INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE



# Mestrado Profissional Uso Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Tropicais

# **BRUNO GARCIA SIMÕES DOS SANTOS**

# PROSPECÇÃO DE MICROALGAS PARA UMA MINERAÇÃO SUSTENTÁVEL: CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO FITOPLANCTÔNICO DA FLORESTA NACIONAL DE CARAJÁS – PA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Uso Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Tropicais do Instituto Tecnológico Vale (ITV).

Orientadora: Dr. <sup>a</sup> Hivana Melo Barbosa Dall'Agnol

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)



# **BRUNO GARCIA SIMÕES DOS SANTOS**

# PROSPECÇÃO DE MICROALGAS PARA UMA MINERAÇÃO SUSTENTÁVEL: CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO FITOPLANCTÔNICO DA FLORESTA NACIONAL DE CARAJÁS – PA

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Desenvolvimento Sustentável do Programa de Mestrado Profissional em Uso Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Tropicais do Instituto Tecnológico Vale (ITV).

Data da aprovação: 06 de setembro de 2017.

Banca examinadora:

Dr. <sup>a</sup> Hivana Melo Barbosa Dall'Agnol Orientadora – Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Dr. José Augusto Pires Bitencourt Membro interno – Instituto Tecnológico Vale (ITV)

Dr. Evonnildo Costa Gonçalves Membro externo – Universidade Federal do Pará (UFPA)

"Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados". – Mahatma Gandhi

"Estude a si mesmo, observando que o autoconhecimento traz humildade e sem humildade é impossível ser feliz". – Allan Kardec

### AGRADECIMENTOS

Sou grato a todos aqueles que, de alguma forma, fizeram parte deste processo, pessoas sem as quais nada disso seria possível, pois nada se constrói sozinho.

Por isso, começo agradecendo a Deus, pelas oportunidades de viver, amar e crescer, sempre.

Agradeço a minha orientadora. Pela confiança depositada em mim ao longo destes anos de trabalho, pelos exemplos como profissional e como ser humano. Obrigado, também, pela paciência e pelos conselhos.

Agradeço aos companheiros de laboratório, pelos ensinamentos e experiências compartilhados. Vocês representam a minha referência do que significa fazer ciência de alto nível, sem deixar de lado o senso de humor e o companheirismo.

Agradeço ao Instituto Tecnológico Vale e a todos que dele fazem parte, pois é graças ao esforço e dedicação de cada um que esta instituição, a cada dia mais, cresce e se solidifica.

Agradeço a minha família. Vocês são, desde sempre e em todos os momentos, meus exemplos e exercícios de amor, caridade, paciência e perdão. Pai, mãe, vó Elyna, Isabelle e Fernandinha. Obrigado por todas as lições proporcionadas!

Não há palavras que possam expressar minha gratidão às duas pessoas sem as quais este trabalho não existiria. Primeiro, àquela que me apoia, me anima, que sempre tem os melhores conselhos, agradeço por estar ao meu lado sempre, aproveitando os momentos felizes e me ajudando a levantar nos dias mais difíceis. E, agora, agradeço ao meu filhote, por me inspirar em ser alguém melhor, por me lembrar todos os dias como a vida é melhor quando se vive intensamente cada momento.

A todos, o meu mais sincero sentimento de gratidão!

#### RESUMO

Para auxiliar no desenvolvimento e aplicação de microrganismos em bioprocessos envolvendo ambientes de mineração, foi realizada a prospecção de uma microalga acidotolerante nativa da região de Carajás e avaliada sua resposta ao estresse ácido com ferramentas ômicas. Para tanto, foram realizadas coletas em 5 lagoas na Serra Sul da FLONA de Carajás e em uma área de drenagem ácida de mina remediada. As amostras foram cultivadas em BG-11 com pH 2,5 e pH 7,1. Os isolados foram identificados com dados morfológicos e moleculares. A adaptação ao ambiente ácido foi avaliada a partir do sequenciamento genômico e da análise proteômica. Foram isolados 6 clorofíceas e 2 cianobactérias neutrófilas e 1 clorófita acidotolerante, a qual foi selecionada como organismo alvo deste estudo, sendo identificada como membro do gênero Heveochlorella. Seu genoma nuclear foi montado em 23.775 scaffolds cromossomais, com 80,5 Mpb, 62% GC, 9.651 proteínas, 3 rRNA e 724 tRNA; 1 scaffold cloroplastidial circular, com 131 Kpb, 34% GC, 61 proteínas, 2 rRNA e 26 tRNA; e 1 scaffold mitocondrial linear, com 99 Kpb e 30% GC. A análise proteômica identificou 247 proteínas, sendo 15 expressas exclusivamente em pH ácido e 35 apenas em pH neutro. Do total, 18 proteínas foram hiperexpressas e 6 foram hipoexpressas na condição ácida, destas apenas, respectivamente, 14 e 0 possuem função conhecida. O enriquecimento da ontologia gênica destacou processos biológicos relacionados com o metabolismo energético, com 9 proteínas hiperexpressas. Outro grupo, com 3 proteínas hiperexpressas, possui relação com a síntese proteica. A proteína hiperexpressa com maior valor de fold change foi a subunidade A da H<sup>+</sup>-ATPases vacuolar. A partir dos resultados obtidos concluiu-se que os ecossistemas lênticos da região de Carajás são promissores para a prospecção de microalgas acidotolerantes cultiváveis em condições de laboratório. As ferramentas ômicas empregadas no presente estudo contribuíram com o primeiro passo no entendimento do processo de resistência ao estresse ácido no gênero Heveochlorella, demonstrando seu aumento de demanda energética, bem como apresenta a subunidade A da H<sup>+</sup>-ATPases vacuolar como candidato na regulação homeostática da população estudada.

Palavras-chave: Carajás. Chlorophyta. Drenagem ácida. Genômica. Proteômica.

#### ABSTRACT

To assist in the development and application of microorganisms in bioprocesses involving mining environments, the prospection of acidotolerant microalgae, native from Carajás region, was carried out and its response to acid stress was evaluated with omics tools. For this purpose, samples were collected in five lagoons in the southern range of the Carajás National Forest and in a remediated acid mine drainage area. They were grown on BG-11 medium at pH 2.5 and pH 7.1. Isolates were identified by morphological and molecular data. The acid stress response was evaluated from genomic sequencing and proteomics analysis. Seven neutrophilic chlorophytes, two neutrophilic cyanobacteria and one acidotolerant chlorophyte, the latter belonging to the genus Heveochlorella, were isolated. Its genome was assembled in 23,775 chromosomal scaffolds, with 80.5 Mbp, 62% GC, 9,651 proteins, 3 rRNA and 724 tRNA; 1 circular chloroplastidial scaffold, with 131 Kbp, 34% GC, 61 proteins, 2 rRNA and 26 tRNA; And 1 linear mitochondrial scaffold, with 99 Kbp and 30% GC. The proteomic analysis identified 247 proteins, 15 being expressed exclusively at acid pH and 35 only at neutral pH. Of the total, 18 were up-regulated and 6 down-regulated at acidic condition, of these, respectively, 14 and 0 have known function. The enrichment of gene ontology highlighted biological processes related to energy metabolism, with nine up-regulated proteins. Another group, with three upregulated proteins, is related to protein synthesis. The up-regulated protein with the greatest fold change value was the A subunit of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases. From the obtained results, it was concluded that the lentic ecosystems of Carajás region are promising for acidotolerant microalgae prospection, cultivable under laboratory conditions. The omics tools used in the present study contributed to the first step in the understanding of the acid stress resistance process in the genus Heveochlorella, demonstrating its increase in energy demand, as well as the A subunit of vacuolar H+-ATPases as a candidate in the homeostatic regulation of the studied population.

