra da Moeda e a leste pela Serra do Caraça e pelo início da Serra do Espinhaço (DORR, 1969).

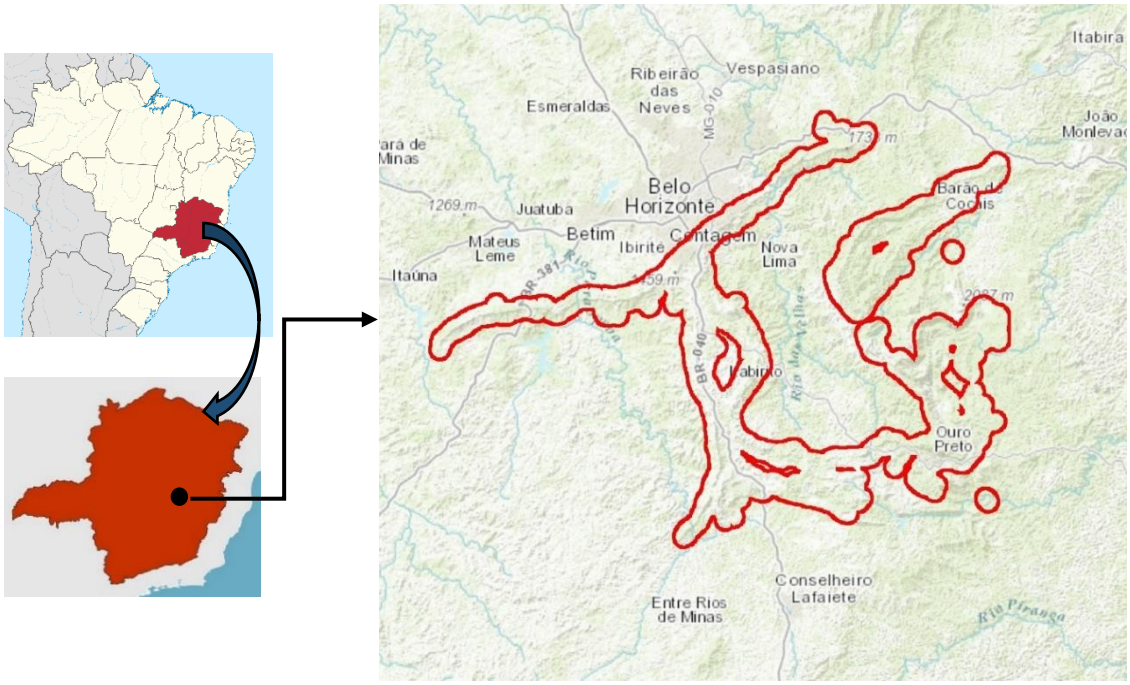

Figura 1. Localização geográfica do Quadrilátero Ferrífero em MG, Brasil. Imagem obtida por meio do Atlas Digital Geoambiental (http://www.institutopristino.org.br/atlas).

De acordo com Carmo e Jacobi (2013), este local é composto por uma vegetação diversificada, sendo uma localidade que apresenta espécies endêmicas e ameaçadas (DRUMMOND *et al.*, 2005). Por outro lado, a paisagem que prevalece é considerada umas das mais singulares do país (DORR, 1969). Fatores como a distribuição restrita e a associação aos principais depósitos de ferro do país são determinantes para a estruturação da denominada canga, um geossistema associado aos afloramentos ferruginosos que está entre os menos conhecidos e mais ameaçados do país (JACOBI e CARMO, 2008).

Além disso, outra característica em destaque do QF é a quantidade significativa de cavernas ou cavidades naturais subterrâneas cadastradas e outras tantas ainda desconhecidas. Estas se destacam no Estado de Minas Gerais, que abriga o maior número de cavernas catalogadas no País, cerca de 2.043 (30,7%), segundo o senso de 2018 (CNC, 2018). Ao contrário da maioria das cavernas, que são carbonáticas (67%) (CNC, 2018), em 2014 foram cadastradas 739 ocorrências de Minas Gerais de cavernas ferruginosas, subindo para 22% a participação total no Estado (PILÓ *et al.*, 2015). Estima-se que cerca de 20% das cavernas com formações ferríferas e de canga são representantes do total de cavernas oficialmente cadastradas no país (PILÓ e AULER, 2009).

Estas cavernas, em geral, apresentam pequenas dimensões, que raramente ultrapassam 100 m de projeção horizontal (TIMO e TIMO, 2016) e são caracterizadas por possuírem entradas de pequenos diâmetros, e quase sempre estão localizadas nas bordas da canga, isso decorrente de processos erosivos (Figura 2). Uma minoria, no entanto, são oriundas de pequenas aberturas verticais causadas por um colapso do manto da canga (SIMMONS, 1963). Associadas a estas peculiaridades, outras propriedades foram descritas como área totalmente desprovida de luz (zonas afóticas) e tendência à estabilidade das condições ambientais, tais como temperatura e umidade, proporcionando um ambiente seletivo para a vida (CULVER, 1982).

Figura 2. Perfil morfológico das entradas de uma das cavernas de canga. Foto: Flávio Fonseca do Carmo.

Outra característica que as cavernas podem possuir são os espeleotemas, os quais são definidos como depósitos minerais secundários que se formam em resposta a processos físicos e químicos específicos, sendo que podem se originar pelos processos de circulação e exsudação de águas ou origem biológica, exemplos típicos são cortinas, estalactites, estalagmites e colunas, dentre outras formações (GONÇALVES e SOUSA, 2011).

A partir dos anos 2000 surgiram os primeiros trabalhos que colocaram em evidência as cavernas de canga no QF (AULER e PILÓ, 2005; AULER, 2006). Posteriormente, surgiram estudos relacionados a bioespeleologia nestas cavernas, com destaque para os trabalhos de Ferreira (2005) e Souza-Silva (2008). Neste primeiro trabalho foram descritas aproximadamente 30 cavidades nas áreas da Serra de Capão Xavier, Rola Moça e Serra da Moeda, demonstrando a existência de espécies troglomórficas. Estes organismos são restritos ao ambiente subterrâneo e podem apresentar características específicas, provavelmente devido a respostas de pressão seletivas destes ambientes, como ausência de pigmentação e olhos (HOLSINGER e CULVER, 1988). Já no manuscrito de Souza-Silva (2008), é descrito que foi verificado que cavernas de canga da Mata Atlântica apresentam, em geral, elevada diversidade, espécies endêmicas e valores baixos de similaridade de invertebrados.

Apesar destes avanços no conhecimento científico inerente a cavernas de canga, ainda são restritos, para não dizer ausentes, os trabalhos que descrevem alguma relação da microbiota encontrada nestes ambientes. Um dos poucos estudos na área, demonstrou que bactérias capazes de reduzir ferro podem ter importante papel no processo de dissolução do minério de ferro e, portanto, na formação das cavernas ferruginosas (PARKER *et al.*, 2013). Desta forma, esse geossistema ferruginoso único proporciona um ambiente peculiar altamente propício para novas descobertas de cunho microbiológico e aplicado numa perspectiva biotecnológica.

1.2. A importância da microbiota num contexto ecológico

Estima-se que pelo menos um terço da biomassa do planeta seja composta por uma extensa diversidade de microrganismos, distribuídos em praticamente todos os ecossistemas (WHITMAN *et al.*, 1998; TORSVIK e OVREAS, 2002). Quando no solo estes organismos desenvolvem importantes funções envolvendo processos bioquímicos que controlam as transformações dos elementos químicos e das transferências de energias e nutrientes no sistema solo-planta-atmosfera, o que constitui a base da sustentação e produtividade dos ambientes terrestres (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

As bactérias do solo atuam na ciclagem de nutrientes e minerais interconectados em escala global, sendo que este ambiente apresenta um conjunto de genes bioquimicamente ativos que são fundamentais aos ciclos biogeoquímicos que sustentam a biosfera (TREVORS, 2010). Essa comunidade também influencia a disponibilidade de nutrientes para as plantas por processos de solubilização, quelação e oxidação/redução e ainda podem influenciar na absorção de nutrientes e no crescimento das plantas pela liberação de substâncias que estimulam ou inibem que alteram a fisiologia e arquitetura da raiz (RINCON-FLOREZ *et al.*, 2013). Estas e outras propriedades colocam estes organismos em evidencia como potenciais agentes promotores de crescimento vegetal.

Além disso, existe uma variação de espécies, nicho e de influência em ambientes diferentes entre as comunidades, sendo que estes organismos sociais que interagem intraespécies e interespécies, são capazes de responder a estímulos externos do ambiente, podendo refletir até no genoma do procarioto (STUBBENDIECK *et al.*, 2016).

Para além disso, cada ambiente associado a fatores bióticos e abióticos, pode influenciar na comunidade microbiana, fornecendo um hábitat/nicho específico, portanto

torna-se fundamental o conhecimento da microbiota que o compõe e, assim, fornecer subsídio para novos estudos, como por exemplo, na identificação de microrganismos com interesse na área biotecnológica. Todas estas características colocam em evidência a importância dos estudos associados a microbiota nas cavernas de canga, um ambiente ainda desconhecido em estudos microbiológicos e moleculares, mas que pelo contexto geofísico pode se apresentar como um importante reservatório de microbiota com função biológica específica.

1.3. A importância da microbiota numa perspectiva biotecnológica

Na biotecnologia, por exemplo, a diversidade e o potencial bioquímico dos microrganismos é essencial como fonte de vários produtos com aplicações em praticamente todos os setores industriais. Os produtos microbianos são usados, por exemplo, como antibióticos, agentes tumorais e imunossupressores em indústrias farmacêuticas e como biopesticidas, agentes antiparasitas, e até mesmo como agentes de processamento alimentício no setor da agricultura (DEMAIN e ADRIO, 2008).

Muitas bactérias possuem a capacidade de facilitar o crescimento e o desenvolvimento de plantas sendo chamadas de Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV)(GLICK, 2012), as quais podem ser classificadas como biocontroladoras, biorremediadoras ou biofertilizantes (CALVO *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2015). Os mecanismos pelos quais as BPCV auxiliam as plantas envolvem a disponibilidade de nutrientes provenientes de processos genéticos e podem ser diretos, quando resulta na promoção direta do crescimento vegetal ou indiretos, quando o mecanismo inibe um ou mais patógenos da planta sendo fungo ou bactéria (GLICK, 1995; OLANREWAJU *et al.*, 2017). São exemplos de mecanismos diretos o auxílio na fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, modulação da expressão da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, produção de fitohormônios, produção de sideróforos, entre outros (SOUZA *et al.*, 2015). As melhorias no crescimento de plantas decorrentes das BPCV estão em destaque no mercado de bioinoculantes e já apresentam taxa de crescimento de 10% por ano (OWEN *et al.*, 2014).

Na indústria farmacêutica, a diversidade microbiana, também ganha destaque, isso devido ao crescente número de infecções bacterianas resistentes a antibióticos amplamente utilizados para a maioria das patologias (CLARDY *et al.*, 2006). Os produtos

microbianos são testados praticamente diariamente para serem utilizados como antibióticos. Apesar de que 99% de todas as espécies em ambientes externos não serem cultiváveis em condições laboratoriais, ainda assim são promissoras fontes de novos antibióticos e compostos benéficos (KAEBERLEIN *et al.*, 2002; JI *et al.*, 2009).

Uma das formas utilizadas para isso é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), técnica conhecida para isolamento independente de cultura de genes resistentes a antibióticos de amostras ambientais (ALI *et al.*, 2014; POURNAJAF *et al.*, 2014; SEEDY *et al.*, 2017), porém a desvantagem da PCR, que acessa somente genes que são semelhantes a sequências conhecidas e pode não recuperar genes completos. Outra forma, menos convencional, é a utilização de um dispositivo multicanal, chamado de iChip (NICHOLS *et al.*, 2010), para isolar e crescer bactérias não cultiváveis, em que a amostra de solo é diluída de modo que aproximadamente uma célula bacteriana é levada a um determinado canal, em seguida o dispositivo é coberto com duas membranas semi-permeáveis e colocado de volta ao solo e assim, fatores como a difusão de nutrientes e crescimento através das câmaras permite o crescimento de bactérias não cultiváveis em seu ambiente natural (LING *et al.*, 2015).

Não menos importante, os microrganismos são uma das maiores fontes e mais úteis de muitas enzimas (DEMAIN e ADRIO, 2008). Parte do grupo das enzimas microbianas são conhecidas por desempenhar funções de catalisadores metabólicos, sendo utilizadas em vários setores do mercado e com diversas aplicações. As investigações por novas enzimas em ambientes incomuns é uma alternativa em destaque que leva ao desenvolvimento de programas de triagem de alto rendimento. Isso é devido às novas características físicas e fisiológicas dessas enzimas, pois fatores como alta produtividade, especificidade, estabilidade a temperaturas extremas, pH ou outras condições fisiológicas, além do baixo custo de produção e tolerância a inaladores tornam-se atrativos por seus atributos para diversos setores do comércio (PRAKASH *et al.*, 2013).

Na literatura a diversidade bacteriana bem como a análise do potencial biotecnológico destas bactérias já foi descrito em litologias diferentes das cavernas de canga, como cavernas carbonáticas (ORTIZ *et al.*, 2014; AXENOV-GRIBANOV *et al.*, 2016) e quartzíticas (BARTON *et al.*, 2014). Uma parte destes estudos foram realizados com métodos dependentes de cultura, o que proporciona o descobrimento de apenas um

reduzido percentual (cerca de 1%) dos microrganismos totais da amostra (AMANN *et al.*, 1995; TORSVIK e OVREAS, 2002).

Apesar da importância de trabalhos que utilizam organismos cultiváveis, e considerando que estima-se que cerca de 1 trilhão (10^{11} a 10^{12}) de espécies bacterianas habitam o planeta Terra (LOCEY e LENNON, 2016), com o surgimento de novas tecnologias de sequenciamento de DNA, como o Sequenciamento de Nova Geração (NGS), o conhecimento a respeito da diversidade de microrganismos presentes em ambientes, principalmente aqueles considerados distintos em vários aspectos (GRAY e ENGEL, 2013; TETU *et al.*, 2013; ORTIZ *et al.*, 2014). Apesar de estarem sendo utilizados em diferentes contextos, ambientes que apresentarem características distintas e peculiares, por exemplo as cavernas de canga que apresentam propriedades singulares, são consideradas de alta probabilidade para descobertas de microrganismos de interesse biológico e que possam apresentar algum potencial biotecnológico.

1.4. Metagenômica

A dificuldade de isolar microrganismos em condições laboratoriais, levou aos cientistas criarem técnicas e abordagens que não dependessem de métodos de cultivo. Uma das técnicas mais promissoras é baseada no NGS utilizada sob vários contextos e com diferentes propósitos. A metagenômica, conceituada por Handelsman *et al.* (1998) foi um destes usos potenciais. Baseia-se em obter informações sobre as sequências de DNA e potenciais funções de genomas microbianos coletivos, contidos em uma amostra de um determinado ambiente.

Essa abordagem foi desenvolvida com o objetivo de auxiliar as técnicas de microbiologia clássica a compreender a diversidade de microrganismos (mais próximo do completo), uma vez que há evidências claras de que parte destes organismos não são cultiváveis em laboratório (HANDELSMAN, 2004), permitindo assim a análise da composição de genomas de organismos cultiváveis e não-cultiváveis. Em paralelo a isso, a redução rápida e substancial dos custos de tecnologias NGS, tem acelerado o desenvolvimento da metagenômica (THOMAS *et al.*, 2012). Além disso, após ser isolado diretamente das amostras ambientais, o DNA pode ser selecionado e clonado para clones que expressam, por exemplo, resistência a antibióticos (RIESENFELD *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2012; DEVIRGILIIS *et al.*, 2014; MULLANY, 2014).

Atualmente, são utilizadas duas principais abordagens envolvendo a metagenômica:

i) Metagenômica *shotgun*, após o DNA total ser extraído de uma comunidade microbiana e sequenciado, as análises fazendo uso de ferramentas de bioinformática são realizadas para identificar os genes e suas respectivas funções. Não há um *locus* gênico específico para amplificação, todo DNA é fragmentado e os fragmentos são independentemente sequenciados. Desta forma, os dados gerados fornecem subsídio para a pergunta: O que os microrganismos são capazes de fazer? (SHARPTON, 2014).

ii) Metagenômica *tag*, em que permite focar em sequências específicas conservadas uniformemente. O exemplo mais comumente usado deste modelo de estudos metagenômicos é o baseado em análise total ou parcial da sequência do DNAr (DNA ribossomal) 16S. A partir do sequenciamento parcial do gene DNAr 16S é possível desvendar o potencial taxonômico e qual abundância relativa presente em qualquer amostra ambiental (PACE *et al.*, 1986), sem necessidade de representantes cultivados. Os dados desta abordagem são suficientes para responder à pergunta: Quem está presente lá? (SHARPTON, 2014).

O uso frequente desse gene na metagenômica 16S, se deve a alguns fatores, como o tamanho dele (aproximadamente 1500pb) ser suficiente para conter informação relevante da sequência e ter 50 domínios funcionais (PATEL, 2001). Além disso, a presença de região conservada intercalada com nove regiões hipervariáveis permite que análises de cunho evolutivo possam ser inferidas (CHAKRAVORTY *et al.*, 2007) (Figura 3).

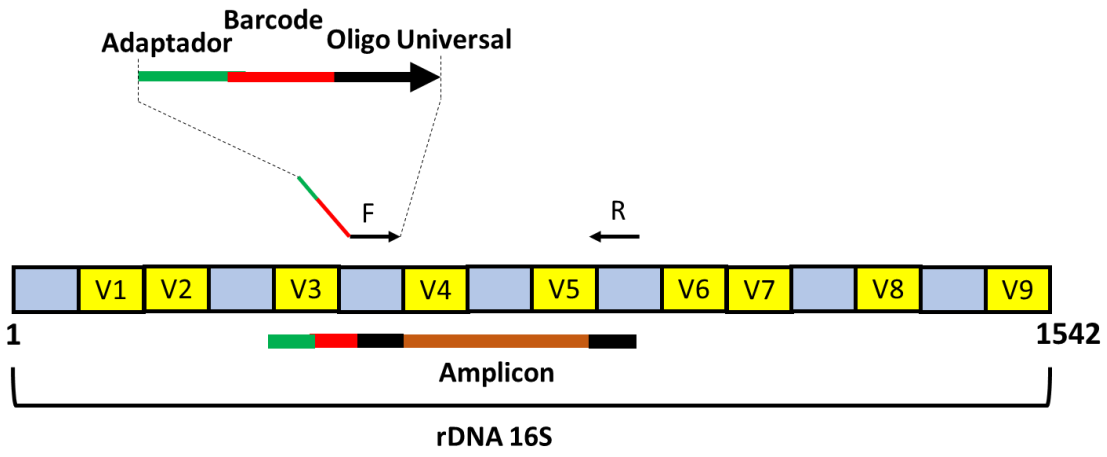

Figura 3. Regiões conservadas e hipervariáveis no gene 16S. As regiões conservadas (C1 -C9) estão representadas em azul e as regiões hipervariáveis são apresentadas em amarelo (V1-V9). É demonstrado

um exemplo de oligonucleotídeo com barcode para a amplificação da região V4-V5, usando para isso os oligonucleotídeos F (senso) e R (antisenso). Note que o oligonucleotídeo F é composto de três estruturas fundamentais, um adaptador, a sequência que codifica para o código de barras e o oligo universal de anelamento. Fonte: Adaptado de Del Chierico *et al*. (2015).

Trabalhos recentes utilizando a metagenômica com base no gene DNAr 16S como marcador filogenético identificaram procariotos não cultivados (DECUYPERE *et al.*, 2016; RAHMAN *et al.*, 2016; ABAYASEKARA *et al.*, 2017; RASIGRAF *et al.*, 2017) e podem ajudar a descobrir funções metabólicas, aumentando o conhecimento sobre filogenia e dinâmica dos processos microbianos da comunidade. A plataforma de sequenciamento e a escolha dos oligonucleotídeos podem interferir na acurácia nos resultados, o trabalho de Fouhy *et al.* (2016) demonstrou melhores resultados no PGM utilizando a região V4-V5 do gene 16S em bactérias.

1.5. Metagenômica em cavernas: uma visão geral

Embora ainda em fase de expansão, há trabalhos na literatura relatando as análises de microbioma de cavernas, a metagenômica está sendo utilizada para estes fins (BHULLAR *et al.*, 2012; TETU *et al.*, 2013; ORTIZ *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2015; RASIGRAF *et al.*, 2017), demonstrando ser uma ferramenta promissora, com resultados que apresentam uma característica em comum, a inovação.

No quadro 1, estão listados alguns artigos de metagenômica associados em cavernas disponíveis na literatura.

Quadro 1. Alguns dos trabalhos relatando estudos de metagenômica em cavernas.