Keywords: Carajás. Chlorophyta. Acid drainage water. Genomics. Proteomics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Locais de coleta dos microrganismos na Floresta Nacional Carajás – PA.23

Figura 3 Microalgas e cianobactérias isoladas da região de Carajás - PA. a) MCITV01, Drenagem ácida de mina (DAM). b) MCITV02, DAM. c) MCITV03, DAM. d) MCITV04, Lagoa do Amendoim. e) MCITV05, Lagoa do Amendoim. f) MCITV06, Lagoa do Violão. g) MCITV07, Lagoa do Violão. h) MCITV08, Lagoa do Violão. .....35

Figura 4 Células vegetativas de *Heveochlorella* sp. MCITV09. Barra de escala: 10 µm

**Figura 5** Posição filogenética do isolado *Heveochlorella* sp. MCITV09 (em negrito), baseado em sequências de rbcL. Os números nos ramos correspondem a probabilidade posterior bayesiana (BPP) e ao valor de bootstrap (BS) por máxima verossimilhança, respectivamente. Os ramos espessos correspondem os que apresentaram valores de BPP ou BS significativos ( $\geq 0.95$  e  $\geq 70$ , respectivamente). A barra de escala representa o número estimado de substituições por sítio.......40

**Figura 6** Mapa gênico do cloroplasto de *Heveochlorella* sp. MCITV09. O circulo central representa a porcentagem do conteúdo GC a cada 50 pb......42

## LISTA DE TABELAS

 Tabela 3: Lista de oligonucleotídeos, respectivos alvos e perfil de termociclagem usados para a identificação molecular de microalgas isoladas de ecossistemas lênticos da região de Carajás-PA.

 27

**Tabela 6:** 10 melhores correspondências do Blast para o cada um dos genes códigosde barra (18S rRNA, 16S rRNA e rbcL) da Heveochlorella sp. MCITV09......38

**Tabela 7:** Dados das bibliotecas de Heveochlorella sp. MCITV09 sequenciadas pelasplataformas lon Torrent e Illumina antes e após o controle de qualidade.41

**Tabela 8** Dados de montagem dos genomas organelares e cromossômico deHeveochlorella sp. MCITV09......42

**Tabela 10:** Quantidade de proteínas detectadas e de proteínas com expressãodiferencial, para dois cultivos independentes da microalga Heveochlorella sp.MCITV09 em pH 2,5 e pH 7,1.45

**Tabela 11** Proteínas hiperexpressas pela *Heveochlorella* sp. MCITV09 quando cultivada em pH ácido (2,5), em comparação com o cultivo em pH neutro (7,1). .....46

# LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ACN Acetonitrila
- BLAST Basic Local Alignment Search Tool
- CDS Sequência Codificante
- DAM Drenagem Ácida de Mina
- DNA Ácido desoxirribonucleico
- DTT Ditiotreitol
- EDTA Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
- EPS Exopolissacarídeos
- IAA Iodoacetamida
- ICMBio Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
- KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- MCITV Microalgas e Cianobactérias do Instituto Tecnológico Vale
- MCMC Monte Carlo via cadeia de Markov
- NCBI National Center for Biotechnology Information
- NGS Next-Generation Sequencing
- PCR Reação em Cadeia da Polimerase
- PMSF Fluoreto de α-fenilmetilsulfonila
- PVPP Polivilnilpolipirrolidona
- rbcL subunidade maior da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase
- RNA Ácido ribonucleico
- rRNA RNA ribossomal
- RuBisCO ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase
- TBE Tris-borato EDTA
- TFA Ácido Trifluoracético
- tRNA RNA transportador
- UPLC Cromatografia Líquida de Ultra Performance

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1. FLONA de Carajás - PA	16
3.2. Drenagem Ácida de Mina e seu tratamento	17
3.3. Fitoplâncton	18
3.4. Filo Chlorophyta	18
3.4.1. Identificação e diversidade	
3.4.2. Potencial biotecnológico e as ciências ômicas	20
3.4.2.1. Genômica	20
3.4.2.2. Proteômica	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Coleta	23
1.2 Cultive a icolomonto	24
4.2. Cultivo e isolamento 4.3. Identificação dos isolados	24
<b>4.2.</b> Cultivo e isolamento <b>4.3.</b> Identificação dos isolados         4.3.1. Identificação morfológica	24 
<ul> <li>4.2. Cultivo e isolamento</li> <li>4.3. Identificação dos isolados</li> <li>4.3.1. Identificação morfológica</li> <li>4.3.2. Identificação Molecular</li> </ul>	24 
<ul> <li>4.2. Cultivo e isolamento</li> <li>4.3. Identificação dos isolados</li> <li>4.3.1. Identificação morfológica</li> <li>4.3.2. Identificação Molecular</li> <li>4.3.2.1. Extração de DNA</li> </ul>	24 25 
<ul> <li>4.2. Cultivo e Isolamento</li> <li>4.3. Identificação dos isolados</li></ul>	24 
<ul> <li>4.2. Cultivo e Isolamento</li> <li>4.3. Identificação dos isolados</li></ul>	24 
<ul> <li>4.2. Cultivo e Isolamento</li> <li>4.3. Identificação dos isolados</li></ul>	24 
<ul> <li>4.2. Cultivo e Isolamento</li></ul>	24 
<ul> <li>4.2. Cultivo e Isolamento</li></ul>	24 
<ul> <li>4.2. Cultivo e Isolamento</li></ul>	24 
<ul> <li>4.2. Cultivo e Isolamento</li></ul>	24 
<ul> <li>4.2. Cultivo e Isolamento</li></ul>	24 
<ul> <li>4.2. Cultivo e isolamento</li></ul>	24 
<ul> <li>4.2. Cultivo e isolamento</li></ul>	24 

4.5.2.2. Extração de proteínas e quantificação	31
4.5.2.3. Digestão proteica	32
4.5.2.4. Dessalinização proteica	32
4.5.2.5. 2D-UPLC-MS <sup>E</sup>	
4.5.2.6. Análise bioinformática	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Cultivo e isolamento	35
5.2. Identificação do isolado	36
5.2.1. Identificação morfológica	
5.2.2. Identificação Molecular	37
5.3. Potencial Biotecnológico	41
5.3.1. Genômica	41
5.3.1.1. Controle de qualidade	41
5.3.1.2. Montagem De Novo e anotação	41
5.3.1.3. Genoma Cloroplastidial	43
5.3.2. Proteômica	44
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

## 1. INTRODUÇÃO

A Floresta Nacional (FLONA) de Carajás é uma Unidade de Conservação do Governo Federal, que objetiva conciliar o uso e ocupação sustentáveis do solo com a conservação ambiental, permitindo a extração de bens necessários à demanda global, minimizando impactos aos recursos naturais e aos processos ecológicos. Sua principal singularidade está na intensa busca pela harmonia entre a mineração e a conservação da biodiversidade local (ICMBIO, 2016a).

Hoje, são considerados em torno de 2.000 espécies vegetais, sendo apenas 795 com *voucher*, e mais de 5.000 espécies animais somente na região da FLONA. Demonstrando que, apesar de ainda haver muito para ser descoberto, estudos de fauna e flora são bem difundidos na região, principalmente aqueles relacionados com espécies endêmicas, ameaçadas de extinção ou exóticas (MARTINS *et al.*, 2012; MADEIRA *et al.*, 2015; ICMBIO, 2016a).