Local	Objetivo	Ref
Villa Luz Caves, México	Identificar a comunidade bacteriana e verificar possíveis potencial biotecnológico	(D'AURIA *et al.*, 2018)
Ozark Caves, EUA	Testar locais para explorar a diversidade bacteriana e monitorar a biodiversidade a longo prazo.	(OLIVEIRA *et al.*, 2017)
Tjuv-Ante's cave, Suécia	Identificar a comunidade microbiana e inferir funções metabólicas do interior de um espeleotema	(ZEPEDA MENDOZA *et al.*, 2016)

Lechuguilla Cave, localizado no Carlsbad Caverns National Park, Novo México	Perfil de resistência a antibióticos em isolados de cavernas	(BHULLAR *et al.*, 2012)
Kartchner Caverns, uma caverna de carbonato localizada no semiárido do sudoeste do Arizona, EUA.	Perfis metabólicos de isolados bacterianos em cavernas ricas em carbonato	(ORTIZ *et al.*, 2014)
Cavernas de ursos que viveram no Pleistoceno	Composição de prováveis genomas mitocondriais ancestrais a partir de amostras encontradas em caverna	(NOONAN *et al.*, 2005)
Cavernas Nullarbor, Austrália	Comunidades bacterianas associadas com metabolismo de nitrogênio	(CHAU *et al.*, 2013; TETU *et al.*, 2013)

Como pode ser observado, o número destes estudos ainda é restrito e limitado a cavernas que apresentam peculiaridades geomorfológicas, de localização e etc. Na mesma perspectiva figuram-se as cavernas de canga do QF, que apesar da região apresentar um ecossistema ameaçado, ainda pouco conhecido e com possíveis potenciais biotecnológicos, é foco de intensa atividade mineradora, tornando assim admissível a extinção de espécies pouco estudadas ou ainda não descritas na literatura. Vale ressaltar que este trabalho apresenta uma proposta pioneira, o que torna as cavernas de canga alvos potenciais para estudos de bioprospecção dos isolados bacterianos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar por metagenômica a diversidade bacteriana de cavernas associadas a afloramentos de canga.

2.2. Objetivos específicos

i) Estabelecer o primeiro banco de dados com sequências metagenômicas 16S obtidas de amostras de piso e teto de cavernas de canga;

ii) Analisar a diversidade taxonômica de cavernas de canga do QF em relação a uma caverna de quartzito;

iii) Determinar a abundância relativa para a comunidade bacteriana em amostras de cavernas de canga e de quartzito.

iv) Correlacionar os achados biológicos com possíveis fenômenos que possam justificar as diferenças observadas.

v) Identificar cavernas em potencial para futuros estudos de prospecção de organismos e biomoléculas de interesse biotecnológico.

3. MATERIAL E METÓDOS

3.1. Locais de coleta

As coletas das amostras ocorreram no período de março a outubro de 2016 e foram realizadas em sete cavidades associadas a afloramentos de canga e uma caverna de quartzito, utilizada como controle para as demais cavidades devido a sua litologia comum no QF e por possuírem algumas caraterísticas semelhantes as cavernas de canga, ao contrário das cavernas carbonáticas.

Para a escolha das cavidades diferentes fatores foram considerados, como por exemplo diferentes localizações no QF (Quadro 2), assim como distintas altitudes e níveis de interferência humana. Para tanto, os munícipios contemplados foram: Mariana, Ouro Preto (distrito de Lavras Novas), Santa Bárbara (Parque Nacional do Gandarela) e Nova Lima (Serra da Moeda) (Figura 4).

Foram utilizados materiais previamente esterilizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) - UFOP, como espátulas para a retirada das amostras de piso e teto e tubos Falcon de 50 ml para o transporte do material coletado. Para cada uma das cavernas foram priorizadas pelo menos uma coleta de piso e outra de teto, geralmente em torno de 50 g de material sólido.

Quadro 2- Localização dos pontos de coleta

Caverna	Município	Latitude e Longitude
1	Mariana	20°9'53.78"S 43°24'19.49"O
2	Mariana	20°9'54.03"S 43°24'29.72"O
3	Mariana	20°9'49.15"S 43°24'21.85"O
4	Divisa de Caeté e Santa Bárbara	20° 3'19.58"S 43°41'42.41"O
5	Santa Bárbara	20° 3'23.40"S 43°35'59.94"O
6	Lavras Novas*	20°26'35.76"S 43°31'31.18"O
7(Controle)	Lavras Novas*	20°28'42.20"S 43°31'15.72"O
8	Nova Lima	20°13'18.26"S 43°58'38.48"O

*Distrito de Ouro Preto

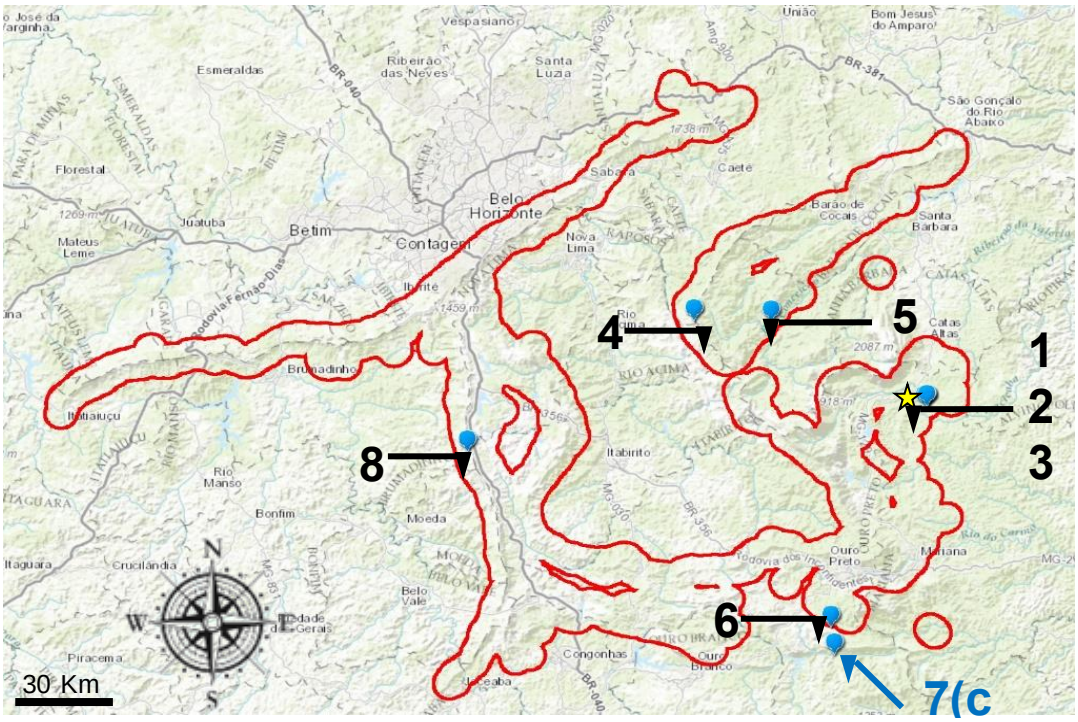

Figura 4. Localização no QF das cavernas onde foram realizadas as coletas.☆ Três cavernas localizadas na Chapada de Canga, Mariana- MG, Brasil. Imagem obtida por meio do Atlas Digital Geoambiental (http://www.institutopristino.org.br/atlas).

3.2. Extração de DNA

Para a extração de DNA total microbiano foi utilizado 0,25 g de cada amostra do piso ou teto, utilizando o kit Power Soil DNA da Mobio™ (GeneWorks, Austrália), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras foram conservadas em freezer (-20 °C) até o momento do uso.

3.3. Quantificação de DNA

Após o processo de extração as amostras de DNA foram quantificadas e verificadas quanto a pureza usando um espectrofotômetro do tipo NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, USA) na faixa de comprimento de onda de A260/A280 nm. Foi realizado eletroforese em gel de agarose 0,8 %, contendo 3 µl de Brometo de Etídeo, eluídos em TBE 1x, com corrida de 30 minutos a 90V para confirmar qualidade do DNA

extraído. A visualização do DNA foi realizada sob luz UV e a imagem foi registrada em um sistema fotodocumentador de gel (VilberLourmet, France).

3.4. Amplificação parcial do gene DNAr 16S e purificação do produto de PCR

Após a extração e quantificação, o DNA total foi utilizado para amplificação parcial do gene ribossomal 16S, por meio de uma reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*). Para isso foram utilizados oligonucleotídeos complexos compostos por: sequência Senso 5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3' e antisenso5' CCGTCAATTYYTTTRAGTTT 3' para amplificar a região V4 – V5 (FOUHY *et al.*, 2016) (Figura 03), em que cada um continha 10 nucleotídeos do *barcode*, os quais funcionavam como identificadores para cada amostra (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos (em verde) ligados ao *barcode* (em roxo) e adaptador (em azul) utilizados neste trabalho.

BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC04	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACCAAGATCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC05	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGAAGGAACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC06	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGCAAGTTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC07	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGTGATTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC08	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCGATAACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC09	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGCGGAACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACCGAACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTCGAATCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGGTGGTTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAACGGACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGAGTGTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGAGGTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGATGACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTATTCGTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGGCAATTGCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTAGTCGGACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGATCCATCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC21	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGCAATTACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGAGACGCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC23	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGCCACGAACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA

BC24	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAACCTCATTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC25	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTGAGATACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC26	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTACAACCTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC27	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAACCATCCGCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC28	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCCGGAATCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC29	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGACCACTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC30	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAGGTTATCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA

A PCR foi preparada para um volume final de 30 µl, contendo 3 µl de Buffer (10 x); 1,13 µl de dNTP (10 mM); 1,5 µl de $MgCl_2$ (50 mM); 4,5 µl de oligonucleotídeo senso (1 µM); 4,5 de oligonucleotídeo antisenso (1 µM); 20 ng de DNA; 0,48 µl de Platinum® *Taq* (Invitrogen) (5U/µl) e água Milli-q estéril livre de nucleases para completar o volume final da reação. A amplificação foi realizada em termociclador Biocycler®, sendo um ciclo inicial de 5 minutos por 94 ºC, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 ºC, 1 minuto a 57 ºC, 1 minuto a 72ºC, e um ciclo final de 5 minutos a 72ºC.

Após a amplificação os amplicons foram analisados em gel de agarose 0,8%, utilizando 5 µl do produto de PCR para verificação da qualidade. Confirmada a qualidade na amplificação, 22 µl do produto final da PCR foi purificado usando o Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), seguindo instruções do fabricante. Mais uma vez o produto da reação de purificação foi avaliado em gel de agarose 0,8%, utilizando 2 µl do produto purificado, para verificar a integridade do produto.

3.5. Sequenciamento usando plataforma Ion Torrent®

O sequenciamento foi realizado no Laboratório Multiusuário de Genômica da Universidade Federal de Ouro Preto com o apoio da técnica responsável Dra Luiza Perucci. A biblioteca de DNA foi quantificada utilizando kit Qubit dsDNA HS™ (High Sensitivity) no Qubit 2.0 fluorômetro (Life technologies, USA) e em seguida, realizada a normalização das amostras em 70 pM. Para a montagem da biblioteca, 20 µl de cada amostra foram colocados em um único tubo tipo eppendorff e homogeneizados. Posteriormente 25 µl deste *pool* de DNA foi carregado no chip 318 v2™ (Life technologies, USA), e este inserido no sequenciador Ion PGM™ (Life technologies, USA). Durante a preparação do sequenciador para a leitura das amostras foram utilizados os kits: Ion PGM Hi-Q View Chef™ (Reagentes e Soluções) e Ion PGM Hi-Q View

Sequencing™ (Life technologies, USA). As leituras (*reads*) de baixa qualidade e sequências policlonais foram filtradas pelo software do próprio equipamento (PGM) e os dados obtidos foram exportados em arquivos FastQ.

3.6. Análises dos dados por ferramentas de bioinformática

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioinformática do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, sob coordenação do Prof. Dr. João Carlos Setubal. Os dados do sequenciamento foram processados utilizando um *pipeline* adaptado do *Brazilian Microbiome Project* (BMP) (Figura 5).

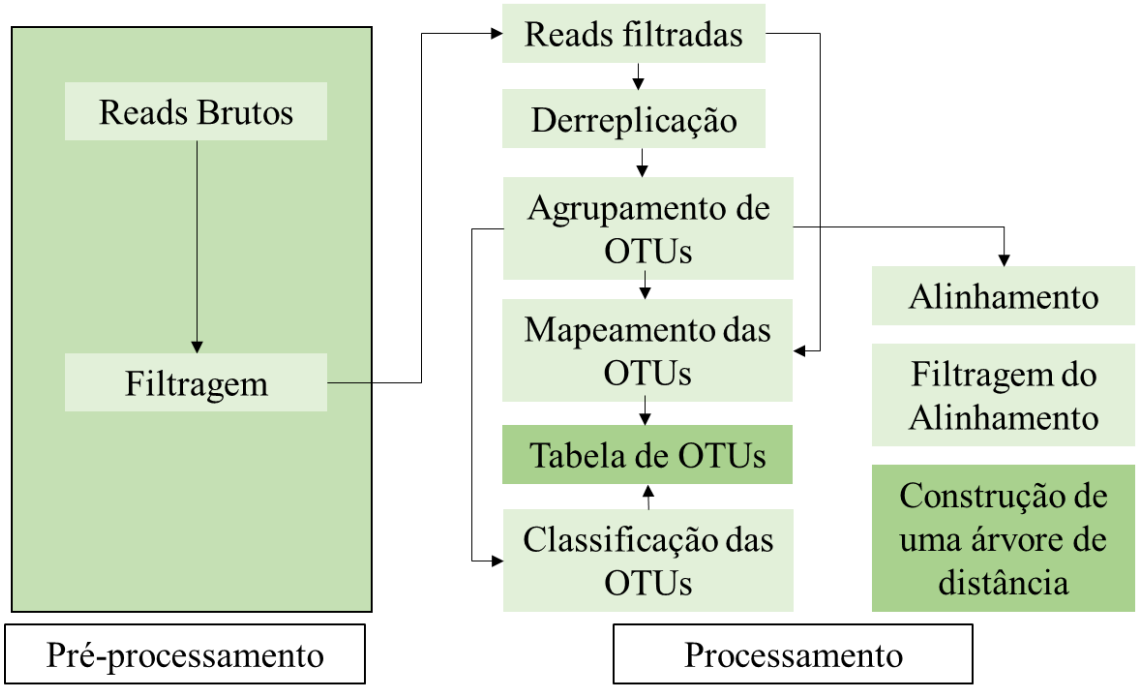

Figura 5. Esquematização das etapas adotadas no *pipeline* para análise da região V4-V5 do gene 16S, adaptado do BMP.

Na etapa de pré-processamento, o arquivo contendo os *reads* no formato fastQ foi convertido para fastQual. Os *reads* foram filtradas pelo Prinseq (SCHMIEDER e EDWARDS, 2011), sendo desconsiderados os *reads* menores que 100 pb, e *reads* cuja qualidade média (Q) tenha sido superior ou igual a 20.

Os *reads* filtrados foram derreplicados utilizando o *script* do USEARCH v.8.1 (EDGAR, 2010), realizando o agrupamento de sequências abundantes e descarte de *singletons* (*reads* únicos, sem semelhantes). Após esse processo, os *reads* foram

agrupados em OTUs (*Operational Taxonomic Units*) seguindo o método UPARSE (EDGAR, 2013), em que a identidade das sequências correspondentes a uma mesma OTU tenha sido maior ou igual a 97% de identidade. Para cada OTU gerado foi atribuído uma taxonomia utilizando o classificador RDP (*Ribosomal Database Project*) (WANG *et al.*, 2007), disponível no QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*).

Em seguida foi gerado uma tabela no formato BIOM (*The Biological Observation Matrix*) contendo a contagem de *reads* correspondentes para OTU. O alinhamento das OTUs foi processado pelo PyNAST (CAPORASO *et al.*, 2010), disponível no QIIME. Uma árvore filogenética foi construída pelo FastTree (PRICE *et al.*, 2009), também disponível no QIIME.

As análises de diversidade foram realizadas a partir dos arquivos da tabela no formato BIOM e da árvore filogenética, gerando os resultados de α-diversidade, β-diversidade, tabelas de frequência e gráficos de classificação taxonômica. As curvas de rarefação foram construídas pelo QIIME usando *scripts* específicos considerando como profundidade a quantidade de *reads* das amostras de menor tamanho associado ao índice Observed_otus para medir a riqueza das OTUs. Os gráficos da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foram gerados a partir da distância UniFrac ponderada e não ponderada (LOZUPONE e KNIGHT, 2005).

As análises estatísticas foram realizadas usando o software STAMP (*STatistical Analysis of Metagenomic Profiles*) v. 2.1.3 (PARKS *et al.*, 2014), utilizando o teste t de Welch e a filtragem por q-value $< 0,05$ como parâmetros.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Coleta das amostras

Foram coletadas ao todo 29 amostras de piso e teto, distribuídas entre as cavernas de canga e a caverna controle, em diferentes localidades (Quadro 2). Para uma padronização da nomenclatura de referências estas amostras foram nomeadas de acordo com as abreviaturas demonstradas no Quadro 3.

Quadro 3. Localização e identificação das amostras

Amostra	Código da amostra	Caverna	Data da coleta	Origem	Localização	GPS (Lat e Long)	Altitude (m)
1	1- MC1S1	1	06.03.16	Piso	Mariana	20° 9'53.78"S 43°24'19.49"O	879
2	2- MC1S2	1	06.03.16	Piso	Mariana	20° 9'53.78"S 43°24'19.49"O	879
3	3- MC1T1	1	06.03.16	Teto	Mariana	20° 9'53.78"S 43°24'19.49"O	879
4	4- MC1T2	1	06.03.16	Teto	Mariana	20° 9'53.78"S 43°24'19.49"O	879
5	5- MC2S1A	2	06.03.16	Piso	Mariana	20° 9'54.03"S 43°24'29.72"O	865
6	6- MC2S2A	2	06.03.16	Piso	Mariana	20° 9'54.03"S 43°24'29.72"O	865
7	7- MC2T1A	2	06.03.16	Teto	Mariana	20° 9'54.03"S 43°24'29.72"O	865
8	8- MC2T2A	2	06.03.16	Teto	Mariana	20° 9'54.03"S 43°24'29.72"O	865
9	9- MC2SB	2	06.03.16	Piso	Mariana	20° 9'54.03"S 43°24'29.72"O	865
10	10- MC2EB	2	06.03.16	Espeleotema	Mariana	20° 9'54.03"S 43°24'29.72"O	865
11	11- MC3S	3	06.03.16	Piso	Mariana	20° 9'49.15"S 43°24'21.85"O	880
12	12- MC3T	3	06.03.16	Teto	Mariana	20° 9'49.15"S 43°24'21.85"O	880
13	13- GC1S	4	09.07.16	Piso	Divisa de Caeté com Santa Barbara	20° 3'19.58"S 43°41'42.41"O	1624
14	14- GMC1SAF	5	09.07.16	Piso	Santa Barbara	20° 3'23.40"S 43°35'59.94"O	1236
15	15- GMC1TAF	5	09.07.16	Teto	Santa Barbara	20° 3'23.40"S 43°35'59.94"O	1236
16	16- GMC1SE	5	09.07.16	Piso	Santa Barbara	20° 3'23.40"S 43°35'59.94"O	1236
17	17- GMC1TE	5	09.07.16	Teto	Santa Barbara	20° 3'23.40"S 43°35'59.94"O	1236
19	19- GMC1TG	5	09.07.16	Teto	Santa Barbara	20° 3'23.40"S 43°35'59.94"O	1236

20	20- LCSAB	6	30.07.16	Piso	Lavras Novas	20°26'35.76"S 43°31'31.18"O	1480
21	21- LCSCE	6	30.07.16	Piso	Lavras Novas	20°26'35.76"S 43°31'31.18"O	1480
22	22- LCTAB	6	30.07.16	Teto	Lavras Novas	20°26'35.76"S 43°31'31.18"O	1480
23	23- LCTCE	6	30.07.16	Teto	Lavras Novas	20°26'35.76"S 43°31'31.18"O	1480
24	24- LCTF	6	30.07.16	Teto	Lavras Novas	20°26'35.76"S 43°31'31.18"O	1480
25	25- LQCS	7(Controle)	30.07.16	Piso	Lavras Novas	20°28'42.20"S 43°31'15.72"O	1346
26	26- LQCT	7(Controle)	30.07.16	Teto	Lavras Novas	20°28'42.20"S 43°31'15.72"O	1346
27	27- SMS1	8	17.10.16	Piso	Nova Lima	20°13'18.26"S 43°58'38.48"O	1488
28	28- SMS2	8	17.10.16	Piso	Nova Lima	20°13'18.26"S 43°58'38.48"O	1488
29	29- SMT1	8	17.10.16	Teto	Nova Lima	20°13'18.26"S 43°58'38.48"O	1488
30	30- SMT2	8	17.10.16	Teto	Nova Lima	20°13'18.26"S 43°58'38.48"O	1488

4.2. Qualidade do DNA total das amostras

As amostras foram verificadas quanto a integridade da extração de DNA (Figura 6), amplificação do DNA (Figura 7) e purificação de DNA amplificado (Figura 8) antes carregamento para sequenciamento.