Em contrapartida, são poucos os estudos sobre a biodiversidade microbiana de Carajás, e em geral restritos a utilização de bactérias e fungos em processos de biolixiviação ou biorremediação (OISHI, 2014; ZUCOLOTO et al., 2016). E, nenhum destes estudos que incluem microrganismos da região são citados nos planos de manejo do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio (ICMBIO, 2016a, 2016b). O que demonstra a necessidade de ampliar a visibilidade da importância ecológica e do potencial biotecnológico destas populações microscópicas, visto que elas possuem papeis fundamentais na manutenção dos ecossistemas que habitam e são candidatas promissoras a agentes ativas de transformação do ambiente de maneira sustentável, agregando valor econômico e ambiental às atividades antrópicas e sua pegada ecológica (BARTON; MANDL; LOY, 2010).

Como forma de auxiliar neste processo, o grupo de Genômica Ambiental do Instituto Tecnológico Vale (ITV) vem desenvolvendo pesquisa acerca da composição e caracterização de bactérias heterotróficas acidófilas e clorófitas (Chlorophyta) fitoplanctônicas, de lagoas perenes presentes na Serra Sul da FLONA de Carajás e de corpos d'água, em áreas de ocorrência de Drenagem Ácida de Mina (DAM) próximos de uma mina de cobre. Um destes projetos estuda a aplicação de consórcios bacterianos acidófilos na biolixiviação, recuperando metais de valor comercial ao mesmo tempo que se promove o tratamento da DAM. Tal processo confronta-se com a limitação, para sua aplicação em larga escala, da necessidade dos microrganismos em obter energia a partir de fontes orgânicas (ex. glicerol), o que eleva o custo do processo quando adicionados a partir de fontes comerciais (DAS et al., 2009b; SCHIPPERS et al., 2014). Como alternativa, avalia-se a utilização de cultivos paralelos de microalgas, as quais forneceriam os açúcares para manutenção do consórcio. Como o processo ocorre em pH extremamente ácido (pH < 3), é indispensável que a microalga seja capaz de tolerar tal nível de estresse.

Assim, o presente estudo buscou isolar e identificar microalgas acidófilas ou acidotolerantes nativas da região de Carajás, mencionada anteriormente, e avaliar as respostas adaptativas das mesmas ao pH ácido, a partir de uma abordagem ômica (genômica e proteômica). Contribuindo com a geração de conhecimentos acerca destas comunidades da região, bem como as inserindo no contexto biotecnológico e sustentável de interesse da mineração.

### 2. OBJETIVO

### 2.1. Objetivo geral

Realizar a prospecção de microalgas com potencial aplicação em bioprocessos para uma mineração sustentável.

#### 2.2. Objetivos específicos

- a) Isolar pelo menos uma microalga acidófila ou acidotolerante nativa de ecossistema lêntico da região de Carajás – PA;
- b) Realizar a identificação do(s) isolado(s) a partir de uma abordagem polifásica;
- C) Avaliar a resposta molecular ao pH ácido extremo (pH < 3) utilizando uma abordagem ômica.

#### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. FLONA de Carajás - PA

Criada no dia 2 de fevereiro de 1998, por meio do Decreto-lei 2.486 do referido ano, a FLONA de Carajás está localizada nos municípios de Água Azul do Norte, Canãa do Carajás e Parauapebas, no Estado do Pará. Têm uma área de 411.949 ha com ocorrência de dois ambientes fitogeográficos distintos: floresta ombrófila, que ocupa em torno de 95% (±2%) do território e campos rupestres ferruginosos, conhecidos como canga, ocupando cerca de 5% (±2%) (IBAMA, 2003; ICMBIO, 2016a; SCHAEFER *et al.*, 2016a; VASCONCELOS *et al.*, 2016).

As formações ferríferas concentram-se em platôs lateríticos, em altitude média de 700 metros acima do nível do mar, que guardam as maiores jazidas de ferro de alto teor do mundo – 18 bilhões de toneladas com mais de 65% de ferro (DNPM, 2010; SCHAEFER *et al.*, 2016b).

Nestas áreas, segundo o IBAMA (2003), o solo não auxilia na drenagem superficial em virtude da sua pouca permeabilidade, impedindo a infiltração de água da chuva para alimentar a drenagem subterrânea. O que leva, pela presença de áreas côncavas e alta pluviosidade regional, à formação de lagoas com diversos tamanhos e profundidades. Na Serra Sul encontra-se o conjunto mais representativo, onde algumas mantém volume considerável de água mesmo durante o período de estiagem.

No bloco S11D encontram-se duas lagoas permanentes:

- a) Violão, com área superficial de 29,1 ha e profundidade de até 14 metros, está a cerca de 730 metros acima do nível do mar, seu fundo é plano e lamacento (SAHOO *et al.*, 2016);
- b) Amendoim, com área superficial de 13,5 ha e profundidade de até 8 metros, está a cerca de 710 metros acima do nível do mar, seu fundo é irregular, lamacento e parcialmente ocupado por macrófitas (SAHOO *et al.*, 2016).

No bloco S11A encontram-se três lagoas que, em períodos de chuva expressiva, já registraram a formação de um sistema único:

a) Lagoa Três Irmãs - 1, com área superficial de 7,26 ha e profundidade de até
3 metros, está a cerca de 720 metros acima do nível do mar;

- b) Lagoa Três Irmãs 2, com área superficial de 12,1 ha e profundidade de até 2 metros, está a cerca de 715 metros acima do nível do mar;
- c) Lagoa Três Irmãs 3, com área superficial de 25,7 ha e profundidade de até 11 metros, está a cerca de 710 metros acima do nível do mar.

#### 3.2. Drenagem Ácida de Mina e seu tratamento

Próximo à fronteira sudeste da FLONA de Carajás (distante cerca de 25 km da Serra Sul), na região do município de Canaã dos Carajás, está localizado a Mina do Sossego, a maior operação de cobre do Brasil (245 Mt de minério com 0,98% de cobre e 0,28 g/t de ouro) com capacidade produtiva estimada de 120 mil toneladas anuais. Onde o minério segue um processo de fragmentação primária, britagem, moagem, concentração por flotação e desidratação, gerando um concentrado com 30% de cobre e rejeito. O concentrado é estocado para posterior distribuição e o rejeito é recebido por uma barragem (BRASIL, 2009; RODRIGUES; HEIDER; FONSECA, 2009).

Um dos desafios ambientais enfrentados pela Mina do Sossego é a formação de DAM, reações químicas de ordem natural que oxidam minerais sulfetados quando expostos ao ar e a água, liberando metais pesados (ex. AI, Cu, Fe, Zn) e acidificando o meio que se encontram (MONTEIRO *et al.*, 2008; HOGSDEN; HARDING, 2012). O principal método empregado no combate a geração de DAM é a adição de um químico alcalino (ex. óxido de cálcio, CaO) para neutralizar o meio ácido e precipitar os metais, apesar do baixo custo está prática vem sendo considerada como não sustentável, pelo fato de não remover os metais pesados que podem, a longo prazo, ser novamente biodisponibilizados ao meio ambiente. Neste contexto, estudos de utilização de microrganismos para remoção dos metais e posterior neutralização emergem como alternativas eficientes e sustentáveis, tendo em vista que aproveitam o microbioma endógeno das regiões de ocorrência das DAMs para remediar seus efeitos nocivos, ao mesmo tempo que é capaz de recuperar os metais com valor comercial (DOSHI, 2006; DAS et al., 2009b; NANCUCHEO; JOHNSON, 2011; JOHNSON, 2014; HU et al., 2016).

#### 3.3. Fitoplâncton

Os organismos fotossintetizantes que vivem em suspensão nos habitats lênticos (maioria microscópicos), chamados de fitoplâncton, são principalmente representadas por membros dos filos Cyanobacteria, Chlorophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Haptophyta, Chrysophyta, Cryptophyta e Bacillariophyta (PAL; CHOUDHURY, 2014a).