A amostra 18 foi excluída por não conter qualidade para o sequenciamento. As outras amostras, mesmo não apresentando bandas fortes na eletroforese, foram sequenciadas e classificadas. Algumas amostras de teto foram difíceis de extrair DNA, sendo necessário repetir o procedimento, isso devido a quantidade de pedras que foram coletadas na amostra. Algumas amostras não foram visualizadas na eletroforese do DNA extraído, porém foram visualizadas na eletroforese do produto amplificado e purificado.

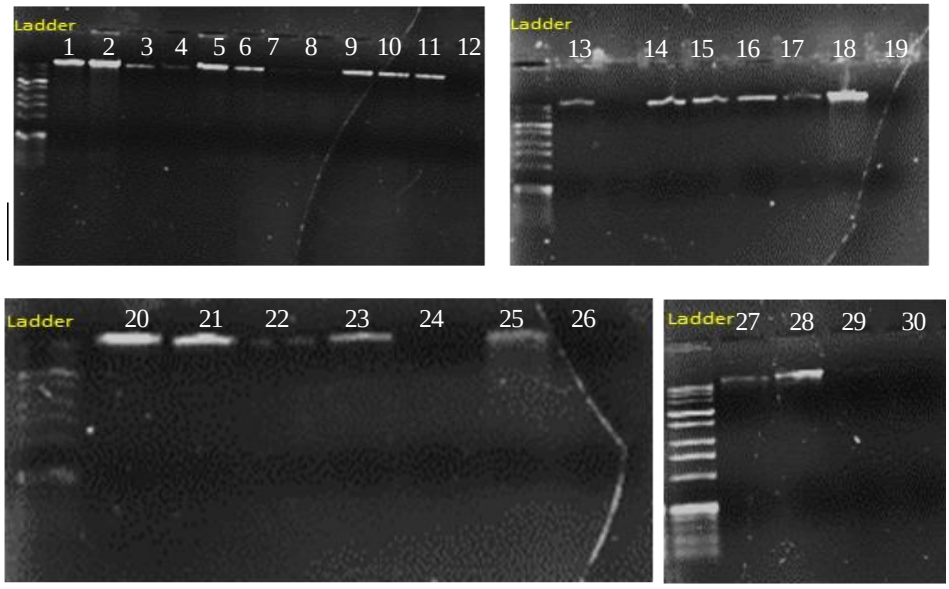

Figura 6. Demonstração visual do DNA após a extração.

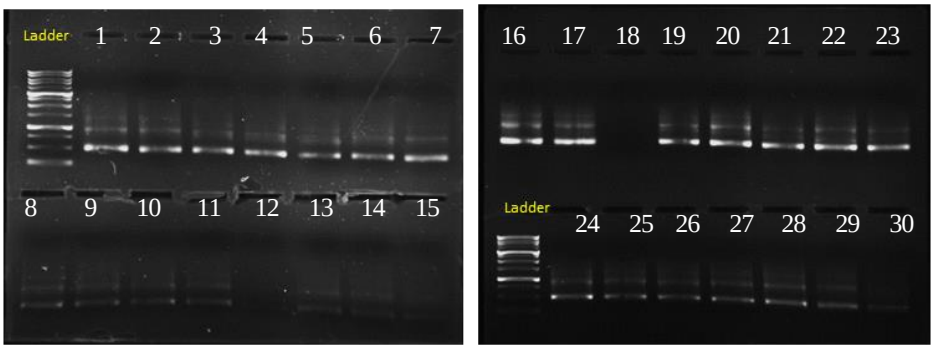

Figura 7. Demonstração visual do DNA após as etapas de amplificação.

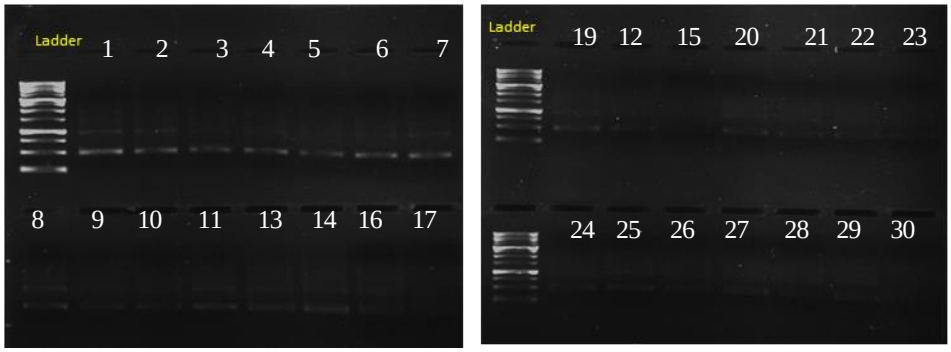

Figura 8. Demonstração visual do DNA amplificado e purificado.

4.3. Dados brutos fornecidos do relatório do software Ion reporter

Mais de 6 milhões de *reads* filtrados e usáveis foram obtidos da corrida do Ion Torrent® (Figura 9), com fragmentos variando entre 100 a 450 pb nas amostras, totalizando um percentual de 76% do uso total da capacidade do chip.

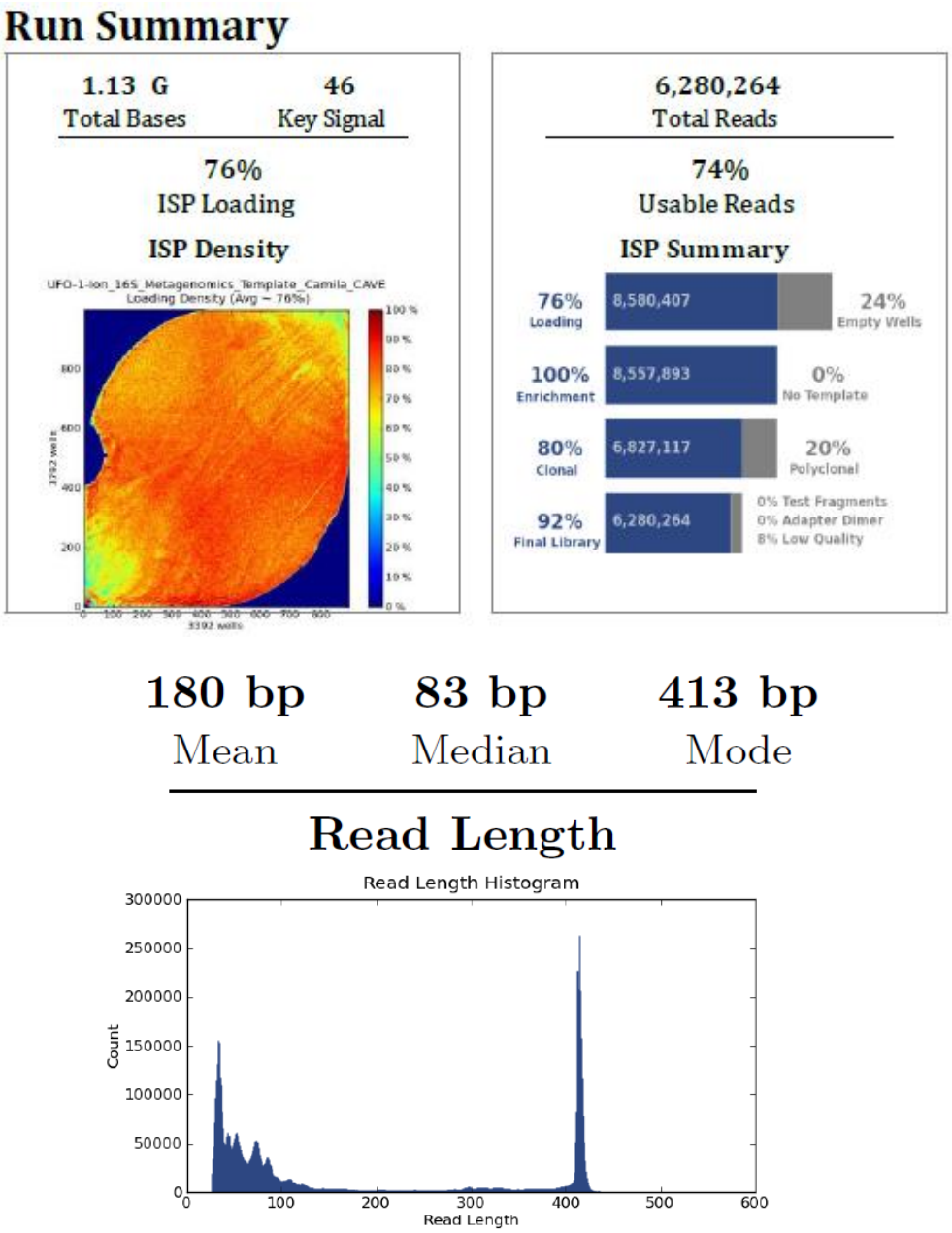

Figura 9. Relatório da corrida do sequenciamento obtido do Software Ion Reporter. Mais de 6 milhões de *reads* filtrados e usáveis foram obtidos da corrida do Ion Torrent®. Nesta visualização esquemática, a porcentagem de carregamento atingiu 76% da capacidade do chip, obtendo um rendimento final de 1,13 G. Abaixo, é demonstrado que os *reads* apresentam distribuição bimodal, um conjunto em torno de 100 a 150 pb e outro conjunto de *reads* de 400-450 pb.

Detalhes de cada uma das amostras, envolvendo número total de *reads* e bases sequenciadas pode ser melhor observado na tabela 2. Os dados apresentam distribuição bimodal, em que há dois conjuntos de *reads* por tamanho, isso ocorreu durante o sequenciamento, devido ao limite de eficiência do processo de purificação. Contudo, durante o pré-processamento de dados, os *reads* menores (100 pb) foram retirados para que não houvesse interferência nos resultados.

De forma geral, a qualidade do sequenciamento foi satisfatória, pois a maior parte dos *reads* apresentaram cerca de 413 pb como indicado pela moda. Além disso, o carregamento do chip foi acima de 70% e a porcentagem de policlonais foi inferior a 40%, como recomendado pelo fabricante.

Tabela 2. Total de *reads* por amostra após o sequenciamento parcial do gene DNAr 16S no PGM.

Amostra	Bases	*Reads*	Tamanho médio dos *Reads*
None	46,833,790	536,889	87 bp
1- MC1S1	33,668,062	196,487	171 bp
2- MC1S2	27,729,374	129,281	214 bp
3- MC1T1	23,481,858	116,742	201 bp
4- MC1T2	35,221,378	182,483	193 bp
5- MC2S1A	33,371,557	174,006	192 bp
6- MC2S2A	60,918,051	358,109	170 bp
7- MC2T1A	36,754,698	187,706	196 bp
8- MC2T2A	31,954,172	184,115	174 bp
9- MC2SB	53,737,772	281,825	191 bp
10- MC2EB	49,797,749	308,819	161 bp
11- MC3S	37,108,725	218,346	170 bp
12- MC3T	34,991,048	107,025	327 bp
13- GC1S	32,037,345	206,242	155 bp
14- GMC1SAF	42,668,359	239,859	178 bp
15- GMC1TAF	22,032,158	128,998	171 bp
16- GMC1SE	35,391,068	200,623	176 bp
17- GMC1TE	33,332,423	187,728	178 bp
19- GMC1TG	29,755,581	153,085	194 bp
20- LCSAB	27,163,571	112,004	243 bp
21- LCSCE	42,090,700	207,298	203 bp
22- LCTAB	20,717,017	84,003	247 bp
23- LCTCE	46,229,115	222,335	208 bp
24- LCTF	40,791,827	218,176	187 bp
25-LQCS	54,676,744	304,547	180 bp
26- LQCT	34,714,249	203,685	170 bp
27- SMS1	36,569,387	181,685	201 bp
28- SMS2	51,511,429	263,203	196 bp
29- SMT1	43,295,850	225,117	192 bp
30- SMT2	32,177,417	159,843	201 bp

4.4. Determinação de α-diversidade

A estimativa de riqueza das OTUs para cavernas foi realizada de acordo com o índice Observed_otus. A determinação da curva de rarefação (riqueza) por caverna permitiu identificar que a caverna 1 (Mariana 1), seguida pelas cavernas 5 (Gandarela), 6 (Lavras Novas) e 4 (Gandarela) foram as que apresentaram maior riqueza. Em contrapartida, as cavernas que apresentaram menor riqueza são 3 (Mariana 3), 7 (controle-quartzito) e 8 (Serra da Moeda) (Figura 10).

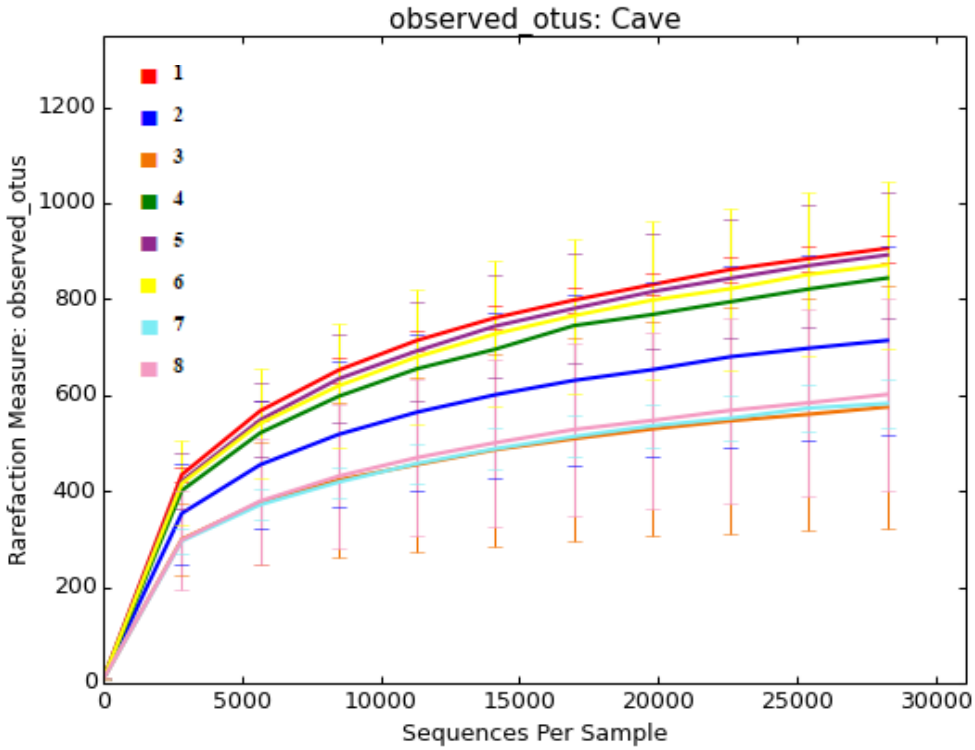

Figura 10. Curva de rarefação representando a estimativa de riqueza de OTUs entre as cavernas de canga e controle.

Esses resultados demonstram baixa diversidade microbiana da caverna 7 (controle) quando comparada às cavernas de canga, conforme Silva *et al.* (2011) demonstraram previamente para a composição de invertebrados troglomórficos comparativamente entre as cavernas de canga da Mata Atlântica em relação às cavernas de quartzito. Inúmeros fatores sugerem variações na caverna 3 (Mariana 3), dentre eles destaca-se duas possibilidades, uma de caráter físico e outra biológico. Estas variações podem ser decorrentes das características naturais do ambiente, o que reflete variações

em toda a rede trófica, mas também pode ter relação com o fato de ocorrer abundância do filo Actinobacteria neste local. Sabidamente, este grupo de bactérias é conhecido pela elevada capacidade de produzir metabólitos secundários antimicrobianos (CHAUDHARY *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014), o que poderia restringir a diversidade no local favorecendo sua presença majoritária no local, mas também que poderia justificar sua sobrevivência prioritária em ambientes extremos (NIMAICHAND *et al.*, 2015).

Curiosamente, chama a atenção o fato de que, dentre todas as cavernas, apenas a caverna 8 (Serra da Moeda) apresenta sinais de interferência humana em suas estruturas. Aparentemente barracas improvisadas foram montadas no conduto de entrada, havia vestígios de fogueira e presença de materiais não biodegradáveis no entorno que podem ter relação com os dados de riqueza relativos a esta caverna, fatos que justificariam modificações na microbiota natural e possibilitando a perda de espécies que compõem o local.

Vale ressaltar que as três cavernas representantes da Chapada de Canga (Cavernas 1, 2 e 3) apresentam o ponto de saturação da curva de rarefação distintos, mesmo sendo geograficamente próximas, demonstrando que essa região mantém riquezas diferentes, ainda que não se encontre em uma área de conservação. Por outro lado, as cavernas 4 e 5 que estão localizadas no Parque Nacional do Gandarela, apresentam uma riqueza menor do que a caverna 1 (Mariana 1), ressaltando mais uma vez o quanto a região da Chapada de Canga apresenta potencial de diversidade.

4.5. Determinação de β-diversidade

O agrupamento das OTUs baseado na Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando medidas das distâncias métricas UniFrac ponderada e não-ponderada, permitiu avaliar a distância entre comunidades microbianas utilizando de informações filogenéticas entre os membros que também permitiu calcular as medidas de dissimilaridade (LOZUPONE e KNIGHT, 2005). A distância métrica ponderada é uma medida quantitativa que se baseia em informações de abundância relativa entre os organismos, em contraste, a distância métrica não-ponderada, considerada qualitativa. Isto considerando somente a presença e a ausência das sequências, ambas medidas de β-diversidade (LOZUPONE *et al.*, 2007). A seguir, é demonstrado as análises para todas as

cavernas e para a origem das amostras, utilizando a métrica não-ponderada e posteriormente, a métrica ponderada.

Os gráficos PCoA gerados utilizando a distância métrica não ponderada apresentam PC 1 (26,29%), PC 2 (14%) e PC3 (7%). O gráfico para todas as cavernas está representado na Figura 11. Estas análises permitiram destacar que a caverna controle (quartzito) destoa fortemente quanto a presença e ausência de sequências em relação às cavernas de canga, o que significa que as OTUs da caverna controle apresentam classificações filogeneticamente bastante diferenciadas em relação às OTUs das cavernas de canga. Isso sugere que entre as cavernas de litologias diferentes há variação de classificação das OTUs. As amostras 12 (Caverna 3- Mariana 3) e amostra 27 (Caverna 8- Serra da Moeda) são as amostras mais distantes das outras, sendo estão presentes nas cavernas com menor riqueza demonstrado na curva de rarefação.

Da mesma forma, análise por PCoA quanto as origens das amostras coletadas (piso ou teto) foram investigadas (Figura 12). Entre as amostras derivadas de piso e de teto foi possível observar um agrupamento entre as amostras derivadas do piso quando comparadas com as amostras do teto. Numa perspectiva geomorfológica, isso pode ter direta relação com a composição das estruturas de teto e piso.

As cavidades desenvolvidas em rochas ferríferas como a canga e o itabirito apresentam duas tipologias para formação de cavidades ferríferas e de canga no QF: as formadas por erosão, em que as cavidades se desenvolvem abaixo da canga e as formadas por dissolução, em as cavidades se desenvolvem sob a canga no contato com o itabirito, sendo que algumas cavidades são formadas pela combinação dos dois processos (SIMMONS, 1963).

O desenvolvimento das cavernas de canga contribui para a sua erosão diferencial em que no teto, se desenvolve a canga que apresenta compacidade e resistência a erosões, enquanto que no piso se desenvolve itabirito, e muitos encontram-se alterado e com possibilidade de sofrer fragmentações (CALUX, 2013; TIMO e TIMO, 2016). Essa diferença de competência pode ser contribuinte para a diferença entre os microrganismos nesses ambientes.

Outras particularidades também foram observadas. A amostra do piso da caverna controle apresentou-se mais próxima a amostra de teto dessa mesma caverna, do que em relação a comparação destas amostras com outras da mesma origem nas cavernas de

canga. Isto evidencia mais uma vez um potencial de diversidade biológica das cavernas de canga, em relação às de quartzito.

A amostra 27 (referente a caverna 8- Serra da Moeda), mesmo sendo de piso encontra-se distante do agrupamento formado pelas amostras de piso e próxima do teto de outras cavernas de canga. Mais uma vez, é possível destacar que estas variações possam ser frutos das possíveis interferências antropológicas previamente descritas, podem favorecer as modificações na microbiota local, ou ainda pode ser sugerido que, como as cavernas são abrigos para animais e esta adicionalmente, apresenta características de interferência humana, possa ter ocorrido um desmoronamento do teto e assim a microbiota tenha sido compartilhada com o piso neste ponto em que foi coletado.

A amostra 12 (Teto da caverna 3- Mariana 3) apresenta-se distantes tanto das amostras de piso quanto das outras de teto, indicando a classificação filogenética desta amostra é diferente de todas as outras amostras.

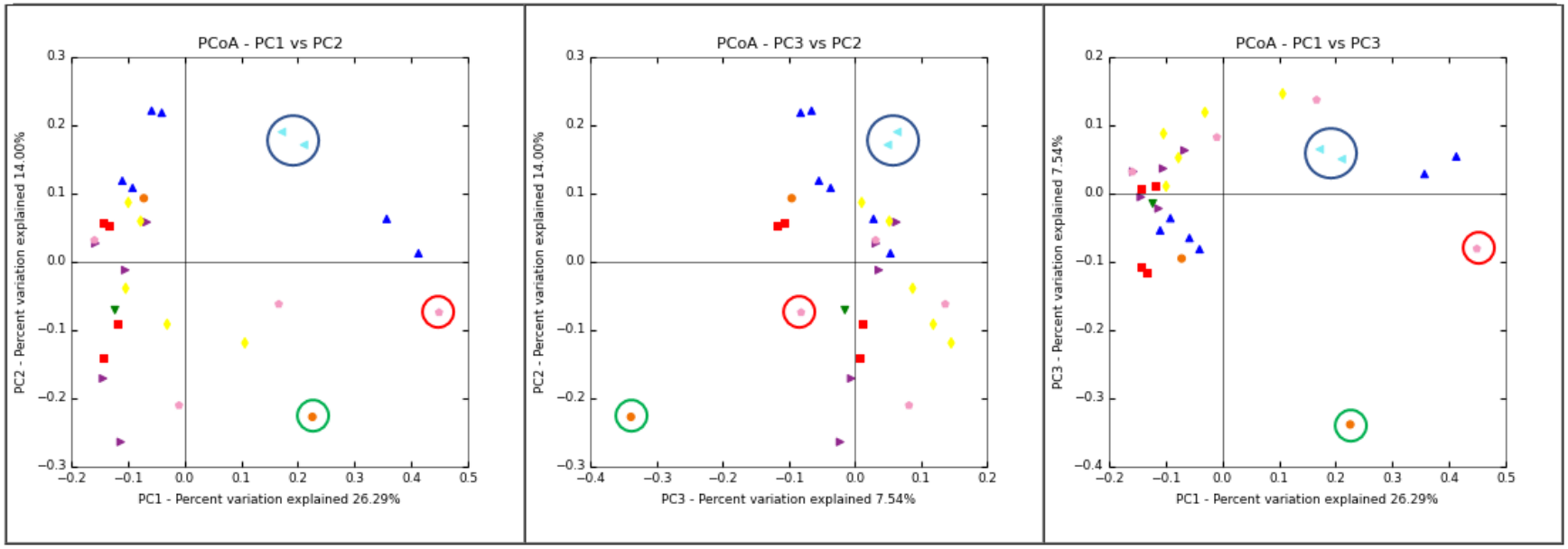

Figura 11. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando a distância métrica não ponderada para as cavernas. Em destaque, no círculo azul as amostras da caverna controle, no círculo verde amostra 12, teto da caverna 3 (Mariana 3) e no círculo vermelho amostra 27, piso da caverna 8 (Serra da Moeda)

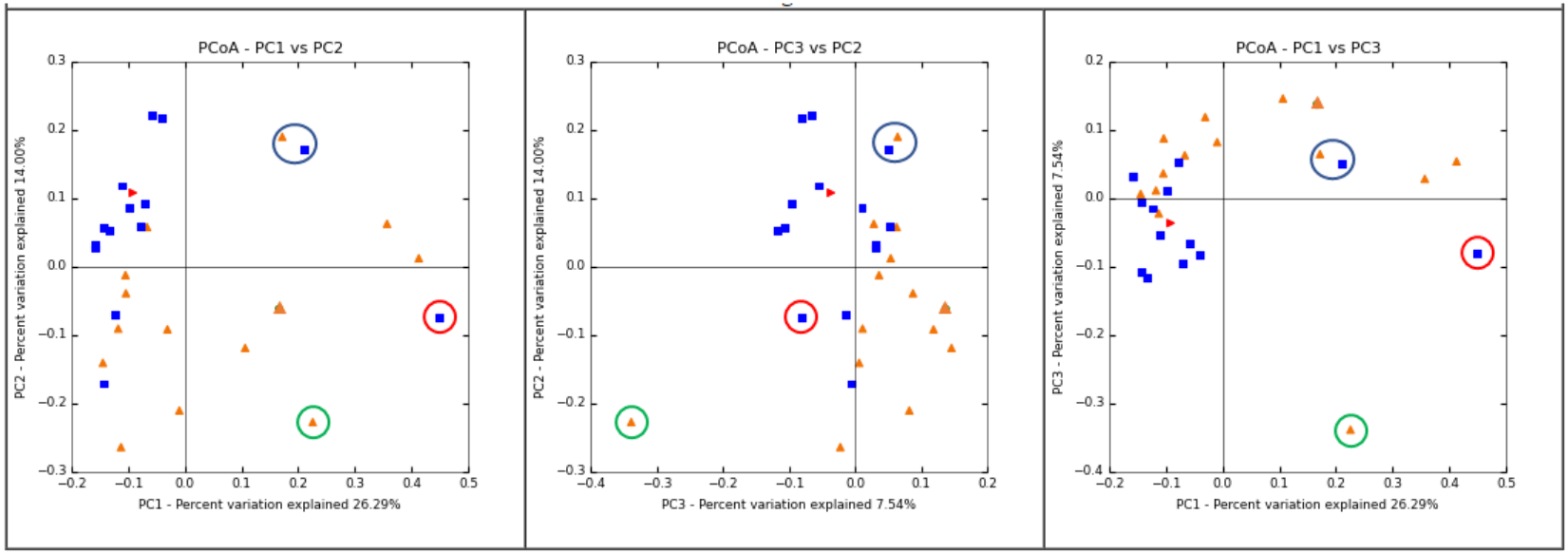

Figura 12. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando a distância métrica não ponderada para as origens das amostras coletadas. Em destaque dentro do círculo azul, amostras da caverna controle, dentro do círculo vermelho a amostra 27, piso pertencente a caverna 8(Serra da Moeda) e dentro do círculo verde a amostra 12, teto da caverna 3 (Mariana 3).

Teto

Piso

Espeleotema

Os gráficos de PCoA para as cavernas (Figura 13) e para as origens das amostras coletadas (piso ou teto) (Figura 14) gerados utilizando a distância métrica ponderada apresentam PC1(35,21%), PC2 (17,59%), e PC3 (9,87%).

Os gráficos da análise por caverna (Figura 13), revela que há pouca variação na estrutura da comunidade bacteriana entre as cavernas de canga e a controle, considerando a abundância. Ainda assim as amostras 12 (Teto – caverna 3 Mariana 3) e 24 (Teto – caverna 6 Lavras Novas) estão mais distantes, não permanecendo em nenhum dos grupos. A amostra 12 apresenta uma das menores riquezas na α-diversidade, o que pode contribuir para esta variação de abundância e amostra 24 apresenta uma composição significante diferente, sendo assim a abundância pode ter sido afetada.

A respeito da origem da caverna (Figura 14), é notável, novamente, o agrupamento das amostras de piso, com exceção do piso da caverna controle e da amostra 27 (Piso – caverna 8) que além de apresentarem variação na classificação das OTUs como observado na distância métrica não-ponderada, apresentam variação na abundância, enquanto as amostras de teto estão dispersas, indicando variação da estrutura da comunidade. Pode-se dizer que a formação diferente entre o piso e o teto das cavernas de canga contribui também na abundância.

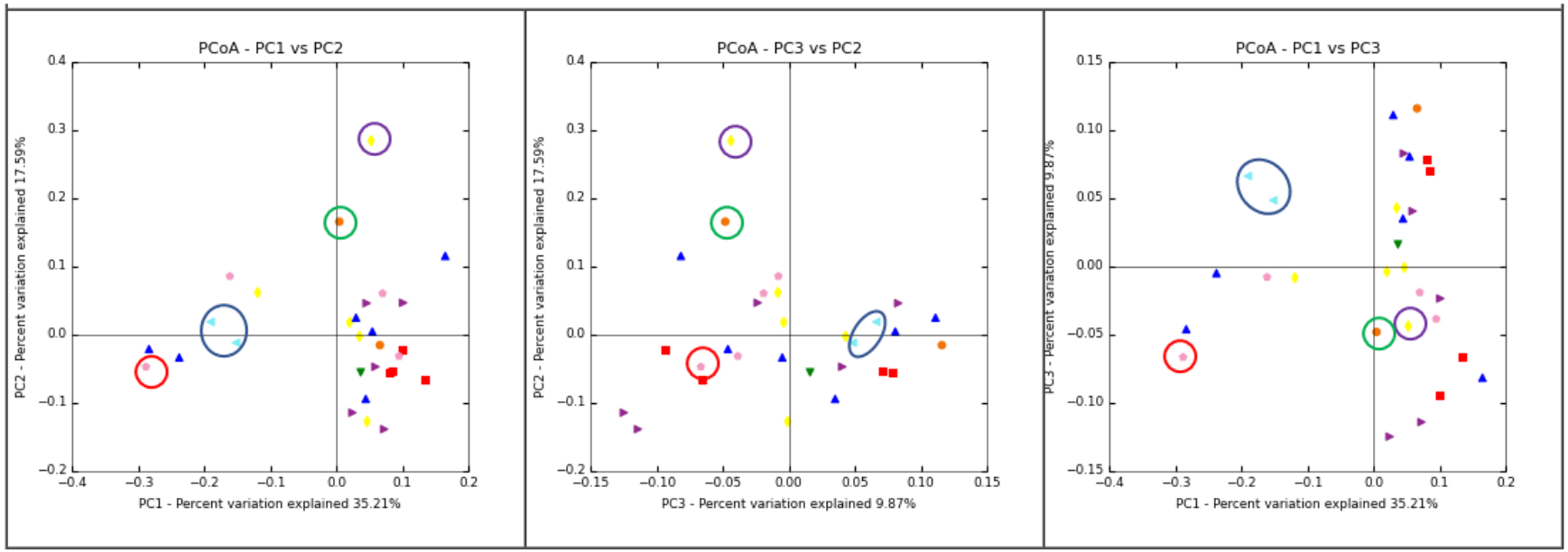

Figura 13. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando a distância métrica ponderada para as origens das amostras coletadas (piso ou teto). Em destaque dentro do círculo azul, as amostras controle, em vermelho a amostra 27 da caverna 8(Serra da Moeda), em verde a amostra 12 da caverna 3 (Mariana 3) e em roxo a amostra 24 da caverna 6 (Lavras Novas).

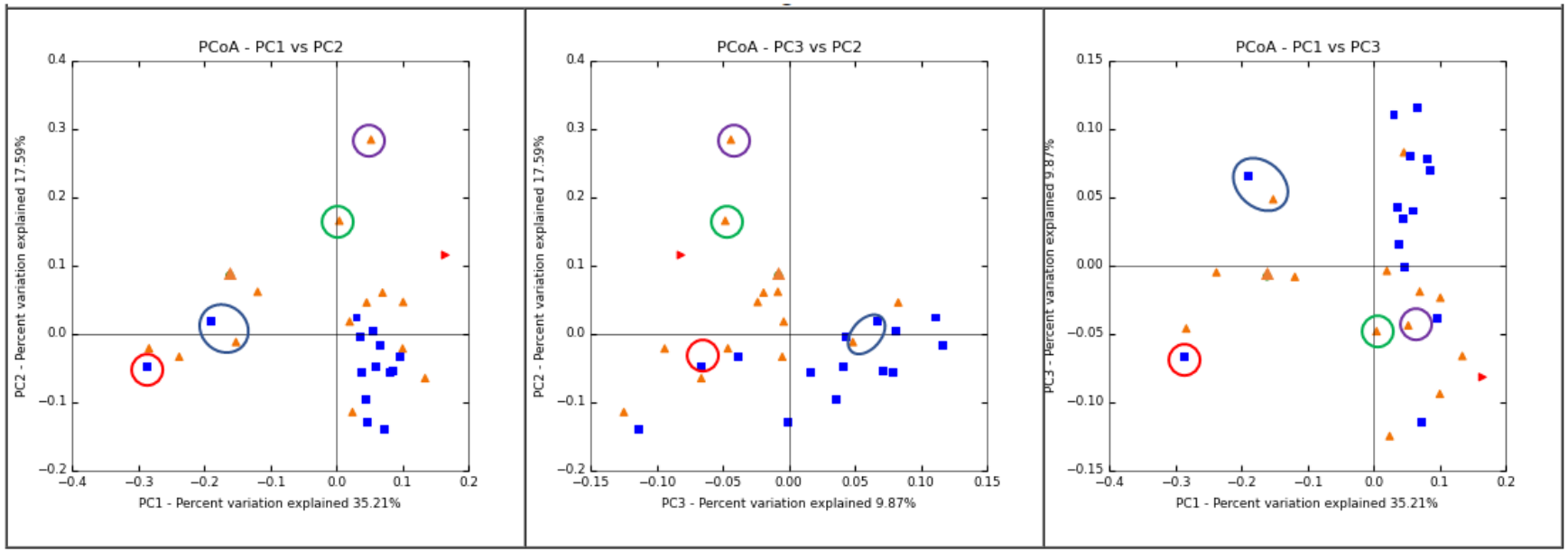

Figura 14. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando a distância métrica ponderada para as cavernas. Em destaque dentro do círculo azul, as amostras controle, no círculo vermelho a amostra 27 da caverna 8(Serra da Moeda), no círculo verde a amostra 12, teto da caverna 3 (Mariana 3) e no círculo roxo amostra 24, teto da caverna 6 (Lavras Novas).

Teto

Piso

Espeleotema

4.6. Análise da estrutura e da comunidade bacteriana entre cavernas

Quanto à diversidade bacteriana presente e estabelecida entre as cavernas, os principais filos encontrados foram (considerando a abundância >1%): Acidobacteria, representado uma média de 43,6% do total de OTUs, com a abundância variando entre 37% na caverna 8 (Serra da Moeda) e 48,9% na caverna 4 (Gandarela) (Figura 15).

Apesar de ser um dos mais filos mais abundantes e presente em diversos ambientes com 26 subdivisões (JANSSEN, 2006), ainda há pouco estudo na literatura sobre as capacidades ecológicas e metabólicas desses microrganismos no solo (BARNS *et al.*, 2007). Apesar disso, estudos direcionam a importância deste filo como organismos com grande potencial desde degradação de carboidratos (PANKRATOV *et al.*, 2012; YAMADA *et al.*, 2014; GARCIA-FRAILE *et al.*, 2015) a decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes(CATAO *et al.*, 2014) Desta maneira, bactérias deste filo vem sendo apontadas como prováveis fontes de busca por enzimas e outros produtos de interesse biotecnológico em trabalhos de metagenômica. Um exemplo disso foi o achado de uma nova lipase derivada de uma Acidobacteria do solo de

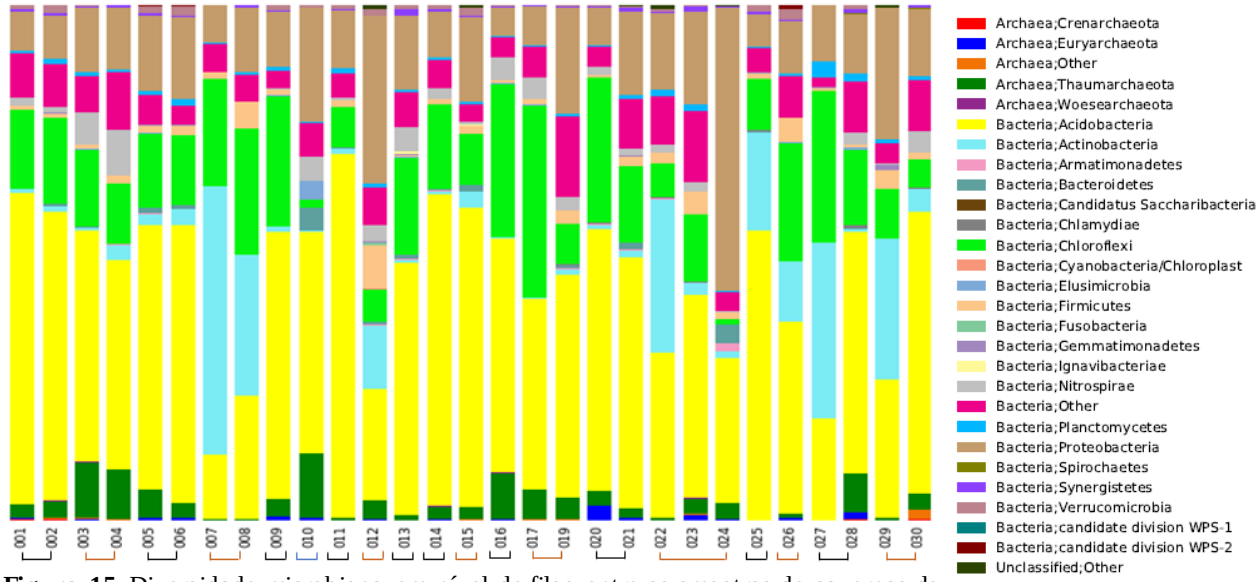

Figura 15. Diversidade microbiana em nível de filos entre as amostras de cavernas de canga e controle (C7). Os colchetes na cor preta representam o solo, na cor laranja são tetos e na cor azul representa um espeleotema.

uma Floresta Atlântica brasileira (FAORO *et al.*, 2012). Parte das bactérias deste filo estão associadas com o pH baixo do ambiente, o que vai ao encontro com as cavernas de canga que apresentam o pH entre 3,5 e 4,9.

O segundo filo mais abundante foi Chloroflexi, representando 15,4% do total de OTUs identificadas, com abundância entre 6,9% na caverna 3 (Mariana 3) e 20,1% na caverna 5

(Gandarela). Este filo é classicamente associados a ambientes extremos (KRAGELUND *et al.*, 2007). As cangas podem ser consideradas com condições extremas por serem compostas por 90% de óxidos de ferro e conter solo muito ácidos, rasos, com índices baixos de fertilidade e temperaturas que atingem quase 70ºC na superfície (CARMO *et al.*, 2012). Além disso, bactérias deste filo estão sendo associadas a unidades de tratamento de águas residuais de iodo ativado (BJORNSSON *et al.*, 2002; KRAGELUND *et al.*, 2007).

O filo Proteobacteria representou 14,8% do total de OTUs, com abundância entre 8,0% na caverna 7(controle) e 22,1% na caverna 6 (Lavras Novas). Ambientes expostos a contaminação de metais apresentam uma comunidade complexa, porém bem adaptada, as proteobacterias estão entre os principais contribuintes para a composição destes ambientes (HALTER *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2013), sendo sabido que essas comunidades desempenham papel essencial no ciclismo biogeoquímico e estão envolvidas na transformação de nutrientes como N e C (GILLAN *et al.*, 2015).

O filo Actinobacteria apresentou 8,4% do total das OTUs, com abundância entre 0,5% na caverna 4 (Gandarela) e 16,6% na caverna 8 (Serra da Moeda). Este filo inclui bactérias que com destaque para a potencial atividade antagonista e de controle biológico de patógenos de plantas, sendo capazes de promover o crescimento das plantas por meio da fixação de nitrogênio, síntese de sideróforo, fitohormônios e solubilização de minerais (BARKA *et al.*, 2016). Além disso, esse grupo apresenta a mais promissora fonte de novos antibióticos, incluindo importantes classe de drogas antimicrobianas (GENILLOUD, 2017) e já teve sua presença associada com habitats extremos (QIN *et al.*, 2012; HAMEDI *et al.*, 2013; QIN *et al.*, 2016).

O filo Nitrospirae com 2,0% do total de OTUs, com abundância menor que 0,1% na caverna 7(controle) e 4,8% na caverna 4(Gandarela). Corresponde ao filo mais diverso e abundante de bactérias oxidantes de nitritos (DAIMS *et al.*, 2001), importantes para nitrificação (oxidação de amônia por microrganismos), a qual é um processo chave para o ciclo biogeoquímico do nitrogênio e para o tratamento de águas residuais (LUCKER *et al.*, 2010).