Estes organismos são agentes fundamentais na ecologia global, devido aos serviços ecossistêmicos por eles prestados. Participam de importantes ciclos biogeoquímicos, como o do carbono, que os caracteriza como produtores primários responsáveis por cerca de metade da produção primária do planeta Terra, ciclo do nitrogênio, ciclo do fósforo; estão na base da cadeia alimentar nos ambientes que habitam (NOT *et al.*, 2012).

Ambientes lênticos com extrema acidez (pH ≤ 3. Ex. Fontes termais vulcânicas, DAM) são comumente deficientes em nutrientes, com limitada diversidade de sua microbiota. A maioria dos organismos adaptados a estes ambientes são acidotolerantes, sendo encontrados tanto nos ecossistemas extremos quanto em ambientes de menor estresse (BRAKE; HASIOTIS, 2010). Diversos gêneros de clorofíceas foram descritas anteriormente nestas condições, ex. *Chlorella, Scenedesmus*, (LANE; BURRIS, 1981) *Dunaliella* (PICK, 1999), *Chlamydomonas* (NISHIKAWA; TOMINAGA, 2001; MESSERLI *et al.*, 2005), *Heveochlorella* (ZHANG *et al.*, 2008), *Coccomyxa* (FUENTES *et al.*, 2016).

#### 3.4. Filo Chlorophyta

#### 3.4.1. Identificação e diversidade

Tradicionalmente chamados de algas verdes, estes organismos possuem clorofila, diversificação morfológica, padrões reprodutivos e de ciclo de vida que levaram os ficologistas a os classificarem como parte do reino Viridiplantae. Sua sistemática sofreu drásticas modificações ao longo dos anos. Com o avanço dos estudos genéticos nas últimas décadas se discutiu a necessidade de acrescentar dados moleculares à metodologia convencional, na tentativa de refletir melhor as relações filogenéticas entre estas microalgas (PAL; CHOUDHURY, 2014a).

Atualmente, sua sistemática é baseada em uma abordagem polifásica, utilizando-se os seguintes critérios:

a) Estudo convencional morfológico e ecofisiológico das microalgas em condições de campo;

b) Isolamento de cultura unialgal para estudos morfológicos, ontogenéticos, bioquímicos e fisiológicos em condições de laboratório;

c) Estudo ultraestrutural de diferentes organelas, especialmente do cloroplasto;

d) Uso de marcadores moleculares (regiões do DNA com sequências nucleotídicas parcialmente conservadas e parcialmente hipervariáveis, também chamados de códigos de barra de DNA) para análise filogenética molecular. Sendo comumente utilizados os genes que codificam a subunidade menor do RNA ribossomal (16S rRNA para procariontes e cloroplastos; 18S rRNA para eucariontes) e o gene cloroplastidial *rbcL* que codifica a subunidade maior da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO).

Atualmente, estão descritas 6.377 espécies, divididas em 9 classes: Chlorodendrophyceae, Chlorophyceae, Mamiellophyceae, Nephroselmidophyceae, Palmophyllophyceae, Pedinophyceae, Pyramimonadophyceae, Trebouxiophyceae, Ulvophyceae (GUIRY; GUIRY, 2017). Sendo as duas primeiras e as duas últimas as mais estudadas, por serem mais abundantes e frequentemente encontradas em ambientes de interesse para aplicações comerciais, também são chamadas de *core* do filo Chlorophyta (BARCLAY; APT, 2013; FUCÍKOVÁ *et al.*, 2014).

Toda essa diversidade evidencia o desafio enfrentado para realizar de forma adequada a identificação destes organismos, principalmente pelo fato de apenas parte das espécies estarem bem descritas em chaves de classificação, que em geral são voltadas para regiões ou ambientes específicos (PAL; CHOUDHURY, 2014b; BELLINGER; SIGEE, 2015; WEHR; SHEATH; KOCIOLEK, 2015). Também refletindo na necessidade de profissionais especializados, demandando tempo, além de uma série de limitações decorrentes da falta de diferenças morfológicas significativas em linhagens filogeneticamente distintas ou da observação de organismos morfologicamente distintos que formam grupos monofiléticos, do ponto de vista molecular (DARIENKO et al., 2015).

Os métodos da biologia molecular implementados ao processo de identificação (não só para as microalgas, mas em toda a sistemática), agregam informações de alta relevância as relações filogenéticas entre os organismos, bem como se caracterizam como ferramentas com maior velocidade e precisão que somente a avaliação morfológica, podendo servir de dado preliminar na identificação de um isolado, enquanto não se conclui todo o processo mencionado no início desta seção (MALAVASI *et al.*, 2016).

#### 3.4.2. Potencial biotecnológico e as ciências ômicas

Conforme mencionado no item 3.3, o filo Chlorophyta abriga diversas espécies acidófilas, com capacidade de proliferação em ambientes cujo pH atinge valores menores que 1 e não conseguem crescer quando o pH se aproxima da neutralidade; e acidotolerantes, que são adaptadas para crescer em amplo intervalo de pH, como uma variação de 2,5 a 9. Em comum, as microalgas resistentes ao estresse ácido costumam manter o pH intracelular próximo de valores neutros, o que ocorre com elevado custo energético para a célula, uma vez que utilizam intensamente mecanismos dependentes de ATP, como bombas para efluxo de prótons e bombas de troca iônica que diminuem a condutância da membrana plasmática por H<sup>+</sup> (GROSS, 2000; GIMMLER, 2001; MESSERLI *et al.*, 2005; FUENTES *et al.*, 2016).

Em ambientes de DAM, as microalgas são descritas em diferentes papeis ecológicos, onde realizam a imobilização de metais pela formação de complexos metálicos com exopolissacarídeos (EPS), pela adsorção dos metais na parede celular e pela precipitação dos metais a partir da alcalinização natural do meio como consequência da fixação de carbono, além de servirem de fonte energética para outros organismos, como bactérias e fungos (DAS *et al.*, 2009a, 2009b). Características que são exploradas para utilização em processos de biorremediação e biomineração (WUANA; OKIEIMEN, 2011; ŇANCUCHEO; JOHNSON, 2012; JOHNSON, 2014).

Uma maneira rápida e eficiente de avaliar o potencial de um novo isolado para sua utilização nesses processos é a aplicação de ferramentas ômicas, como a genômica e a proteômica, que oferecem dados sobre sua relação filogenética com outros indivíduos, bem como dos potenciais genético e metabólico das populações analisadas (CADORET; GARNIER; SAINT-JEAN, 2012; HONG; LEE, 2015).

#### 3.4.2.1. Genômica

As plataformas de sequenciamento de próxima geração (NGS, do inglês *Next-Generation Sequencing*) geram dados massivos sobre os genomas dos indivíduos estudados, a partir de diferentes abordagens, como:

 a) A plataforma Illumina (Illumina, San Diego, CA, EUA), que identifica a sequência pela detecção óptica de cada nova incorporação de nucleotídeo marcado com fluoróforo, em milhões de agrupamentos independentes durante o processo de extensão da cadeia de DNA (SHENDURE; JI, 2008);

b) E o sequenciador Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), que utiliza chips com semicondutores para detectar alterações mínimas de pH durante o processo de extensão da cadeia de DNA que ocorre simultaneamente em milhões de poços independentes (ROTHBERG et al., 2011).

Apesar de diferentes, ambas tecnologias permitem a reconstrução de genomas parciais ou inteiros, possibilitando desvendar os genes que os organismos sequenciados são capazes de produzir. Tornando possível, a partir da comparação com mecanismos já descritos, a inferência dos potenciais metabólicos destes indivíduos ou até mesmo comunidades, em caso de estudos metagenômicos (VINCENT et al., 2016).