O filo Firmicutes apresentou 1,8% do total, com abundância entre 0,9% na caverna 1(Mariana1) e 4,8% na caverna 3 (Mariana 3). Corresponde a um filo cujos representantes apresentam uma extensa diversidade de potenciais metabólicos. Entretanto, muitos representantes deste filo estão envolvidos com fixação de nitrogênio, solubilização de fostato,

ou produção de hormônios vegetais, atuando fortemente como bactérias promotoras de crescimento vegetal (DA SILVA *et al.*, 2013).

Finalmente, embora o conjunto de oligonucleotídeos escolhido tenha sido específico para as bactérias, 4% das OTUs foram classificadas como arqueias, sendo o filo Thaumarchaeota mais representativo com 3,5% de abundância do total, grupo que ganhou destaque após a descoberta de que alguns representantes são capazes de oxidar amônia aerobiamente (KÖNNEKE *et al.*, 2005) e 6,9% do total foram agrupados a filos não classificados e outros filos.

Uma análise em nível mais específico, destacou como os principais gêneros (abundâncias >1%): *Acidobacteria Gp2* (22,7%), *Ktedonobacter* (8,2%), *Acidobacteria Gp1* (7,4%), *Acidobacteria Gp10* (4,2%), gênero desconhecido da ordem Actinomycetales (3,6%), *Acidobacteria Gp3* (3,1%), um gênero desconhecido da família Ktedonobacterales (2,6%), um gênero desconhecido da classe Ktedonobacteria (2,1%), um gênero desconhecido da família Pseudonocardiaceae (2,0%), *Nitrospira* (2,0%), um gênero desconhecido da família Beijerinckiaceae (1,6%), *Thermosporothrix* (1,2%), *Burkholderia* (1,3%), *Candidatus Koribacter* (1,3%), um gênero desconhecido da classe Acidobacteria Gp1 (1,0%) e *Nitrososphaera* (arqueia) (3,5%).

A tabela 3 apresenta as maiores abundâncias relativas em nível de gênero, para cada uma das cavernas investigadas.

Tabela 3. Maiores abundâncias relativas em nível de gênero nas cavernas.

	Origem	**Maiores abundâncias relativa (%)**	**Gêneros**
Caverna 1	1- Piso	40,6	*Acidobacteria Gp2*
		9,7	*Acidobacteria Gp1*
	2- Piso	34,5	*Acidobacteria Gp2*
		10,3	*Acidobacteria Gp1*
	3- Teto	31,7	*Acidobacteria Gp2*
		10,6	*Nitrososphaera*
	4- Teto	29,4	*Acidobacteria Gp2*
		9,5	*Nitrososphaera*

Caverna 2	5- Piso	17,17	*Acidobacteria Gp2*
		15,13	*Acidobacteria Gp1*
	6- Piso	17,8	*Acidobacteria Gp1*
		15,2	*Acidobacteria Gp2*
	7- Teto	40,8	Gênero desc. da ordem
		8,8	Acnomycetales
			Thermosporothrix
	8- Teto	18,8	*Ktedonobacter*
		16,4	Gênero desc. da ordem
			Acnomycetales
	9- Piso	31,7	*Acidobacteria Gp2*
		11,7	*Ktedonobacter*
	10- Espeleotema	16,1	*Acidobacteria Gp1*
		13,0	*Acidobacteria Gp2*
Caverna 3	11- Piso	53,6	*Acidobacteria Gp2*
		7,9	*Acidobacteria Gp1*
	12- Teto	9,8	*Acidobacteria Gp2*
		8,5	*Bradyrhizobium*
Caverna 4	13- Piso	36,1	*Acidobacteria Gp2*
		17,9	*Ktedonobacter*
Caverna 5	14- Piso	40,5	*Acidobacteria Gp2*
		6,6	*Ktedonobacter*
	15- Teto	26,6	*Acidobacteria Gp2*
		15,8	*Acidobacteria Gp1*
	16- Piso	27,2	*Acidobacteria Gp2*
		13,0	Gênero desc. da classe
			Ktedonobacteria
	17- Teto	27,1	*Acidobacteria Gp2*
		23,6	*Ktedonobacter*
	19- Teto	29,5	*Acidobacteria Gp2*
		5,8	*Ktedonobacter*
Caverna 6	20- Piso	34,8	*Acidobacteria Gp2*
		13,7	*Ktedonobacter*
	21- Piso	28,4	*Acidobacteria Gp2*
		7,3	*Acidobacteria Gp13*

	22- Teto	22,3	Gênero desc. da ordem
		17,6	Actinomycetales
			Acidobacteria Gp2
	23- Teto	23,6	*Acidobacteria Gp2*
		4,9	*Acidobacteria Gp1*
	24- Teto	26,3	*Burkholderia*
		14,7	*Acidobacteria Gp13*
Caverna 7	25- Piso	37,1	*Acidobacteria Gp1*
Controle		10,8	Gênero desc. da ordem
			Actinomycetales
	26- Teto	10,4	*Acidobacteria Gp3*
		10,1	*Ktedonobacter*
Caverna 8	27- Piso	25,5	*Ktedonobacter*
		14,7	*Mycobacterium*
	28- Piso	22,4	*Acidobacteria Gp2*
		8,3	*Acidobacteria Gp13*
	29- Teto	21,3	Gênero desc. da família
		10,6	Pseudonocardiaceae
			Acidobacteria Gp2
	30- Teto	27,0	*Acidobacteria Gp2*
		18,0	*Acidobacteria Gp13*

4.7. Diversidade biológica entre a caverna de quartzito e as cavernas de canga

Na tentativa de verificar diferenças intrínsecas entre a diversidade biológica das cavernas de canga frente a uma caverna de quartzito, a composição de gêneros da caverna controle foi comparada com todas as cavernas de canga individualmente. Foi possível observar que em algumas destas comparações pareadas, houve diferença significativa para alguns gêneros importantes. Na caverna 1 (Mariana 1) quando comparada com a caverna 7 (controle), 22 gêneros apresentaram diferenças significativas entre estas cavernas, sendo que 17 destes gêneros foram abundantes na caverna 1 (Mariana 1). As principais diferenças foram observadas com relação à abundância do gênero *Acidobacteria Gp2* na caverna 1(Mariana 1) e de um gênero desconhecido da Pseudonocardiaceae na caverna 7 (controle) (Figura 16).

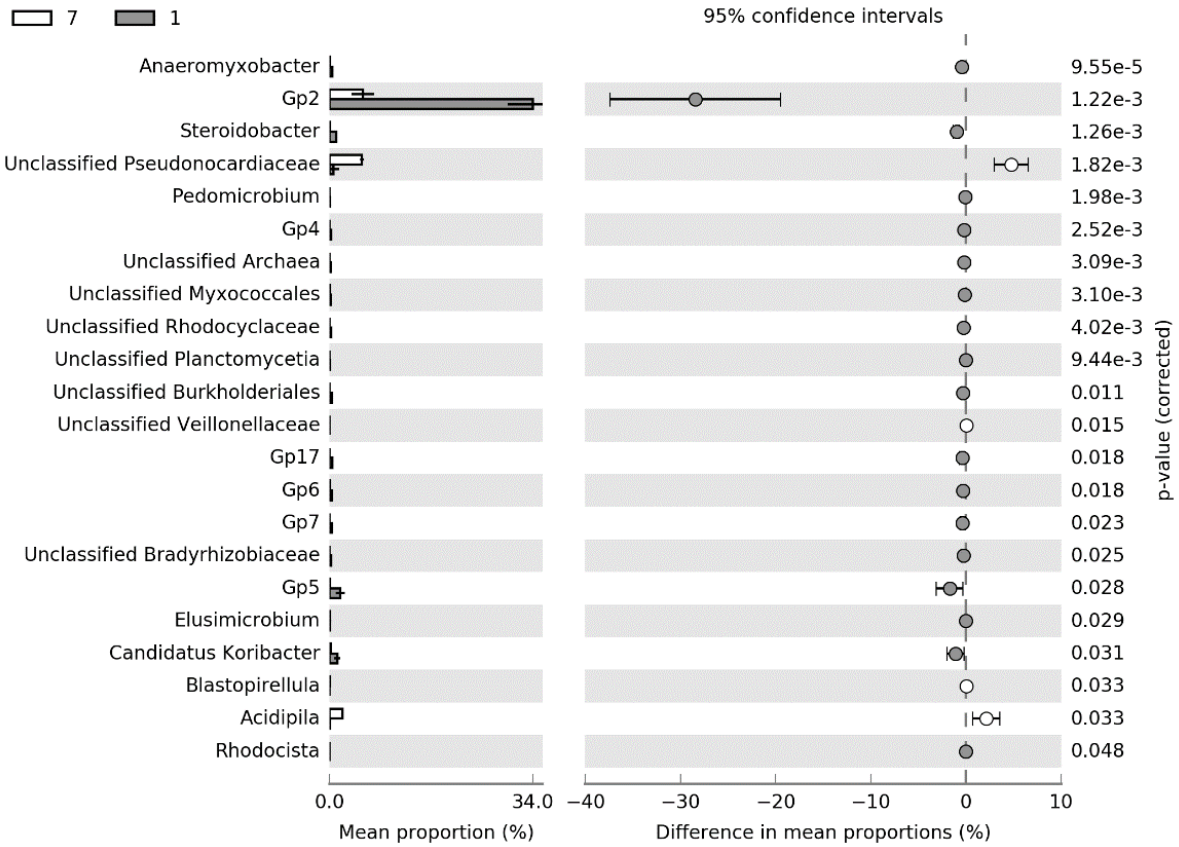

Figura 16. Análise comparativa em nível de gênero entre a caverna 1 (Mariana 1) e a caverna 7 (controle). Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software STAMP.

O gênero *Acidobacteria* Gp2 não é descrito com frequência na literatura (JONES *et al.*, 2009; NAETHER *et al.*, 2012) o que dificulta uma discussão mais profundada sobre estes resultados. No entanto, estas variações podem ser relevantes para futuros estudos que visem isolar estes microrganismos e posteriormente, permitindo assim conhecer a biologia e possível potencial biotecnológico destes organismos.

Já a família Pseudonocardiaceae inclui vários organismos com interesse industrial, sendo potenciais produtores de antibióticos como eritromicina, vancomicina e rifamicina (OKAZAKI *et al.*, 1983). Dessa forma, existe uma possibilidade real de isolar esses microrganismos de importância biotecnológica, haja visto o fato de protocolos já estarem bem definidos na literatura para isolamento de bactérias desta família a partir de amostras de solo (LU *et al.*, 2000).

Ao comparar a caverna 7 com a caverna 2 (Mariana 2), oito gêneros apresentaram diferença significativa, sendo sete gêneros mais abundantes na caverna 2. Mais uma vez um

gênero desconhecido da família Pseudonocardiaceae teve destaque pela abundância na caverna 7 (Figura 17).

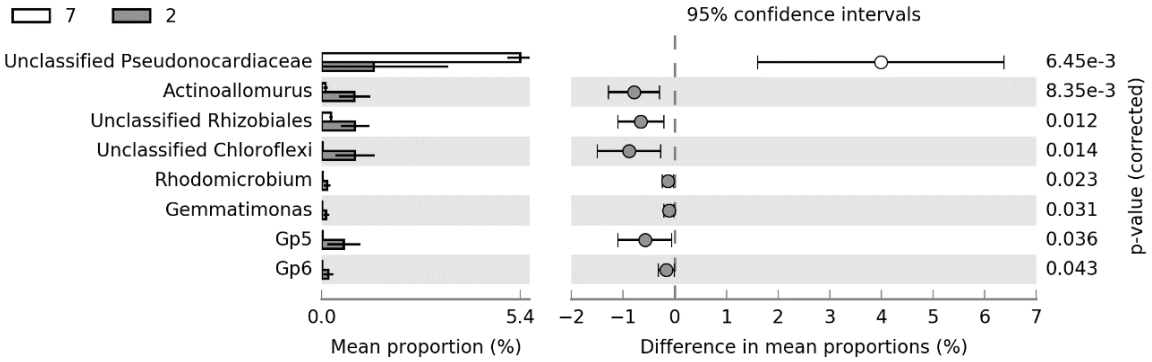

Figura 17. Análise comparativa em nível de gênero entre a caverna 2 e a caverna 7 (controle). Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software STAMP.

Curiosamente, na caverna 2 se destacaram dois gêneros desconhecidos, um pertencente a ordem Rhizobiales e o outro ao filo Chloroflexi. Gêneros da ordem Rhizobiales são conhecidos por apresentar associações a plantas e oferecer benefícios para seus hospedeiros, fornecendo precursores que caracterizam-se como metabólitos essenciais para plantas (VERGINER *et al.*, 2010) e muitos gêneros possuem a capacidade de fixação de nitrogênio (JAFTHA *et al.*, 2002; JOURAND *et al.*, 2004). Já o gênero *Actinoallomurus* é descrito sendo uma fonte promissora de novos metabólitos bioativos (POZZI *et al.*, 2011), com destaque para atividade antimicrobiana e antitumoral (MAZZETTI *et al.*, 2012).

Entre a caverna 7 e a caverna 3 (Mariana 3), 2 gêneros são mais abundantes na caverna 3, porém a principal diferença observada foi quanto a proporção de *Acidifila* na caverna 7 (Figura 18). Bactérias do gênero *Acidifila* foram classificadas como sendo de ambientes extremos, isoladas de águas ácidas e ricas em metal (FALAGÁN *et al.*, 2017). Já membros do gênero *Cystobacter* tem sido relatados como produtoras de ácido gefirônico, inibidor seletivo da síntese de proteínas eucarióticas (YOUNG *et al.*, 2013) e produção de antibióticos (KUNZE *et al.*, 1982). Com relação a abundância de *Acidobacteria Gp3*, investigações genômicas tem revelado a presença de uma superfamília de transportadores de membrana do tipo ABC com alta-afinidade por açúcares que podem ser fundamentais a adequação destes organismos em condições de carência nutricional (WARD *et al.*, 2009). Condições estas também observadas em cavernas de canga (CARMO *et al.*, 2012).

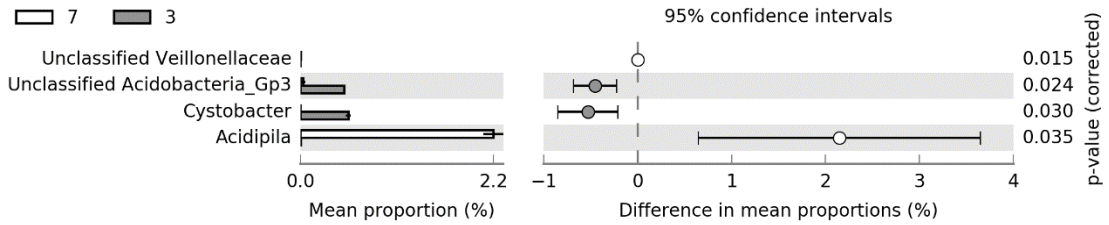

Figura 18. Análise comparativa em nível de gênero entre a caverna 7(controle) e caverna 3. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software STAMP.

Ao comparar a caverna 7 e a caverna 5 (Gandarela), 17 gêneros apresentaram diferença, sendo 13 mais abundantes na caverna 5, a maior diferença foi quanto a maior proporção de *Acidobacteria Gp2* na caverna 5 (Figura 19). Os membros do gênero *Nitrospira* são conhecidos serem bactérias oxidantes de nitrito, o que se apresenta de suma importância no ciclo biogeoquímico do N, contudo desvendar a complexidade microbiológica da nitrificação e outros processos do ciclo N, subsidiará a compreensão de estratégias de tratamento de águas residuais e poderá melhorar a eficiência da fertilização nitrogenada na agricultura (KOCH *et al.*, 2015). Como já descrito, pouco se sabe a respeito de *Acidobacteria Gp2*, mas certamente, a partir da abundância desse gênero se faz necessário estudos que visam elucidar seu potencial.

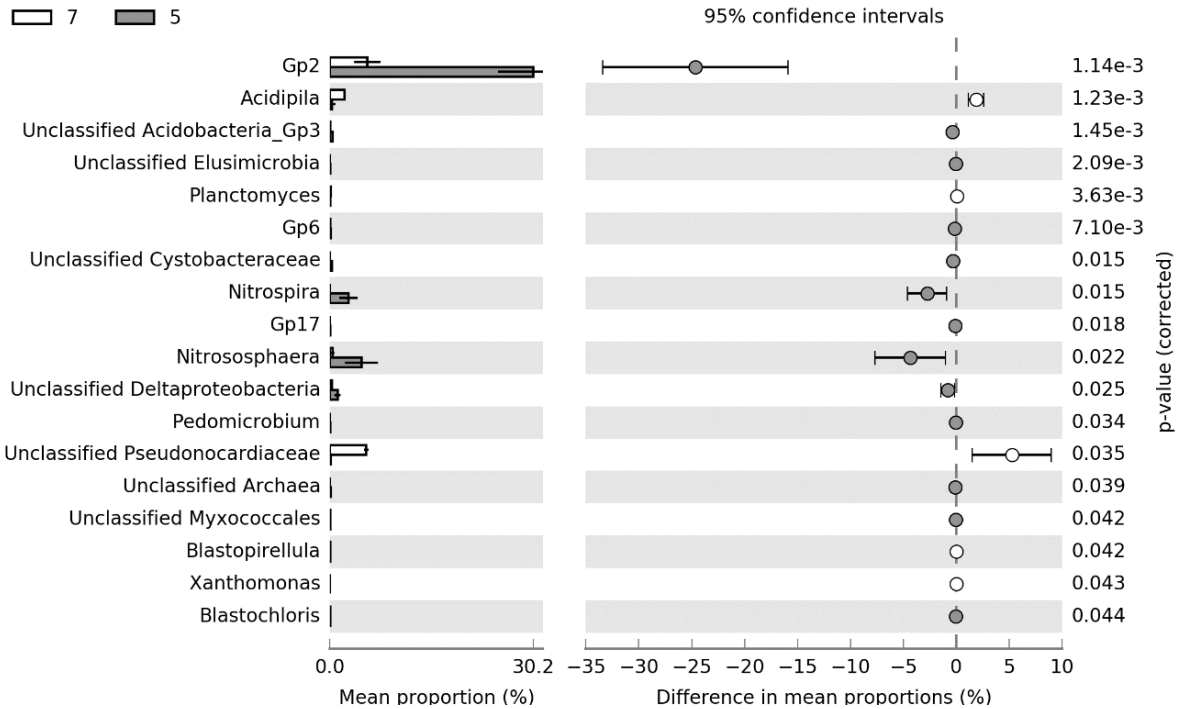

Figura 19. Análise comparativa em nível de gênero entre a caverna 7(controle) e caverna 5. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software STAMP.

A comparação da caverna 7 com a caverna 6 (Lavras Novas), 15 gêneros apresentaram diferença, sendo 13 com maior abundância na caverna 6, a maior proporção de *Acidobacteria Gp2* na caverna 6, enquanto a caverna 7 apresentou maior proporção para *Acidipila* e para gênero desconhecido da família Pseudonocardiaceae (Figura 20).

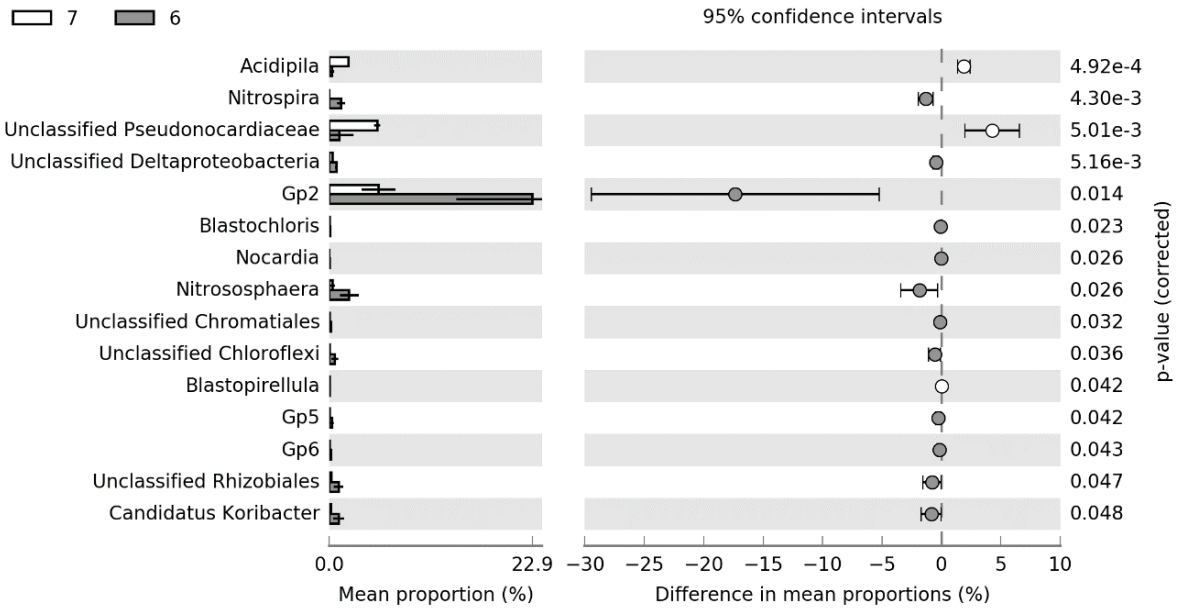

Figura 20. Análise comparativa em nível de gênero entre a caverna 7(controle) e caverna 6. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software STAMP.