Na última década, os dados genômicos das clorofíceas vem sendo utilizados na elucidação das mais diversas questões sobre este grupo, tais como relação filogenética entre os indivíduos (FUCÍKOVÁ et al., 2014), a constituição da parede celular (DOMOZYCH et al., 2012), o funcionamento de bombas de próton (TAYLOR; BROWNLEE; WHEELER, 2012), o sequestro e acumulo de carbono (WINCK; PÁEZ MELO; GONZÁLEZ BARRIOS, 2013), a tolerância a alta concentração de metais (DOPSON et al., 2014), a resposta ao estresse osmótico (BICKERTON et al., 2016), entre outros (HONG; LEE, 2015).

#### 3.4.2.2. Proteômica

Outra abordagem que vem se popularizando, além da genômica, é a proteômica, que se divide basicamente em três etapas (SCHNEIDER; RIEDEL, 2010):

a) Preparação da amostra, onde é realizado a extração, purificação e concentração das proteínas;

 b) Separação das proteínas (ou peptídeos) e análise por espectrometria de massas;

c) Identificação das proteínas baseada nos espectros de massa obtidos.

Mesmo não tendo a mesma capacidade de gerar quantidades massivas de dados que a genômica, o que é superado com suporte estatístico robusto, os dados

proteômicos possuem grande relevância, visto que estão diretamente relacionados com o metabolismo celular do momento de sua extração, registrando as diferenças no perfil de expressão quando o organismo é submetido a diferentes condições (AEBERSOLD; MANN, 2003).

Os trabalhos sobre proteômica do filo Chlorophyta já auxiliaram no entendimento de diversos processos fisiológicos e adaptativos destes organismos, tais como: tolerância a alta salinidade (LISKA, 2004), o sequestro e acumulo de carbono (WINCK; PÁEZ MELO; GONZÁLEZ BARRIOS, 2013), resposta ao estresse térmico (SCHRODA; HEMME; MÜHLHAUS, 2015), papel celular do sistema tiorredoxina (PÉREZ-PÉREZ et al., 2017), mecanismo de concentração de CO<sub>2</sub> (MACKINDER, 2017), entre outros.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1.Coleta

Para obtenção de linhagens isoladas foram realizadas coletas, em parceria entre os grupos de Genômica Ambiental e de Geologia Ambiental e Recursos Hídricos do ITV, em uma região de DAM, remediada com calcário, e em 5 lagoas na Serra Sul da FLONA de Carajás, no ano de 2015 (Figura 1 e Tabela 1).



Figura 1 Locais de coleta na Floresta Nacional Carajás - PA.

Foram coletadas amostras de água e sedimento (30-40 mL), com o auxílio de uma garrafa de Van Dorn e uma draga de Ekman-Birge, respectivamente, armazenadas em tubos *falcon* estéreis de 50 mL, que foram armazenados em temperatura ambiente, para posterior cultivo (24-72 horas) e isolamento.

Ponto	Local de coleta	Localização geográfica
Ponto 1	Drenagem Ácida de Mina	6°26'42.3"S 50°04'36.9"W
Ponto 2	Lagoa Amendoim	6°23'54.1"S 50°22'17.6"W
Ponto 3	Lagoa Amendoim	6°24'03.0"S 50°22'18.8"W
Ponto 4	Lagoa Violão	6°24'02.5"S 50°21'06.7"W
Ponto 5	Lagoa Violão	6°23'52.3"S 50°21'14.0"W
Ponto 6	Lagoa Três Irmãs – 1	6°20'51.7"S 50°26'52.3"W
Ponto 7	Lagoa Três Irmãs – 1	6°20'47.7"S 50°26'48.2"W
Ponto 8	Lagoa Três Irmãs – 2	6°21'09.6"S 50°27'01.9"W
Ponto 9	Lagoa Três Irmãs – 3	6°21'12.7"S 50°26'39.5"W
Ponto 10	Lagoa Três Irmãs – 3	6°21'19.4"S 50°26'44.2"W
Ponto 11	Lagoa Três Irmãs – 3	6°21'23.5"S 50°26'53.6"W

**Tabela 1** Pontos de coletas na região de Drenagem Ácida de Mina remediada e nas lagoas Amendoim, Violão e Três Irmãs, com respectivas coordenadas e identificações.

#### 4.2. Cultivo e isolamento

Cada amostra foi transferida diretamente para dois frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo BG-11 (Tabela 2), sendo um com pH 2,5 e outro com pH 7,1, armazenadas em câmara Fitotron® SGC 120 (Weiss Technik UK Ltd., Loughborough, Leicestershire, Reino Unido) sobre fotoperíodo de 14 horas claro e 10 horas escuro, com lâmpadas florescentes e intensidade luminosa de 40-50 µmol.fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> a 26°C, por 20-30 dias.

BG-11	BG-11					
Componentes	Concentração final (mg.L <sup>-1</sup> )					
NaNO <sub>3</sub>	1.500					
K2HPO4.3H2O	40					
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	75					
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36					
Ácido cítrico	6					
Citrato de amônio férrico	6					
EDTA Na <sub>2</sub>	1					
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O)	20					
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86					
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81					
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,222					
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,39					
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079					
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,049					

Tabela 2: Solução de preparo para meio de cultivo BG-11 (WATANABE; TANABE, 2013).

Após o período supracitado, as amostras foram utilizadas como inóculo para processo sucessivo de diluição seriada e plaqueamento (Figura 2), até isolamento de espécies fotossintetizantes, acompanhadas de visualizações constantes ao microscópio óptico, para conferência dos diferentes microrganismos já isolados, e daqueles cultivos ainda mistos.



Figura 2 Esquema gráfico do processo sucessivo de diluição seriada e plaqueamento das amostras coletadas, para obtenção de linhagens isoladas.

#### 4.3. Identificação dos isolados

#### 4.3.1. Identificação morfológica

Foram preparadas lâminas para visualização em microscópio Axio Imager.M2 (Carl Zeiss Iberia S. L., Tres Cantos, Madrid, Espanha), para aquisição de imagens de alta definição, em aumento de 1000x com câmera AxioCam MRc 5 FireWire acoplada ao microscópio e software AxioVision (Carl Zeiss Iberia S. L., Tres Cantos, Madrid, España).

A classificação taxonômica dos isolados foi realizada mediante consulta de literatura especializada, como: BICUDO & MENEZES (2006); RICHMOND & HU (2013); BARSANTI & GUALTIERI (2014); DARIENKO *et al.* (2015); WEHR & JOHN (2015); DARIENKO, GUSTAVS & PRÖSCHOLD (2016); SONG *et al.* (2016); BARCYTĖ, HODAČ & NEDBALOVÁ (2017), entre outros.

#### 4.3.2. Identificação Molecular

#### 4.3.2.1. Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico, 2-4 mL de cultura de células foram concentradas por centrifugação (10.000g, 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com solução MicroBead® do kit de extração de DNA microbiano UltraClean® (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, EUA), prosseguindo a extração conforme as especificações do fabricante. Ao final, o material genético extraído teve sua qualidade e integridade avaliadas em gel de agarose 1%, após corrida eletroforética em tampão TBE 1X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) carregado com tampão de carregamento (glicerol 50%, azul de bromofenol 0,25% e água ultrapura) e SYBR® Green I (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). A documentação do gel foi feita com fotodocumentador Fusion Xpress Spectra (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Alemanha). Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado o marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A concentração de DNA foi mensurada por espectrofotometria em um leitor de microplacas Eon™ (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). Então, as amostras foram congeladas em freezer com temperatura de –20°C até análises posteriores.