Ao comparar a caverna 7 com a caverna 8 (Serra da Moeda), a caverna 7 apresentou maior proporção de *Planctomyces* (Figura 21). O gênero *Planctomyces* em estudos recentes apresentou capacidade antimicrobiana e potencial para produção de myxalamida (GRACA *et al.*, 2016) e como sendo fonte promissora para pequenas moléculas que a partir de novos trabalhos podem levar a novos antibióticos (JESKE *et al.*, 2013).

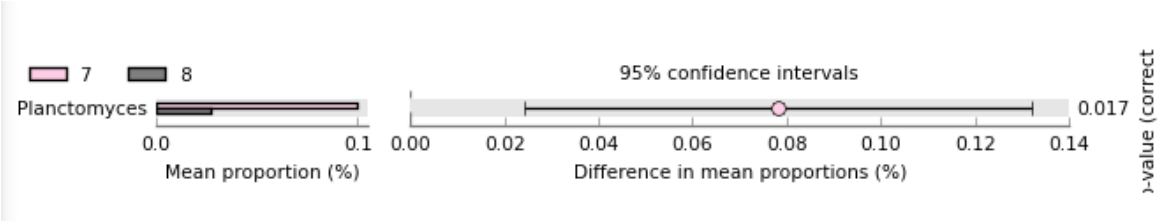

Figura 21. Análise comparativa em nível de gênero entre a caverna 7(controle) e caverna 8. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software STAMP.

Não houve diferenças entre a caverna 7 e a caverna 4 em nível de gênero.

A partir destes resultados, pode-se finalizar ressaltando as cavernas de canga apresentam maior diversidade que a caverna controle, demonstrado pela abundância de gêneros em praticamente todas as cavernas de canga quando comparadas com a caverna controle.

4.8. Análise da diversidade específica entre piso e teto das cavernas

Com o propósito de especificar as diferenças na diversidade biológica entre piso e teto das cavernas, todas as amostras de piso e teto foram agrupadas e comparadas entre si (Figura 22).

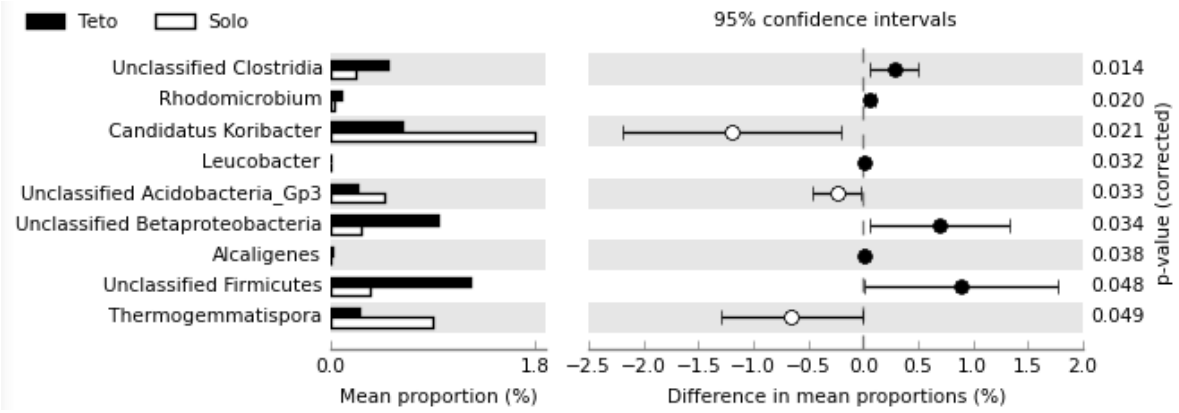

Figura 22. Análise comparativa em nível de gênero entre solo (piso) e teto. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software STAMP.

Um total de nove gêneros apresentaram diferenças significativas entres estas origens, seis gêneros mais abundantes no teto e 3 gêneros mais abundantes no piso. Como relatado por outros autores a estrutura da comunidade microbiana de cavernas pode sofrer alterações conforme variações geoquímicas da rocha que se desenvolvem (BEGON *et al.*, 1998; BARTON *et al.*, 2007). Os micro nichos minerais das cavernas controlam as populações microbianas subterrâneas (BARTON e NORTHUP, 2007), ou seja a colonização microbiana de superfícies é conduzida pela química do rocha e os requerimentos e tolerâncias metabólicas do organismo, sugerindo que as comunidades microbianas subterrâneas possuem associações específicas para minerais específicos (RIQUELME *et al.*, 2015).

Desta forma, microrganismos associados a estas cavernas estudadas parecem ter direta relação com as características geológicas destas cavidades, dentre outros fatores, como previamente descrito por Adetutu *et al.* (2011) em outro contexto. O mesmo pode ser

extrapolado para as diferenças observadas entre a diversidade microbiana encontrada em piso e teto destas cavernas reiterando as diferenças na estrutura geológica entre estes estratos (Timo e Timo (2016).

4.9. Diversidade das cavernas da Chapada de canga: um reservatório microbiológico a ser preservado

A Chapada de canga, localizada a leste do QF, se estende por cerca de 3.900 ha e localiza-se no extremo norte do município de Mariana, sul do município de Catas Altas e oeste de Alvinópolis (CARMO e KAMINO, 2017). Esta região está cercada por áreas de mineração, o que a torna altamente vulnerável (Figura 23).

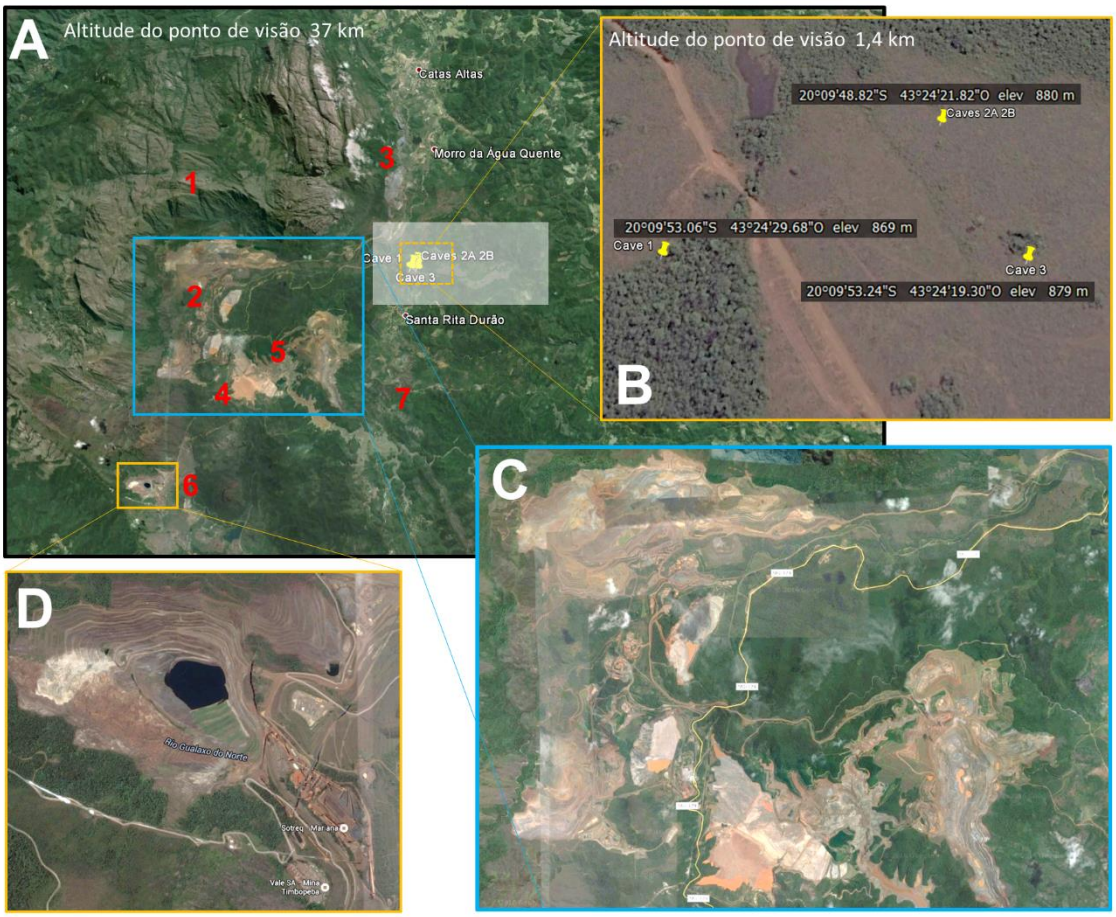

Figura 23. Localização da Chapada de Canga. (A) Relação entre localização e contexto ambiental da Chapada de Canga. O retângulo branco destaca a região onde se localiza a chapada. No seu interior, a região demarcada por um retângulo pontilhado em amarelo destaca os pontos onde se localizam as cavernas amostradas neste estudo e detalhadas em B. Os números em vermelhos identificam: 1 – Serra do Caraça; 2 – Complexos minerários de extração da empresa Samarco™ e Vale™; 3 – Complexo minerário da empresa Vale™; 4 – Barragem de

rejeitos de Germano; 5 – Barragem de rejeitos de Fundão (recentemente rompida); 6 – Campo de extração de minérios da empresa Vale™ Mina Timbopeba; 7 – Distrito de Bento Rodrigues. (C e D) Destacam as respectivas áreas degradadas assinaladas em A. Fonte: Villa *et al.* (2017).

Além dos campos de mineração, nas proximidades da Chapada encontram-se ainda as barragens de rejeito de Germano e de Fundão, esta última sofreu rompimento em 2015 causando prejuízos de ordem ambientais, econômicos e sociais (FREITAS *et al.*, 2016; LOPES, 2016), sem mencionar o dano ao patrimônio genético local.

Dado a sua importância no contexto biológico, esta região recentemente foi destacada em uma obra como sendo uma relevante candidata para criação de áreas protegidas (Figura 24). Isso porque agrega a sobreposição a diversas áreas prioritárias para conservação contendo elevada diversidade biológica, com a presença de espécies de raras e ameaçadas de extinção na vegetação associada a afloramento de canga, geológica e ambiental até agora inventariada (CARMO e KAMINO, 2017).

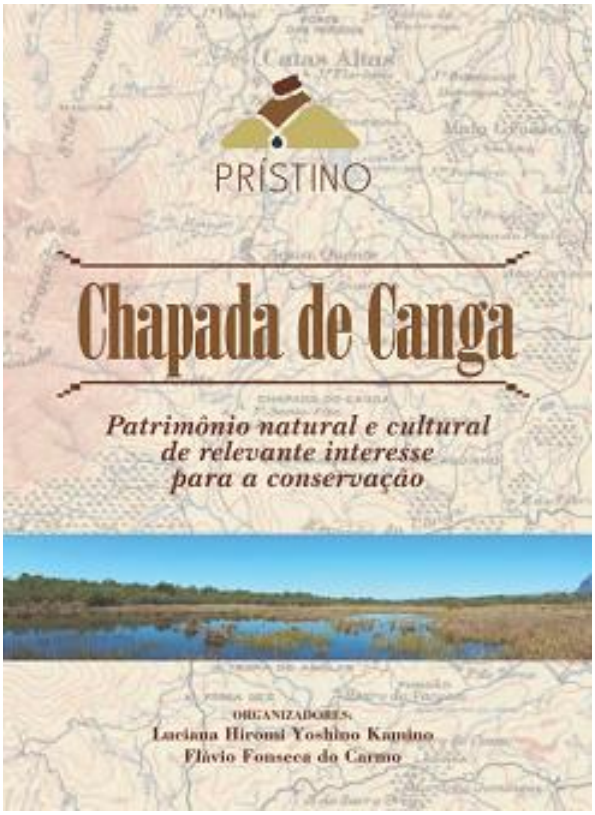

Figura 24. Capa do Livro Chapada de Canga: Patrimônio natural e cultural de relevante interesse para a conservação. Nosso grupo de pesquisa contribuiu escrevendo um capítulo para este livro, intitulado "Microbiota associada à Chapada de Canga: patrimônio genético mineiro com potencial negligenciado", em que

apresentamos resultados dessas três cavernas de isolados bacterianos que possuem capacidade de resistir a formas de arsênio, um metaloide pesado, muito presente nos solos e rios da região.

As cavernas deste trabalho que se localizam na região da Chapada de canga, em Mariana, estão geograficamente próximas (Figura 23B). No entanto, foi demonstrado que o ponto de saturação da curva de rarefação entre as três cavernas é bastante distinto (Figura 9). Análise da riqueza em nível de gênero revelou que, em outras palavras, a riqueza encontrada nessas cavernas é bastante diferenciada mesmo localizando-se próximas umas em relação a outras. Este fato além de curioso, chama a atenção por fornecer ainda mais subsídios para a caracterização de esta área para conservação, como fora descrito para plantas e animais que sobrevivem na região (CARMO e KAMINO, 2017).

Uma observação relevante é que na curva de rarefação, a caverna 3 apresenta a menor riqueza, porém a diversidade dela é maior entre as cavernas da Chapada de canga, em Mariana, considerando o número de OTUs específicas presentes (Figura 25).

Adicionalmente, a maior diversidade encontrada no piso foi na caverna 2, com 27 OTUs específicas (2,1%), enquanto que a maior diversidade de teto foi observada na caverna 3 com 38 OTUs específicas (22,5%) (Figura 25). Estes resultados corroboram o fato que a origem das amostras proporciona interferência na composição e estrutura da microbiota.

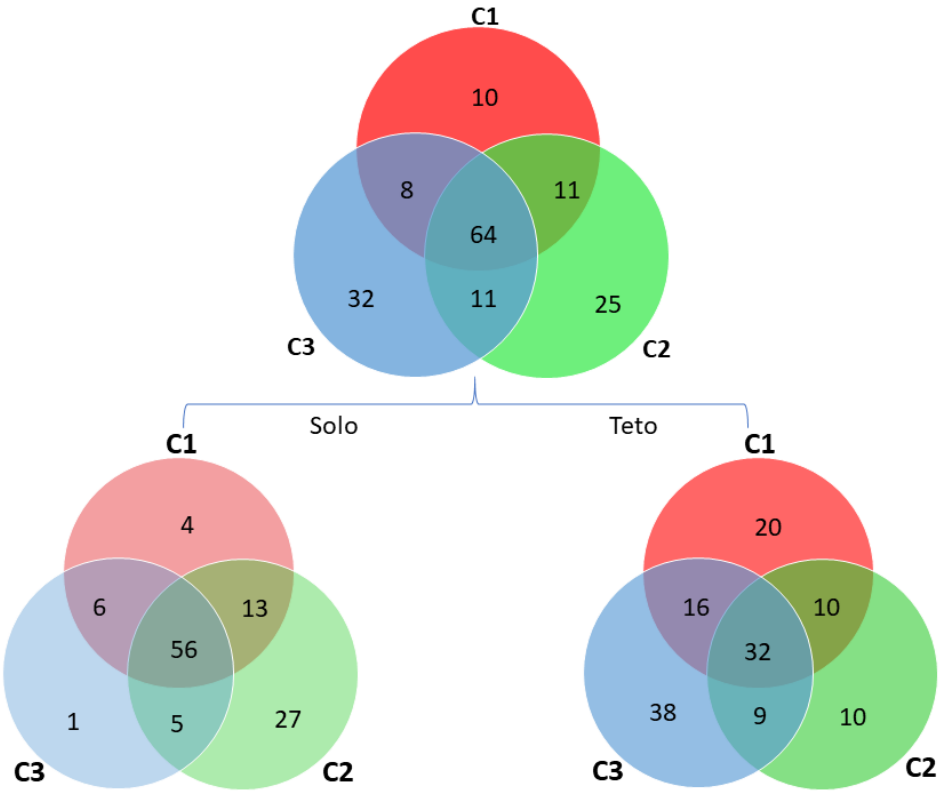

Figura 25. Diagrama de Venn representando as três cavernas da Chapada de canga, em Mariana. As amostras de piso/solo e teto demonstram diferenças de abundância e de diversidade entre as cavernas.

Entre os pisos das cavernas, em nível de classe, a maior abundância foi representada pelo grupo das Alphaproteobacterias (Tabela 4). Dados dos primeiros estudos de metagenoma, mais especificamente envolvendo sequenciamento *shotgun* de amostra ambiental do Mar Sargasso, revelou que Alphaproteobacteria é um dos grupos mais cosmopolita de toda Terra (VENTER *et al.*, 2004), possuindo grande variabilidade em capacidade metabólica, morfologia e ciclo de vida (BATUT *et al.*, 2004), além de habitarem diversificados nichos, de água a solo e de serem capazes de formar associações intra e extra-celulares com organismos eucariotos (LA SCOLA *et al.*, 2004).

Já entre os tetos, as classes mais abundantes foram Actinobacteria e Betaproteobacteria (Tabela 5). As actinobacterias, como já descrito apresentam um grande potencial biotecnológico, com grande interesse, principalmente na indústria farmacêutica, em busca de novos antibióticos. A classe Betaproteobacteria também pode ser importante neste sentido, uma vez que alguns membros apresentam um grande número de *clusters* de genes essenciais para a biossíntese de produtos naturais, muitas vezes até considerada uma classe produtora de antibióticos negligenciada (BALDIM *et al.*, 2017).

Tabela 4. OTUs classificadas nos pisos das cavernas de canga, em Mariana.

		Solo – Caverna 1		
Filo	**Classe**	**Ordem**	**Família**	**Gênero**
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Other
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Other
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Flavobacterium*
Crenarchaeota*	Thermoprotei	Thermoproteales	Other	Other
		Solo – Caverna 2		
Filo	**Classe**	**Ordem**	**Família**	**Gênero**
Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Telmatobacter	Telmatobacter	*Telmatobacter*
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacteriaceae	*Mycobacterium*
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Thermomonosporaceae	Other
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	*Rhodomicrobium*
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	*Acidisoma*
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Other	Other
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	Other
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	*Novosphingobium*
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	*Lysinibacillus*
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae 2	*Oxalophagus*
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	*Chitinimonas*
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Variovorax*
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Other
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	*Georgfuchsia*
Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacterales	Thermoanaerobacteraceae	Other
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangiaceae	*Jahnella*
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Dyella*
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Rhodanobacter*
Bacteroidetes	Other	Other	Other	Other

Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Other
Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	*Aquisphaera*
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	*Ferruginibacter*
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Other	Other
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	*Mucilaginibacter*
candidate division WPS-1	WPS-1_genera_incertae_sedis	WPS-1_genera_incertae_sedis	WPS-1_genera_incertae_sedis	*WPS-1_genera_incertae_sedis*
candidate division WPS-2	WPS-2_genera_incertae_sedis	WPS-2_genera_incertae_sedis	WPS-2_genera_incertae_sedis	*WPS-2_genera_incertae_sedis*
		Solo – Caverna 3		
Filo	**Classe**	**Ordem**	**Família**	**Gênero**
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	*Pseudolabrys*

Tabela 5. OTUs classificadas nos tetos cavernas de canga, em Mariana.