#### 4.3.2.2. PCR

A amplificação do DNA código de barra foi realizada com os conjuntos de oligonucleotídeos listados na Tabela 3. Para a reação de amplificação foi utilizada uma solução contendo: tampão para reação de PCR 1X (Tris HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 Unidade de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 0,2 µM de cada iniciador; 5% v/v de DMSO; 10-30 ng de DNA; água ultrapura esterilizada, para um volume final de 25 µL. No termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), as reações foram submetidas ao perfil de termociclagem conforme a Tabela 3. A verificação do tamanho e da integridade dos amplicons resultantes foi realizada em condições similares as descritas na seção 4.3.2.1.

Nome do iniciador	Sequencia (5' – 3')		Alvo	Referência	
27F	AGAGTTTGAT	CCTGGCTCAG		(SANTHANAM et	
1394R	ACGGGCGG	GTGTGRTC	103 IKINA	<i>al</i> ., 2014)	
SR-1f	TACCTGGTTG	ATCCTGCCAG		(HANYUDA et al.,	
18S-C2r	TCCGCAGGTTC	CACCTACGGAG	105 IKINA	2002)	
GF-AB	GARTCTTCIACYGGTACYTGGAC		"h a l	(TOMITANI et al.,	
GR-D	-D TGCCAIACGTGGATACCACC		TDCL	2006)	
Desnaturação		35 Ciclos		Extensão final	
inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão linal	
95°C	95°C	58°C	72°C	72°C	
5 minutos	30 segundos	30 segundos	120 segundos	10 minutos	

Tabela 3: Lista de oligonucleotídeos, respectivos alvos e perfil de termociclagem usados para a identificação molecular de microalgas isoladas de ecossistemas lênticos da região de Carajás-PA.

#### 4.3.2.3. Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando de 10 a 40 ng do produto de PCR purificado, com o kit de sequenciamento Big-Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, EUA), seguindo as instruções do fabricante, usando-se os mesmos oligonucleotídeos da PCR. O ciclo da reação de sequenciamento é formado por 40 ciclos a 95°C por 10 segundos, 50°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a reação, as amostras foram precipitadas em EDTA 125 mM, acetato de sódio 3M e etanol 100% e lavadas em etanol 70%. O sequenciamento foi feito pelo método de Sanger e realizado no sequenciador automático 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

#### 4.3.2.4. Análise das sequências obtidas

As sequencias de DNA obtidas no sequenciamento foram montados em sequências contíguas usando o software Geneious (KEARSE *et al.*, 2012), considerando apenas aquelas com qualidade *phred* maior que 20. Em seguida, foram comparadas com sequências depositadas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando o software *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST; JOHNSON *et al.*, 2008). Posteriormente, tais sequências juntamente com sequências de representantes da classe Trebouxiophyceae disponíveis no banco de dados (Tabela 4) foram alinhadas com o software Mafft (KATOH; STANDLEY, 2013), implementado no Geneious.

Tabela 4 Lista com as espécies,	os clados a que pertencem na classe	Trebouxiophyceae e seus respe	ctivos números de acesso
do GenBank para as sequências	s de rbcL utilizadas na análise filogen	ética do isolado Heveochlorella s	p. MCITV09.

Família	Família Espécie		Clado
Chlorellaceae	Auxenochlorella pyrenoidosa	KR069064	Chlorellales
Chlorellaceae	Chlorella singularis	KC810314	Chlorellales
Chlorellaceae	Chlorella sorokiniana	EF113429	Chlorellales
Chlorellaceae	Chlorella sorokiniana	HM101339	Chlorellales
Chlorellaceae	Chlorella vulgaris	KR054961	Chlorellales
Chlorellaceae	Chlorella vulgaris	KT777987	Chlorellales
Botryococcaceae	Botryococcus braunii	GU951522	Clado Botryococcus
Botryococcaceae	Botryococcus braunii	GU951523	Clado Botryococcus
Botryococcaceae	Botryococcus sp.	JN399235	Clado Botryococcus
Prasiolaceae	Prasiola delicata	EF203020	Clado Prasiola
Prasiolaceae	Prasiola furfuracea	AF189064	Clado Prasiola
Prasiolaceae	Prasiola linearis	AF189065	Clado Prasiola
Prasiolaceae	Prasiola meridionalis	AY694191	Clado Prasiola
Prasiolaceae	Prasiola stipitata	AY694192	Clado Prasiola
Trebouxiophyceae incertae sedis	Chloroidium	KR154339	Clado Watanabea
Trebouxionbyceae incertae sedis	Chloroidium ellipsoideum	HE67/885	Clado Watanahaa
Trebouxiophyceae incertae sedis	Chloroidium engedinense	KP15/3/0	Clado Watanabea
Trebouxiophyceae incertae sedis	Chloroidium saccharophilum	KM51/872	Clado Watanabea
			Clado Watanabea
Trobouxionbycopo incortoo codic	Hevenchlorella hainangensis	KD154241	Clado Watanabea
Trebouxiophyceae incertae sedis		KK 134341 KY225250	Clado Watanabea
Trebouxiophyceae incentae sedis	Heveochlorella sp.	KX235259	
Trebouxiophyceae incentae sedis	Reveocritorella sp.		
Trebouxiophyceae incentae sedis	Parachioroidium labatum		Clado Watanabea
Trebouxiophyceae incentae sedis	Parachioroidium an		
	Parachiorololum sp.	NG/930/9	
Phyllosiphonaceae	Phyliosiphon ansan	KK 104004	
Phyllosiphonaceae	Phyllosiphon cocciaium	K1950844	
Phyliosiphonaceae	Phyliosiphon sp.	KK 154335	
		KIM464714	Clado Watanabea
	Watanabea sp.	KF093823	
I rebouxiaceae	watanabea sp.	KX077899	Clado Watanabea
I rebouxiaceae	Asterochioris giomerata	AJ969633	I rebouxiales
I rebouxiaceae	Asterochioris irregularis	JF502541	Irebouxiales
I rebouxiaceae	Myrmecia biatorellae	AF499685	Irebouxiales
Irebouxiaceae	Myrmecia israelensis	EF113453	Irebouxiales
Trebouxiaceae	Trebouxia angustilobata	JF502557	Trebouxiales
Trebouxiaceae	Trebouxia anticipata	AF189069	Trebouxiales
Trebouxiaceae	Trebouxia australis	JF502558	Trebouxiales
Trebouxiaceae	Trebouxia flava	AJ969637	Trebouxiales
Trebouxiaceae	Trebouxia gelatinosa	AJ969640	Trebouxiales
Trebouxiaceae	Trebouxia potteri	AJ969635	Trebouxiales
Trebouxiaceae	Trebouxia simplex	JF502559	Trebouxiales
Chlamydomonadaceae	Chlamydomonas reinhardtii	AB511846	Grupo externo

O resultado do alinhamento foi usado como entrada no *gateway* CIPRES (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010) para a seleção estatística do melhor modelo de substituição nucleotídica através do jModelTest 2 (DARRIBA *et al.*, 2015), e para a montagem de duas árvores filogenéticas; a primeira por máxima verossimilhança usando RAxML v. 8.2.0 (STAMATAKIS, 2014), teve o suporte relativo

para os nós internos das árvores calculado usando 1000 réplicas de bootstrap; e a segunda pelo consenso de duas corridas paralelas do método de Monte Carlo via cadeia de Markov (MCMC) com MrBayes (RONQUIST *et al.*, 2012), aplicando o modelo evolucionário GTR+G em todo o conjunto de dados, para 50 milhões de gerações, amostrados a cada 100 e os primeiros 25% das árvores descartadas. As duas árvores determinadas foram utilizadas para a geração de uma árvore consenso com o programa TreeGraph (STÖVER; MÜLLER, 2010), posteriormente editada com o software Adobe Illustrator (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EUA).

#### 4.4. Acervo Físico

Os cultivos unialgais estão sendo mantidos na Coleção de Microalgas e Cianobactérias do Instituto Tecnológico Vale (MCITV), nas condições especificadas no item 4.2.

#### 4.5. Potencial Biotecnológico

O isolado MCITV09 foi selecionado como alvo para avaliação da estratégia de resistência a pH ácido por abordagem multiômica, por ser a única linhagem obtida a apresentar tal característica de crescimento *in vitro* em ambiente extremo (pH < 3), condição esta requerida para aplicações biotecnológicas de interesse para a mineração.

#### 4.5.1. Genômica

Para o sequenciamento genômico foi utilizado DNA celular total do isolado MCITV09, extraído conforme o item 4.3.2.1, nos sequenciadores lon Torrent PGM<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e MiniSeq® System (Illumina, San Diego, CA, EUA), seguindo as instruções dos fabricantes para montagem de biblioteca *single-end* e *paired-end*, respectivamente.

#### 4.5.1.1. Controle de qualidade

As leituras obtidas foram submetidas a um controle de qualidade com o software Fastx Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx\_toolkit/), onde foram filtradas as sequencias de qualidade inferior a *phred* 30 e tamanho inferior a 50 bp, posteriormente as extremidades foram removidas até obter pelo menos 80% das bases com qualidade igual ou superior a *phred* 30, novamente as leituras restantes menores que 50 bp foram excluídas.

#### 4.5.1.2. Montagem *De Novo*

Após o controle de qualidade as sequencias provenientes do Illumina foram carregadas no software NOVOPlasty (DIERCKXSENS; MARDULYN; SMITS, 2016), utilizando os genes código de barra de origem plastidial, obtidos no item 4.3.2, como *seed*, para obtenção do genoma cloroplastidial. Este, foi utilizado como referência para mapear as sequencias, com o software Geneious, e eliminar aquelas de origem plastidial. As sequências não mapeadas foram reenviadas ao NOVOPlasty, para a montagem do genoma mitocondrial, tendo a sequência de citocromos c oxidase de *Chlorella sorokiniana* (YP\_009049965.1, NCBI) como *seed*. Além desta abordagem, todas as sequências também foram montadas com o software SPAdes (BANKEVICH *et al.*, 2012), em condição padrão, para obtenção de *scaffolds*. Os *scaffolds* do SPAdes foram então mapeados nos scaffolds montados com o NOVOPlasty, no Geneious, para aumentar a confiança e melhorar as sequências montadas.

#### 4.5.1.3. Anotação

Para a anotação do genoma do cloroplasto foi utilizado o serviço CpGAVAS (LIU *et al.*, 2012; http://www.herbalgenomics.org/0506/cpgavas/analyzer/home) em conjunto com a função de predição de ORF do Geneious e validação com BlastX (JOHNSON *et al.*, 2008; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), para cobrir as regiões não anotadas pelo método automático. Os rRNA foram identificados pelo RNAmmer (LAGESEN *et al.*, 2007; http://www.cbs.dtu.dk/services/RNAmmer/) e os tRNA pelo serviço web tRNAscan-SE (LOWE; CHAN, 2016; http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/).

Os *scaffolds* cromossomais foram submetidos ao servidor WebAugustus (HOFF; STANKE, 2013), previamente treinado com o genoma da cepa *Chlorella variabilis* NC64A (BLANC *et al.*, 2010), para predição gênica. Os genes preditos foram enviados para o *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) para anotação funcional com a ferramenta BlastKoala (KANEHISA; SATO; MORISHIMA, 2016).

#### 4.5.2. Proteômica

#### 4.5.2.1. Cultivo

A linhagem MCITV09 foi submetida a cultivo em quatro frascos erlenmeyers de 1.000 mL contendo 500 mL de meio de cultivo BG-11 pH 2,5 e quatro frascos contendo BG-11 pH 7,1, armazenadas em câmara Fitotron<sup>®</sup> SGC 120 sobre fotoperíodo de 14 horas claro e 10 horas escuro, com lâmpadas florescentes e intensidade luminosa de 40-50 µmol.fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> a 26°C, por 30 dias.

#### 4.5.2.2. Extração de proteínas e quantificação

Após o período de crescimento, os 2 litros de cada amostra foram homogeneizados e as células foram concentradas por centrifugação (4.000g, 30 minutos) em tubos falcon de 50 mL. As proteínas foram isoladas seguindo o protocolo de WANG et al. (2006) modificado. Onde, para cada amostra, foram adicionados 10 mL do tampão SDS denso, sem  $\beta$ -mercaptoetanol, (Tabela 5) e deixadas 5 minutos de repouso em temperatura ambiente. Foram adicionados 500 μL de βmercaptoetanol e deixadas mais 10 minutos de repouso em temperatura ambiente. Cada amostra foi, então, sonicada 3 vezes em gelo por 20 segundos, com intervalos de 30 segundos, evitando a formação de espuma. Após a sonicação o conteúdo de cada tubo falcon de 50 mL foi dividido em tubos Eppendorf® LoBind (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) de 2 mL. Foi adicionado 600 µL de fenol saturado pH 8,0, homogeneizando no vortex e invertendo os tubos vigorosamente por 15 minutos, mantendo os tubos sempre no gelo. Foram centrifugadas (16.000g, 7 minutos, 4ºC) e a fase fenólica foi transferida para um novo tubo, juntando as amostras anteriormente separadas em um mesmo tubo. Foram, centrifugadas novamente (16.000g, 7 minutos, 4°C) e a fase fenólica foi transferida outra vez para um novo tubo. Foi adicionado 3 volumes de solução de precipitação (Tabela 5) gelada e incubada (overnight, -20°C) para precipitação das proteínas. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas (16.000g, 7 min, 4°C) e o precipitado formado foi lavado com 1,5 mL de acetona gelada 80%, vortexando até que o precipitado fosse completamente desfeito. O processo de centrifugação e lavagem do precipitado com acetona foi repetido mais 2 vezes. Foram centrifugadas (16.000g, 7 min, 4°C) e o precipitado formado foi lavado com 1,5 mL de etanol gelado 70%, vortexando até que o precipitado fosse completamente desfeito. Foram centrifugadas (16.000g, 7 min, 4°C) mais uma vez e o precipitado formado foi seco no concentrador à vácuo até evaporar todo o etanol. As proteínas foram então solubilizadas em 400 µL de tampão de solubilização, sonicadas em gelo por 30 segundos cada amostra. Por fim, as amostras foram centrifugadas (10.000g, 5 min) e o sobrenadante, contendo as proteínas, transferido para um novo tubo.

A concentração de proteínas por amostra foi medida no Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

#### 4.5.2.3. Digestão proteica

As amostras foram preparadas para digestão com a redução de proteínas com DTT (ditiotreitol, 5 mM), incubando-as por 25 minutos a 56 °C, seguida pela alquilação com IAA (iodoacetamida, 14 mM) por 30 minutos em temperatura ambiente. A mitigação da IAA residual foi realizada adicionando novamente DTT (5 mM), com incubação de 15 minutos em temperatura ambiente. Foram então diluídas em 1:5 de bicarbonato de amônio (50 mM), seguida pela adição de CaCI (1 mM). A digestão de proteínas foi realizada com tripsina (20 ng/µL), utilizando-se 50 ng/µL de proteína de cada amostra, sendo completadas com ureia 8 M para um volume final de 150 µL cada por 16 horas à 37°C. Posteriormente foi adicionado ácido trifluoracético (TFA) na concentração final de 0,4 % para interromper a reação enzimática.