Teto – Caverna 1				
Filo	**Classe**	**Ordem**	**Família**	**Gênero**
Acidobacteria	Acidobacteria_Gp15	Gp15	Gp15	*Gp15*
Acidobacteria	Acidobacteria_Gp17	Gp17	Gp17	*Gp17*
Acidobacteria	Acidobacteria_Gp4	Gp4	Gp4	*Gp4*
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	*Pedomicrobium*
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Other
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Other	Other
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Other
Armatimonadetes	Chthonomonadetes	Chthonomonadales	Chthonomonadaceae	*Chthonomonas/Armatimonadetes*
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacteraceae	Other
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	*Vampirovibrio*
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bacteriovoracaceae	*Bacteriovorax*
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	*Desulfacinum*
Elusimicrobia	Elusimicrobia	Elusimicrobiales	Elusimicrobiaceae	*Elusimicrobium*
Other*	Other	Other	Other	Other
Elusimicrobia	Other	Other	Other	Other
Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Other
Spirochaetes	Spirochaetia	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Other
Crenarchaeota*	Thermoprotei	Thermoproteales	Other	Other
Woesearchaeota*	Woesearchaeota Incertae Sedis AR15	Woesearchaeota Incertae Sedis AR15	Woesearchaeota Incertae Sedis AR15	*Woesearchaeota Incertae Sedis A*
Teto – Caverna 2				
Filo	**Classe**	**Ordem**	**Família**	**Gênero**
Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidipila	Acidipila	*Acidipila*
Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacterales	Other	Other
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Dyella*
Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	Iamiaceae	*Iamia*

Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	*Streptacidiphilus*
Actinobacteria	Actinobacteria	Other	Other	Other
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	*Methylocapsa*
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Other
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	*Methylocystis*
		Teto – Caverna 3		
Filo	**Classe**	**Ordem**	**Família**	**Gênero**
Acidobacteria	Acidobacteria_Gp10	Gp10	Gp10	*Gp10*
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Thermomonosporaceae	Other
Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	Other	Other
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Dietziaceae	*Dietzia*
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	*Microbacterium*
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Thermomonosporaceae	*Spirillospora*
Actinobacteria	Actinobacteria	Gaiellales	Gaiellaceae	*Gaiella*
Actinobacteria	Actinobacteria	Rubrobacterales	Rubrobacteraceae	*Rubrobacter*
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	*Phenylobacterium*
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Other	Other
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	*Rhizobium*
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	*Sphingobium*
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	*Lysinibacillus*
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	Other
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	*Staphylococcus*
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	*Streptococcus*
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	*Alloprevotella*
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	*Alcaligenes*
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	*Ralstonia*
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiales_incertae_sedis	*Aquabacterium*
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiales_incertae_sedis	*Tepidimonas*

4.10. Comparação entre os estratos de coleta na Caverna 2, em Mariana

Ao comparar o piso, teto e espeleotema da caverna 2, a diversidade é diferente, sendo a maior no piso (Figura 26). Entre o espeleotema e o teto, curiosamente, ficou demonstrado que há diferença significativa na composição de suas microbiotas. Isso pode ser justificado pela formação do espeleotema, uma vez que o solo em cima da caverna pode estar compartilhando a microbiota, em decorrência de infiltrações e escoamentos que originam, ao longo do tempo, estas estruturas. As maiores abundâncias, em nível de classe, no piso foi Betaproteobacteria e Alphaproteobacteria, no teto Actinobacteria e no espeleotema Deltaproteobacteria e Betaproteobacteria (Tabela 6). A microbiota exclusiva do piso representa 23,7%, do teto 14,7% e do espeleotema a 16,1% de todas das OTUs identificadas.

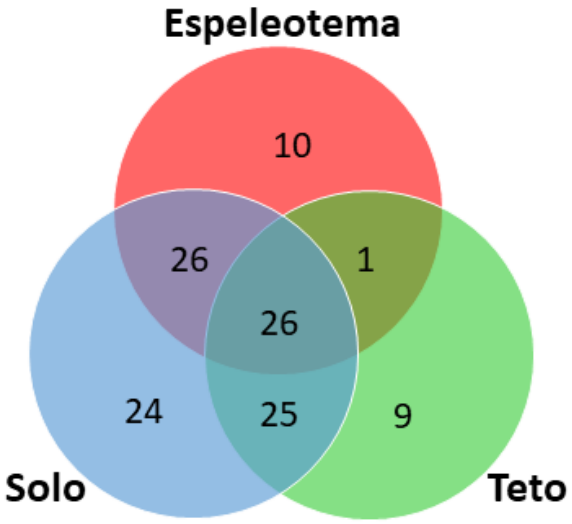

Figura 26. Diagrama de Venn dos diferentes pontos de coleta caverna 2, localizada na Chapada de canga, em Mariana.

Os espeleotemas apresentam diversidade mineralógica, como óxidos e hidróxidos de ferro, fosfatos e sulfatos (PILÓ *et al.*, 2015), isso pode contribuir na composição da microbiota que desempenha um papel fundamental na acumulação de depósitos minerais microbianos (SALLSTEDT *et al.*, 2014). Em um estudo de metagenômica, Deltaproteobacteria já teve seus genes relacionados com o metabolismo de carbono, nitrogênio e enxofre, e a classe foi identificada como microrganismos relacionados a redução de sulfato (ANDREOTE *et al.*, 2012).

Tabela 6. OTUs classificadas no piso(solo), teto e espeleotema na caverna 2, na chapada de canga, em Mariana.

Caverna 2 - Solo				
Filo	**Classe**	**Ordem**	**Família**	**Gênero**
Acidobacteria	Acidobacteria_Gp7	Gp7	Gp7	Gp7
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Thermomonosporaceae	Other
Bacteroidetes	Bacteroidetes_incertae_sedis	Ohtaekwangia	Ohtaekwangia	Ohtaekwangia
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Mucilaginibacter
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae 2	Oxalophagus
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	Lysinibacillus
Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacterales	Thermoanaerobacteraceae	Other
Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Other	Other
Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Aquisphaera
Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Other
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Blastochloris
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	Other
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Other	Other
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Chitinimonas
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Variovorax
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Other
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Other	Other
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Rhodanobacter
candidate division WPS-1	WPS-1_genera_incertae_sedis	WPS-1_genera_incertae_sedis	WPS-1_genera_incertae_sedis	WPS-1_genera_incertae_
candidate division WPS-2	WPS-2_genera_incertae_sedis	WPS-2_genera_incertae_sedis	WPS-2_genera_incertae_sedis	WPS-2_genera_incertae_

Caverna 2 - Teto				
Filo	**Classe**	**Ordem**	**Família**	**Gênero**
Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	Iamiaceae	Iamia

Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	Propionibacterium
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Pseudonocardiaceae	Crossiella
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Pseudonocardiaceae	Pseudonocardia
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	Streptacidiphilus
Actinobacteria	Actinobacteria	Other	Other	Other
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylocapsa
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	Methylocystis
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Stenoxybacter

Caverna 2 - Espeleotema

Filo	**Classe**	**Ordem**	**Família**	**Gênero**
Elusimicrobia	Other	Other	Other	Other
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Skermanella
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Ferrovales	Ferrovaceae	Ferrovum
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Gallionellales	Gallionellaceae	Sideroxydans
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Other	Other	Other
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	Bdellovibrio
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Geobacteraceae	Geobacter
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacteraceae	Anaeromyxobacter
Spirochaetes	Spirochaetia	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Other

CONCLUSÕES

Este trabalho retrata pela primeira vez que existe uma alta diversidade de microrganismos nas cavernas de canga do QF, o que coloca o patrimônio biológico e biotecnológico em evidência, como por exemplo, microrganismos identificados como sendo dos Filos Actinobacteria e Cloroflexi e gêneros *Actinoallomurus* e *Cystobacter* de importância na farmácia e no setor agrícola.

Esta diversidade é notória quando cavernas de canga são comparadas com uma caverna de quartzito. Resultado este ainda mais evidenciado quanto os substratos piso e teto são investigados isoladamente, sendo que o teto apresenta uma diversidade maior pois na análise de β-diversidade, as amostras se demonstraram ser classificadas filogeneticamente mais distantes.

Dentre as cavernas investigadas, uma caverna da Chapada de Canga apresentou maior riqueza que todas as outras cavernas, mesmo não fazendo parte de áreas de proteção ambiental. Enquanto que a análise comparativa desta diversidade biológica entre as cavernas da Chapada de canga revelou que apesar de estarem muito próximas entre si, apresentam composições de comunidade microbianas distintas, o que reitera a importância de transformar esta região em uma área de proteção ambiental.

Apesar dos avanços inerentes a partir destes resultados, outras análises relacionadas a fatores geológicos e geomorfológicos serão realizadas como aferir a concentração de ferro e sílica dos itabiritos, classificar a idade das cangas e destacar a projeção horizontal das cavernas a fim de melhor elucidar os resultados.

PERSPECTIVAS

Temos a perspectiva de publicarmos um trabalho de qualidade envolvendo os resultados apresentados, colocando em evidência a experiência da equipe e capacidade do laboratório, no primeiro trabalho de metagenômica totalmente realizado nas dependências da UFOP.

Além disso, diante destes resultados apresentados, pretendemos nos aprofundar em estudos funcionais desta microbiota, agora em nível de doutoramento. O objetivo é destacar este potencial biotecnológico a partir do isolamento de bactérias cultiváveis destas cavernas.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O MESTRADO

- **Participação em projetos que geraram artigos publicados:**

Lima, L. G. F.; Pereira, C. C. O.; **Lemes, C. G. C.**; Silva, A. R.; Silva, J. O.; Estrela, D. C.; Malafaia, G.; Menezes, I. P. P. Leaf conditioning of Brazilian Cerrado species for DNA microextraction. *African Journal of Biotechnology*, Nairobi, v. 16, n. 25, p. 1379-1385, 2017.

Felestrino, É. B.; Assis, R. A.; **Lemes, C. G. C.;** Cordeiro, I. F.; Fonseca, N. P.; Villa, M. M.; Vieira, I. T.; Kamino, L. H. Y.; Carmo, F. F.; Moreira, L. M. *Alcaligenes faecalis* associated with *Mimosa calodendron* rizhosphere assist plant survival in arsenic rich soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, Temuco, v. 17, n. 4, p. 1102-1115, 2017.

- **Capítulo de livro publicado:**

Villa, M. M.; **Lemes, C. G. C.**; Moreira, L. M. Microbiota associada à Chapada de Canga: patrimônio genético mineiro com potencial biotecnológico negligenciado. In: Carmo, F. F.; Kamino, L. H. Y. (Org.). Chapada de Canga: patrimônio natural e cultural de relevante interesse para a conservação. 1 ed. Belo Horizonte – MG : 3i Editora, 2017, v. 1, p. 341-359.

- **Resumos publicados em anais de congressos**

Lemes, C. G. C.; Villa, M. M.; Felestrino, E. B.; Kamino, L. H. Y.; Carmo, F. F.; Moreira, L. M. Potencial biotecnológico de isolados bacterianos obtidos em cavernas de canga do quadrilátero ferrífero. In: IV Simpósio de Microbiologia da UFMG - Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia, 2017, Belo Horizonte - MG. Caderno de Resumos do IV IV Simpósio de Microbiologia da UFMG. Belo Horizonte-MG: UFMG, 2017. p. 130-130.

Felestrino, E. B.; Assis, R. A. B.; **Lemes, C. G. C.**; Cordeiro, I. F.; Fonseca, N. P.; Villa, M. M.; Vieira, I. T.; Kamino, L. H. Y.; Carmo, F. F.; Carriao, C.; Setubal, J. C.; Almeida-Junior, N.; Moreira, L. M. Análise genômica de *Alcaligenes faecalis* MC250: uma rizobactéria adaptada a campos rupestres ferruginosos. In: IV Simpósio de Microbiologia da UFMG - Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia,

2017, Belo Horizonte- MG. Caderno de Resumos do IV Simpósio de Microbiologia da UFMG. Belo Horizonte- MG: UFMG, 2017. p. 126-126.

Caneschi, W. L.; Felestrino, E. B.; Assis, R. A. B.; **Lemes, C. G. C.**; Cordeiro, I. F.; Fonseca, N. P.; Villa, M. M.; Vieira, I. T.; Kamino, L. H. Y.; Carmo, F. F.; Sanchez, A. B.; Garcia, C. C. M.; Almeida-Junior, N.; Ferro, J. A.; Ferro, M. I. T.; Varani, A. M.; Marini, R.; Santos, V. L.; Cassia, U.; Setubal, J. C.; Moreira, L. M. . O primeiro genoma completo de *Serratia liquefaciens*, associada a planta de campos ferruginosos, revelou distintos mecanismos adaptativos para sobrevivência em ambiente inóspito. In: IV Simpósio de Microbiologia da UFMG - Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia, 2017, Belo Horizonte - MG. Caderno de Resumos do IV Simpósio de Microbiologia da UFMG. Belo Horizonte - MG: UFMG, 2017. p. 124-124.

Caneschi, W. L.; Felestrino, E. B.; Assis, R. A. B.; **Lemes, C. G. C.**; Cordeiro, I. F.; Fonseca, N. P.; Villa, M. M.; Vieira, I. T.; Kamino, L. H. Y.; Carmo, F. F.; Sanchez, A. B.; Garcia, C. C. M.; Almeida-Junior, N.; Ferro, J. A.; Ferro, M. I. T.; Varani, A. M.; Marini, R.; Santos, V. L.; Cassia, U.; Setubal, J. C.; Moreira, L. M. Prospecção de bactérias cultiváveis de campos ferruginosos: novas possibilidades biotecnológicas a partir de um estudo piloto. In: IV Simpósio de Microbiologia da UFMG - Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia, 2017, Belo Horizonte - MG. Caderno de Resumos do IV Simpósio de Microbiologia da UFMG. Belo Horizonte: UFMG, 2017. p. 41-41.

Lemes, C. G. C.; Villa, M. M.; Felestrino, E. B.; Perucci, L. O.; Kamino, L. H. Y.; Carmo, F. F.; Carvalho, F. M. S.; Cepeda, J. C. C.; Ferro, J. A.; Moreira, L. M. Potencial biotecnológico de isolados bacterianos obtidos em cavernas de canga do quadrilátero ferrífero. In: I Mostra de Pós-Graduação da UFOP. ENCONTRO DE SABERES, 2017, Ouro Preto - MG. Anais do Encontro de Saberes 2017 - I Mostra de Pós Graduação, 2017.

Villa, M. M.; **Lemes, C. G. C.**; Felestrino, E. B.; Kamino, L. H. Y.; Carmo, F. F.; Moreira, L. M. Bioprospecção bacteriana em cavernas de canga no Quadrilátero Ferrífero. In: XXV Seminário de Iniciação Científica da UFOP. ENCONTRO DE SABERES, 2017, Ouro Preto - MG. Anais do Encontro de Saberes 2017 - Semana de Iniciação Científica, 2017.

Lemes, C. G. C.; Caneschi, W. L.; Felestrino, E. B.; Villa, M. M.; Assis, R. A. B.; Vieira, I. T.; Cordeiro, I. F.; Fonseca, N. P.; Kamino, L. H. Y.; Carmo, F. F.; Moreira, L. M. Adaptation of plants in ferruginous fields might be dependent of specific bacteria: a preliminary study. In: III International Symposium on Microbiology and Biotechnology, 2016, Viçosa-MG. Annals of III International Symposium on Microbiology and Biotechnology. Viçosa-MG: Editora UFV, 2016. p. 214-214.

Felestrino, E. B.; **Lemes, C. G. C.**; Assis, R. A. B.; Villa, M. M.; Vieira, I. T.; Cordeiro, I. F.; Fonseca, N. P.; Kamino, L. H. Y.; Carmo, F. F.; Moreira, L. M. *Dechloromonas* sp. isolated from the endemic plant *Mimosa calodendrum*: potential remediation for environments contaminated with arsenic. In: III International Symposium on Microbiology and Biotechnology, 2016, Viçosa-MG. Annals of III International Symposium on Microbiology and Biotechnology. Viçosa-MG: Editora UFV, 2016. p. 180-180.

Vieira, I. T.; Felestrino, E. B.; **Lemes, C. G. C.**; Caneschi, W. L.; Villa, M. M.; Assis, R. A. B.; Cordeiro, I. F.; Fonseca, N. P.; Kamino, L. H. Y.; Carmo, F. F.; Moreira, L. M. Bacterial isolates from endemic plants:a bioprospection in iron quadrangle for potencial biofertilizers targets. In: III International Symposium on Microbiology and Biotechnology, 2016, Viçosa-MG. Annals of III International Symposium on Microbiology and Biotechnology, 2016. p. 238-238.

Villa, M. M.; Felestrino, E. B.; **Lemes, C. G. C.**; Assis, R. A. B.; Vieira, I. T.; Cordeiro, I. F.; Fonseca, N. P.; Kamino, L. H. Y.; Carmo, F. F.; Moreira, L. M. Bacteria associated with endemic plants from ferrouginous rupestrian grasslands as growth inhibitors for the phytopathogen *Xanthomonas citri*. In: III International Symposium on Microbiology and Biotechnology, 2016, Viçosa-MG. Annals of III International Symposium on Microbiology and Biotechnology, 2016. p. 65-65.

- **Premiação:**

Best work of the poster session of the Structural Biochemistry and Molecular Biology Area, master level, II International Symposium on Biological Sciences, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

- **Mini-cursos ministrados:**

Lemes, C. G. C.; Assis, R. A. B.; Fonseca, N. P. Introdução a ferramentas de Bioinformática. IV Curso de Verão em Biotecnologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

- **Palestras ministradas:**

Lemes, C. G. C.; Assis, R. A. B. Sequenciamento de DNA: princípios, métodos e aplicações. 2017.

- **Participação em eventos:**

II International Symposium on Biological Sciences, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

I Mostra de Pós-Graduação da UFOP / Encontro de Saberes. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

IV Simpósio de Microbiologia da UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

XIII Curso de inverno de Genética. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2017.

III International Symposium on Microbiology and Biotechnology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

- **Organização de eventos:**

Lemes, C. G. C.; Moreira, P. A.; Borges, W. C.; Cristiano, M. P. IV Curso de Verão em Biotecnologia, Universidade Federal de Ouro Preto, 2017.

- **Formação complementar:**

Treinamento Operacional nas Plataformas Ion Torrent (PGM) e Ion Chef. Thermo Fisher Scientific, Brasil, 2017.

Bioinformática no estudo da diversidade microbiana. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil, 2017.

REFERÊNCIAS

ABAYASEKARA, L. M. et al. Detection of bacterial pathogens from clinical specimens using conventional microbial culture and 16S metagenomics: a comparative study. **BMC Infect Dis,** v. 17, n. 1, p. 631, Sep 19 2017.

ADETUTU, E. M. et al. Phylogenetic diversity of fungal communities in areas accessible and not accessible to tourists in Naracoorte Caves. **Mycologia,** v. 103, n. 5, p. 959-68, Sep-Oct 2011.

ALI, R. et al. Role of Polymerase Chain Reaction (PCR) in the detection of antibiotic-resistant Staphylococcus aureus. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics,** v. 15, n. 3, p. 293-298, 2014/07/01/ 2014.

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

ANDREOTE, F. D. et al. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS One,** v. 7, n. 6, p. e38600, 2012.

AULER, A. S. **Relevância de cavidades naturais subterrâneas: contextualização, impactos ambientais e aspectos jurídicos**. Ministério de Minas e Energia (MME). Brasília p.166. 2006

AULER, A. S.; PILÓ, L. B. Introdução às cavernas em minério de ferro e canga. **O Carste,** v. 17, n. 3, p. 70 - 72, 2005.

AXENOV-GRIBANOV, D. V. et al. Actinobacteria Isolated from an Underground Lake and Moonmilk Speleothem from the Biggest Conglomeratic Karstic Cave in Siberia as Sources of Novel Biologically Active Compounds. **PLoS One,** v. 11, n. 2, p. 1 - 12, 2016.

BALDIM, J. L. et al. A strategy for the identification of patterns in the biosynthesis of nonribosomal peptides by Betaproteobacteria species. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 10400, Sep 4 2017.

BARKA, E. A. et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 80, n. 1, p. 1-43, Mar 2016.

BARNS, S. M. et al. Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. **Appl Environ Microbiol,** v. 73, n. 9, p. 3113-6, May 2007.

BARTON, H. A. et al. Microbial diversity in a Venezuelan orthoquartzite cave is dominated by the Chloroflexi (Class Ktedonobacterales) and Thaumarchaeota Group I.1c. **Front Microbiol,** v. 5, p. 615, 2014.

BARTON, H. A.; NORTHUP, D. E. Geomicrobiology in cave environments: Past, current and future perspectives. **Journal of Cave and Karst Studies,** v. 69, n. 1, p. 163-178, 2007.

BARTON, H. A. et al. The impact of host rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments. **International Journal of Speleology,** v. 36, n. 2, p. 93-104, 2007.

BATUT, J.; ANDERSSON, S. G.; O'CALLAGHAN, D. The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. **Nat Rev Microbiol,** v. 2, n. 12, p. 933-45, Dec 2004.

BEGON, M.; HARPER, J. L.; TOWNSEND, C. R. **Ecology: Individuals, Populations and Communities**. 3 ed. Cambridge Blackwell Scientific Publications, 1998. 1068.

BHULLAR, K. et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. **PLoS One,** v. 7, n. 4, p. e34953, 2012.

BJORNSSON, L. et al. Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. **Microbiology,** v. 148, n. Pt 8, p. 2309-18, Aug 2002.

CALUX, A. S. **Gênese e desenvolvimento de cavidades naturais subterrâneas em formação ferrífera no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais**. 2013. 177 (Mestrado em Geografia). Instituto de Geociências - Departamento de Geografia Universidade Federal de MInas Gerais Belo Horizonte.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil,** v. 383, n. 1, p. 3-41, October 01 2014.

CAPORASO, J. G. et al. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics,** v. 26, n. 2, p. 266-7, Jan 15 2010.

CARMO, F. F.; KAMINO, L. H. Y. **Geossistemas Ferruginosos do Brasil - Áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais**. 1. Belo Horizonte- MG: 2015. ISBN 978-85-66115-48-2.

CARMO, F. F. D. et al. Cangas: Ilhas de Ferro estratégias para a conservação. **Ciência Hoje** v. 50, n. 295, p. 48-53, 2012.

CARMO, F. F. D.; JACOBI, C. M. A vegetação de canga no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais: caracterização e contexto fitogeográfico. **Rodriguésia,** v. 64, n. 3, p. 527-541, 2013.

CARMO, F. F. D.; KAMINO, L. H. Y. Chapada de Canga: uma introdução In: CARMO, F. F. D. e KAMINO, L. H. Y. (Ed.). **Chapada de Canga: Patrimônio natural e cultural de relevante interesse para conservação** Belo Horizonte 3i editora, 2017. p.11-24. ISBN 978-85-9548-017-9.

CATAO, E. C. et al. Soil Acidobacterial 16S rRNA Gene Sequences Reveal Subgroup Level Differences between Savanna-Like Cerrado and Atlantic Forest Brazilian Biomes. **Int J Microbiol,** v. 2014, p. 156341, 2014.

CHAKRAVORTY, S. et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **J Microbiol Methods,** v. 69, n. 2, p. 330-9, May 2007.

CHAU, R. et al. Diversity and biosynthetic potential of culturable microbes associated with toxic marine animals. **Mar Drugs,** v. 11, n. 8, p. 2695-712, Aug 2 2013.

CHAUDHARY, H. S. et al. Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). **J Adv Pharm Technol Res,** v. 4, n. 2, p. 118-23, Apr 2013.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology,** v. 24, p. 1541, 12/11/online 2006.

CNC. 2018. Disponível em: < http://www.cavernas.org.br/cnc/Stats.aspx >. Acesso em: 02 de Janeiro.

CULVER, D. C. **Cave Life: Evolution and Ecology**. Harvard University Press, 1982. 189 ISBN 9780674330214.

D'AURIA, G. et al. Metagenomics of Bacterial Diversity in Villa Luz Caves with Sulfur Water Springs. **Genes (Basel),** v. 9, n. 1, Jan 22 2018.

DA SILVA, T. F. et al. Does the essential oil of Lippia sidoides Cham. (pepper-rosmarin) affect its endophytic microbial community? **BMC Microbiol,** v. 13, p. 29, Feb 7 2013.

DAIMS, H. et al. In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. **Appl Environ Microbiol,** v. 67, n. 11, p. 5273-84, Nov 2001.

DECUYPERE, S. et al. Diagnosis of Bacterial Bloodstream Infections: A 16S Metagenomics Approach. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 10, n. 2, p. e0004470, Feb 2016.

DEL CHIERICO, F. et al. Choice of next-generation sequencing pipelines. **Methods Mol Biol,** v. 1231, p. 31-47, 2015.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Mol Biotechnol,** v. 38, n. 1, p. 41-55, Jan 2008.

DEVIRGILIIS, C. et al. Functional screening of antibiotic resistance genes from a representative metagenomic library of food fermenting microbiota. **Biomed Res Int,** v. 2014, p. 290967, 2014.

DORR, J. V. N. **Physiographic, Stratigraphic and Structural Development of the Quadrilatero Ferrifero Minas Gerais, Brazil**. 2. ed. Washington: 1969. 110 p.

DRUMMOND, G. M. et al. **Biodiversidade em Minas Gerais: Um Atlas para sua conservação**. 2 ed. Belo Horizonte: 2005. 222.

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

EDGAR, R. C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature Methods,** v. 10, p. 996, 08/18/online 2013.

FALAGÁN, C.; FOESEL, B.; JOHNSON, B. Acidicapsa ferrireducens sp. nov., Acidicapsa acidiphila sp. nov., and Granulicella acidiphila sp. nov.: novel acidobacteria isolated from metal-rich acidic waters. **Extremophiles,** v. 21, n. 3, p. 459-469, May 01 2017.

FAORO, H. et al. Characterization of a new Acidobacteria-derived moderately thermostable lipase from a Brazilian Atlantic Forest soil metagenome. **FEMS Microbiol Ecol,** v. 81, n. 2, p. 386-94, Aug 2012.

FERREIRA, R. L. A vida subterrânea nos campos ferruginosos **O Carste,** v. 17, n. 3, p. 106-115, 2005.

FOUHY, F. et al. 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. **BMC Microbiol,** v. 16, n. 1, p. 123, Jun 24 2016.

FREITAS, C. M. D.; SILVA, M. A. D.; MENEZES, F. C. D. O desastre na barragem de mineração da samarco – fratura exposta dos limites do Brasil na redução de risco de desasastres. **Ciência e Cultura** v. 68, n. 3, p. 25-30, 2016.

GARCIA-FRAILE, P. et al. Terracidiphilus gabretensis gen. nov., sp. nov., an Abundant and Active Forest Soil Acidobacterium Important in Organic Matter Transformation. **Appl Environ Microbiol,** v. 82, n. 2, p. 560-9, Nov 6 2015.

GENILLOUD, O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. **Nat Prod Rep,** v. 34, n. 10, p. 1203-1232, Oct 18 2017.

GILLAN, D. C. et al. The long-term adaptation of bacterial communities in metal-contaminated sediments: a metaproteogenomic study. **Environ Microbiol,** v. 17, n. 6, p. 1991-2005, Jun 2015.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology,** v. 41, n. 2, p. 109-117, 1995/02/01 1995.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica (Cairo),** v. 2012, p. 963401, 2012.

GONÇALVES, D. F.; SOUSA, D. L. Aspectos morfológicos de espeleotemas em feições pseudocársticas da região de Carajás – PA. In: (Ed.). **ANAIS do 31º Congresso**

Brasileiro de Espeleologia. Ponta Grossa -PR: Sociedade Brasileira de Espeleologia, 2011. p.141-145.

GRACA, A. P.; CALISTO, R.; LAGE, O. M. Planctomycetes as Novel Source of Bioactive Molecules. **Front Microbiol,** v. 7, p. 1241, 2016.

GRAY, C. J.; ENGEL, A. S. Microbial diversity and impact on carbonate geochemistry across a changing geochemical gradient in a karst aquifer. **ISME J,** v. 7, n. 2, p. 325-37, Feb 2013.

HALTER, D. et al. Taxonomic and functional prokaryote diversity in mildly arsenic-contaminated sediments. **Res Microbiol,** v. 162, n. 9, p. 877-87, Nov 2011.

HAMEDI, J.; MOHAMMADIPANAH, F.; VENTOSA, A. Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. **Extremophiles,** v. 17, n. 1, p. 1-13, Jan 2013.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 68, n. 4, p. 669-85, Dec 2004.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chem Biol,** v. 5, n. 10, p. R245-9, Oct 1998.

HOLSINGER, J. R.; CULVER, D. C. **The invertebrate cave fauna of Virginia and a part of eastern Tennessee: zoogeography and ecology**. 1988.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F. The contribution of ironstone outcrops to plant diversity in the Iron Quadrangle, a threatened Brazilian landscape. **Ambio,** v. 37, n. 4, p. 324-6, Jun 2008.

JAFTHA, J. B.; STRIJDOM, B. W.; STEYN, P. L. Characterization of pigmented methylotrophic bacteria which nodulate Lotononis bainesii. **Syst Appl Microbiol,** v. 25, n. 3, p. 440-9, Oct 2002.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Appl Environ Microbiol,** v. 72, n. 3, p. 1719-28, Mar 2006.

JESKE, O. et al. From genome mining to phenotypic microarrays: Planctomycetes as source for novel bioactive molecules. **Antonie Van Leeuwenhoek,** v. 104, n. 4, p. 551-67, Oct 2013.

JI, H. F.; LI, X. J.; ZHANG, H. Y. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? **EMBO Rep,** v. 10, n. 3, p. 194-200, Mar 2009.

JONES, R. T. et al. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. **ISME J,** v. 3, n. 4, p. 442-53, Apr 2009.

JOURAND, P. et al. Methylobacterium nodulans sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. **Int J Syst Evol Microbiol,** v. 54, n. Pt 6, p. 2269-73, Nov 2004.

KAEBERLEIN, T.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S. S. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. **Science,** v. 296, n. 5570, p. 1127-9, May 10 2002.

KOCH, H. et al. Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus Nitrospira. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 112, n. 36, p. 11371-6, Sep 8 2015.

KÖNNEKE, M. et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature,** v. 437, p. 543, 09/22/online 2005.

KRAGELUND, C. et al. Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. **FEMS Microbiol Ecol,** v. 59, n. 3, p. 671-82, Mar 2007.

KUNZE, B. et al. Isolation and identification of althiomycin from Cystobacter fuscus (myxobacterales). **J Antibiot (Tokyo),** v. 35, n. 5, p. 635-6, May 1982.

LA SCOLA, B.; BARRASSI, L.; RAOULT, D. A novel alpha-Proteobacterium, Nordella oligomobilis gen. nov., sp. nov., isolated by using amoebal co-cultures. **Res Microbiol,** v. 155, n. 1, p. 47-51, Jan-Feb 2004.

LEE, L. H. et al. Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. **ScientificWorldJournal,** v. 2014, p. 698178, 2014.

LING, L. L. et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature,** v. 517, n. 7535, p. 455-9, Jan 22 2015.

LOCEY, K. J.; LENNON, J. T. Scaling laws predict global microbial diversity. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 113, n. 21, p. 5970-5, May 24 2016.

LOPES, L. M. N. O rompimento da barragem de Mariana e seus impactos socioambientais **Sinapse Múltipla,** v. 5, n. 1, p. 1-14, 2016.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Appl Environ Microbiol,** v. 71, n. 12, p. 8228-35, Dec 2005.

LOZUPONE, C. A. et al. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. **Appl Environ Microbiol,** v. 73, n. 5, p. 1576-85, Mar 2007.

LU, Z.; QI, W.; LIU, Z. [A procedure for developing selective isolation of Pseudonocardiacetes from soil samples]. **Wei Sheng Wu Xue Bao,** v. 40, n. 4, p. 406-14, Aug 2000.

LUCKER, S. et al. A Nitrospira metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 107, n. 30, p. 13479-84, Jul 27 2010.

MAZZETTI, C. et al. Halogenated spirotetronates from Actinoallomurus. **J Nat Prod,** v. 75, n. 6, p. 1044-50, Jun 22 2012.

MITTERMEIER, R. A. et al. **Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. Mexico City: CEMEX, S.A., Agrupación Sierra Madre, S.C., 1999. 431 ISBN 9686397582.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo** 2a. Lavras 2006. ISBN 85-87692-33-x.

MULLANY, P. Functional metagenomics for the investigation of antibiotic resistance. **Virulence,** v. 5, n. 3, p. 443-7, Apr 1 2014.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature,** v. 403, n. 6772, p. 853-8, Feb 24 2000.

NAETHER, A. et al. Environmental factors affect Acidobacterial communities below the subgroup level in grassland and forest soils. **Appl Environ Microbiol,** v. 78, n. 20, p. 7398-406, Oct 2012.

NICHOLS, D. et al. Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of "uncultivable" microbial species. **Appl Environ Microbiol,** v. 76, n. 8, p. 2445-50, Apr 2010.

NIMAICHAND, S. et al. Actinobacterial diversity in limestone deposit sites in Hundung, Manipur (India) and their antimicrobial activities. **Front Microbiol,** v. 6, p. 413, 2015.

NOONAN, J. P. et al. Genomic sequencing of Pleistocene cave bears. **Science,** v. 309, n. 5734, p. 597-9, Jul 22 2005.

OKAZAKI, T. et al. Taxonomy of actinomycetes capable of hydroxylation of ML-236B (Compactin). **The Journal of antibiotics,** v. 36, n. 9, p. 1176-1183, 1983.

OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World J Microbiol Biotechnol,** v. 33, n. 11, p. 197, Oct 6 2017.

OLIVEIRA, C. et al. 16S rRNA Gene-Based Metagenomic Analysis of Ozark Cave Bacteria. **Diversity,** v. 9, n. 3, p. 31, 2017.

ORTIZ, M. et al. Making a living while starving in the dark: metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave. **ISME J,** v. 8, n. 2, p. 478-91, Feb 2014.

OWEN, D. et al. **Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphrous acquisition**. 2014.

PACE, N. R. et al. The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences. In: MARSHALL, K. C. (Ed.). **Advances in Microbial Ecology**. Boston, MA: Springer US, 1986. p.1-55. ISBN 978-1-4757-0611-6.

PANKRATOV, T. A. et al. Telmatobacter bradus gen. nov., sp. nov., a cellulolytic facultative anaerobe from subdivision 1 of the Acidobacteria, and emended description

of Acidobacterium capsulatum Kishimoto et al. 1991. **Int J Syst Evol Microbiol,** v. 62, n. Pt 2, p. 430-7, Feb 2012.

PARKER, C. W. et al. Microbial Reducibility of Fe(III) Phases Associated with the Genesis of Iron Ore Caves in the Iron Quadrangle, Minas Gerais, Brazil. **Minerals** v. 3, n. 4, p. 395-411, 2013.

PARKS, D. H. et al. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics,** v. 30, n. 21, p. 3123-4, Nov 1 2014.

PATEL, J. B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. **Mol Diagn,** v. 6, n. 4, p. 313-21, Dec 2001.

PILÓ, L. B.; AULER, A. Geoespeleologia das cavernas em rochas ferríferas da região de Carajás, PA. In: RASTEIRO, M. A. e SARMENTO, R. L. (Ed.). **ANAIS do XXX Congresso Brasileiro de Espeleologia** Montes Claros - MG: Sociedade Brasileira de Espeleologia, 2009. ISBN ISSN 2178-2113 (online)

ISBN 978-85-64130-00-5(e-book).

PILÓ, L. B.; COELHO, A.; REINO, J. C. R. Geoespeleologia em rochas ferríferas: cenário atual e conservação. In: CARMO, F. F. D. e KAMINO, L. H. Y. (Ed.). **Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais**. Belo Horizonte: 3i editora, 2015. p.125-148. ISBN 978-85-66115-48-2.

POURNAJAF, A. et al. PCR-based identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains and their antibiotic resistance profiles. **Asian Pac J Trop Biomed,** v. 4, n. Suppl 1, p. S293-7, May 2014.

POZZI, R. et al. The genus Actinoallomurus and some of its metabolites. **J Antibiot (Tokyo),** v. 64, n. 1, p. 133-9, Jan 2011.

PRAKASH, D. et al. Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource. **Biomed Res Int,** v. 2013, p. 264020, 2013.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. **Mol Biol Evol,** v. 26, n. 7, p. 1641-50, Jul 2009.

QIN, S. et al. Abundant and diverse endophytic actinobacteria associated with medicinal plant Maytenus austroyunnanensis in Xishuangbanna tropical rainforest revealed by culture-dependent and culture-independent methods. **Environ Microbiol Rep,** v. 4, n. 5, p. 522-31, Oct 2012.

QIN, S. et al. Editorial: Actinobacteria in Special and Extreme Habitats: Diversity, Function Roles, and Environmental Adaptations. **Front Microbiol,** v. 7, p. 1415, 2016.

RAHMAN, S. J.; CHARLES, T. C.; KAUR, P. Metagenomic Approaches to Identify Novel Organisms from the Soil Environment in a Classroom Setting. **J Microbiol Biol Educ,** v. 17, n. 3, p. 423-429, Dec 2016.

RASIGRAF, O. et al. Metagenomic potential for and diversity of N-cycle driving microorganisms in the Bothnian Sea sediment. **Microbiologyopen,** v. 6, n. 4, Aug 2017.

REIS, M. P. et al. The prokaryotic community of a historically mining-impacted tropical stream sediment is as diverse as that from a pristine stream sediment. **Extremophiles,** v. 17, n. 2, p. 301-9, Mar 2013.

RIESENFELD, C. S.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. **Environ Microbiol,** v. 6, n. 9, p. 981-9, Sep 2004.

RINCON-FLOREZ, V.; CARVALHAIS, L.; SCHENK, P. **Culture-Independent Molecular Tools for Soil and Rhizosphere Microbiology**. 2013. 581-612.

RIQUELME, C. et al. Actinobacterial Diversity in Volcanic Caves and Associated Geomicrobiological Interactions. **Front Microbiol,** v. 6, p. 1342, 2015.

SALLSTEDT, T. et al. Speleothem and biofilm formation in a granite/dolerite cave, Northern Sweden. **International Journal of Speleology,** v. 43, n. 3, p. 305-313, 2014.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics,** v. 27, n. 6, p. 863-4, Mar 15 2011.

SEEDY, F. R. E. et al. Polymerase chain reaction detection of genes responsible for multiple antibiotic resistance Staphylococcus aureus isolated from food of animal origin in Egypt. **Vet World,** v. 10, n. 10, p. 1205-1211, Oct 2017.

SHARPTON, T. J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. **Front Plant Sci,** v. 5, p. 209, 2014.

SILVA, M. S.; MARTINS, R. P.; FERREIRA, R. L. Cave lithology determining the structure of the invertebrate communities in the Brazilian Atlantic Rain Forest. **Biodiversity and Conservation,** v. 20, n. 8, p. 1713-1729, July 01 2011.

SIMMONS, G. C. Canga Caves in the Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. **Bulletin of the National Speleological Society** v. 22, n. 2, p. 66-72, 1963.

SOUZA-SILVA, M. **Ecologia e Conservação das Comunidades de Invertebrados Cavernícolas na Mata Atlântica Brasileira**. 2008. 217 (Doutorado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais Belo Horizonte.

SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genet Mol Biol,** v. 38, n. 4, p. 401-19, Dec 2015.

STUBBENDIECK, R. M.; VARGAS-BAUTISTA, C.; STRAIGHT, P. D. Bacterial Communities: Interactions to Scale. **Front Microbiol,** v. 7, p. 1234, 2016.

TETU, S. G. et al. Life in the dark: metagenomic evidence that a microbial slime community is driven by inorganic nitrogen metabolism. **ISME J,** v. 7, n. 6, p. 1227-36, Jun 2013.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microb Inform Exp,** v. 2, n. 1, p. 3, Feb 09 2012.

TIMO, J. B.; TIMO, M. B. Geoespeleologia de cavernas em quartzito e formações ferríferas no Quadrilátero Ferrífero, região de Congonhas (MG). **Espeleo-Tema,** v. 27, n. 1, p. 11 - 32, 2016.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Curr Opin Microbiol,** v. 5, n. 3, p. 240-5, Jun 2002.

TREVORS, J. T. One gram of soil: a microbial biochemical gene library. **Antonie Van Leeuwenhoek,** v. 97, n. 2, p. 99-106, Feb 2010.

VENTER, J. C. et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science,** v. 304, n. 5667, p. 66-74, Apr 2 2004.

VERGINER, M. et al. Monitoring the plant epiphyte Methylobacterium extorquens DSM 21961 by real-time PCR and its influence on the strawberry flavor. **FEMS Microbiol Ecol,** v. 74, n. 1, p. 136-45, Oct 2010.

VILLA, M. M.; LEMES, C. G. C.; MOREIRA, L. M. Microbiota associada à Chapada de Canga: um patrimônio genético mineiro com potencial biotecnológico negligenciado In: CARMO, F. F. D. e KAMINO, L. H. Y. (Ed.). **Chapada de Canga: Patrimônio natural e cultural de relevante interesse para a conservação** Belo Horizonte: Editora 3i, 2017. p.341-359. ISBN 9788595480179.

WANG, Q. et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Appl Environ Microbiol,** v. 73, n. 16, p. 5261-7, Aug 2007.

WARD, N. L. et al. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Appl Environ Microbiol,** v. 75, n. 7, p. 2046-56, Apr 2009.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 95, n. 12, p. 6578-83, Jun 09 1998.

WU, Y. et al. Profiling bacterial diversity in a limestone cave of the western Loess Plateau of China. **Front Microbiol,** v. 6, p. 244, 2015.

YAMADA, K. et al. Granulicella cerasi sp. nov., an acidophilic bacterium isolated from cherry bark. **Int J Syst Evol Microbiol,** v. 64, n. Pt 8, p. 2781-5, Aug 2014.

YOUNG, J. et al. Elucidation of gephyronic acid biosynthetic pathway revealed unexpected SAM-dependent methylations. **J Nat Prod,** v. 76, n. 12, p. 2269-76, Dec 27 2013.

ZEPEDA MENDOZA, M. L. et al. Metagenomic Analysis from the Interior of a Speleothem in Tjuv-Ante's Cave, Northern Sweden. **PLoS One,** v. 11, n. 3, p. e0151577, 2016.

ZHOU, W.; WANG, Y.; LIN, J. Functional cloning and characterization of antibiotic resistance genes from the chicken gut microbiome. **Appl Environ Microbiol,** v. 78, n. 8, p. 3028-32, Apr 2012.