#### 4.5.2.4. Dessalinização proteica

Para a dessalinização das amostras foram utilizadas colunas de fase sólida C18 Sep-Pak® (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) de 50 mg e 1 mL de capacidade. As colunas foram ativadas com 3 mL de acetonitrila (ACN) 100 %, em seguida equilibrada com 1 mL de ACN 50 % contendo 0,1 % de ácido fórmico, e 3 mL de ácido trifluoracético 0,1 %. As colunas foram carregadas com as amostras individualmente e lavadas com 3 mL de ácido trifluoracético 0,1 %, sendo equilibradas com 1 mL de ácido fórmico 0,1 %. A eluição foi realizada em 2 mL e 1 ml de ACN 50 % e 80 %, respectivamente, contendo 0,1 % de ácido fórmico. Por fim as amostras foram secas em concentrador a vácuo e ressuspendidas em 50 µL de formiato de amônio (10 mM).

Tampão SDS denso					
Componentes	Concentração final				
Sacarose	0,85 M				
Tris-HCl pH 8,0	0,1 M				
SDS	2 %				
β-mercaptoetanol	5 %				
PMSF	1 mM				
Benzamidina	3 mM				
PVPP	2 %				
H₂O miliQ	q.s.p.				
Solução de pro	ecipitação				
Acetato de amônia em metanol	0,1 M				
Tampão de sol	ubilização				
Ureia	7 M				
Tioureia	2 M				
CHAPS	4%				
H <sub>2</sub> O miliQ	q.s.p.				
Tampão IPG	0,5%				
DTT	20 Mm				

Tabela 5: Composição das soluções para extração de proteínas (WANG et al., 2006).

#### 4.5.2.5. 2D-UPLC-MSE

Os peptídeos digeridos (5 µl, aproximadamente 4.500 ηg) foram injetados no cromatógrafo nanoACQUITY UPLC<sup>®</sup> (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), configurado para um fracionamento em duas dimensões. Para a primeira dimensão foi utilizada uma coluna analítica de 5 µm XBridge<sup>™</sup> BEH130 C18 (300 µm x 50 mm) em um fluxo de 2 µL por minuto. A segunda dimensão foi montada com uma coluna *trap* C18, 5 µm (180 µm x 20mm) e uma coluna analítica 1.7 µm BEH130<sup>™</sup> C18 1,8 µm (100 µm x 100 mm) em um fluxo de 400 ηL.min<sup>-1</sup>. As amostras foram separadas em 5 frações a partir de um gradiente de 10,8, 14,0, 16,7, 20,4 e 65,0% de acetonitrila.

O cromatógrafo foi acoplado diretamente a um espectrômetro de massas ESI-Q-ToF Synapt<sup>®</sup> G2-Si (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) configurado para operar em modo positivo, e fragmentação contínua (MSE) com a energia de colisão oscilando entre 5 e 40 eV. Foram adquiridos espectros de massas dentro da faixa de 50 a 1.200 Da, com leituras de 0,5 segundos e 0,1 segundos de intervalo entre leituras. A largura do pico e resolução dos espectros de massas foram configurados no modo automático. O peptídeo [Glu-1]-fibrinopeptídeo, de massa 785,4827 Da e cargas +2, foi utilizado como referência e lido a cada 30 segundos, para manter a precisão em 10 partes por milhão.

#### 4.5.2.6. Análise bioinformática

Os espectros iônicos resultantes foram processados e identificados utilizando o aplicativo ProteinLynx<sup>TM</sup> Global Server 3.0.3 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) através de busca contra um banco de dados contendo as sequências de aminoácidos dos genes preditos pelo WebAugustus (conforme o item 4.5.1.3). Os resultados foram exportados para o software Scaffold (Proteome Software Inc., Portland, OR, EUA), onde foi realizado teste t de Student sobre o valor de log<sub>2</sub> da intensidade total dos espectros para cada proteína, para avaliar se a expressão diferencial apontada possuía suporte estatístico (p-valor  $\leq 0,1$ ).

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1. Cultivo e isolamento

Foram obtidos um total de 7 isolados do filo Chlorophyta e 2 do filo Cyanobacteria, todos crescendo em pH 7,1, os quais tiveram um número MCITV atribuído (Figura 3). Destes, apenas o isolado MCITV09 apresentou crescimento em condição de extrema acidez (pH 2,5), o qual foi coletado da zona fótica da Lagoa do Violão, a aproximadamente 1 metro de profundidade, onde o pH media 5,4, a temperatura estava em 27,32°C, o oxigênio dissolvido era de 9,9 mg.L<sup>-1</sup> e a turbidez era de 0,50 NTU.



Figura 3 Microalgas e cianobactérias isoladas da região de Carajás - PA. a) MCITV01, Drenagem ácida de mina (DAM). b) MCITV02, DAM. c) MCITV03, DAM. d) MCITV04, Lagoa do Amendoim. e) MCITV05, Lagoa do Amendoim. f) MCITV06, Lagoa do Violão. g) MCITV07, Lagoa do Violão. h) MCITV08, Lagoa do Violão.

#### 5.2. Identificação do isolado

#### 5.2.1. Identificação morfológica

As células vegetativas de MCITV09 são esféricas, apresentando 4,6 a 11,0 µm de diâmetro e apenas um cloroplasto que ocupa grande parte do interior celular (Figura 4).



Figura 4 Células vegetativas de Heveochlorella sp. MCITV09. Barra de escala: 10 µm

As características morfológicas observadas de forma, tamanho e cloroplasto são similares as descritas em diversos táxons da classe Trebouxiophyceae (ZHANG *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2013; NEUSTUPA *et al.*, 2013; DARIENKO *et al.*, 2015; PROCHÁZKOVÁ; NĚMCOVÁ; NEUSTUPA, 2016; SONG *et al.*, 2016). A qual possui a taxonomia e a identificação de suas espécies reconhecidamente problemáticas, principalmente pela falta de diferenças morfológicas perceptíveis entre vários táxons. Isto justifica os avanços na complexidade dos sistemas de classificação, que vem incluindo dados de diferentes abordagens (genéticos, fisiológicos, ultraestruturais, ecológicos etc.) para definir os limites interespecíficos (JUÁREZ *et al.*, 2011; LELIAERT *et al.*, 2014; DARIENKO; GUSTAVS; PRÖSCHOLD, 2016; MALAVASI *et al.*, 2016).

#### 5.2.2. Identificação Molecular

Dentre as abordagens para classificação microbiana, o código de barra de DNA (do inglês *DNA Barcoding*) se mostra uma ferramenta rápida, replicável e confiável para auxiliar na identificação de um novo isolado (KRESS; ERICKSON, 2012).

O sequenciamento dos genes código de barra de MCITV09; 18S rRNA, 16S rRNA e rbcL, resultaram em sequências de 2.197, 934 e 608 pares de bases (pb), respectivamente. Os resultados dos alinhamentos com a ferramenta BLAST destes genes (Tabela 6), corroborando a observação das características morfológicas, retornaram apenas indivíduos pertencentes a classe Trebouxiophyceae, em sua maioria pertencentes ao clado *Watanabea*, incluindo os de maior identidade com os marcadores mencionados. Tal clado é conhecido como um grupo provisório de organismos recém descritos, em sua maioria unicelulares, com reprodução por autosporulação (NEUSTUPA *et al.*, 2013). Há registros de espécies em diversas condições de estresse, inclusive tolerância a ambientes com baixo pH, como *coccomyxa onubensis* (FUENTES *et al.*, 2016), *Heveochlorella hainangensis* (ZHANG *et al.*, 2008), *Viridiella fridericiana* (HUSS *et al.*, 2002), entre outras.

A sequência de maior identidade com o gene 18S rRNA (Tabela 6) é da espécie *desertella yichangensis*, recentemente descrita na China (SONG *et al.*, 2016). Em contraponto, os indivíduos de maior identidade com os genes plastidiais (Tabela 6) são do gênero *Heveochlorella*, o qual pouco se sabe sobre sua distribuição, suas funções ecológicas e seu metabolismo; possui duas espécies descritas como microalgas epifíticas e endofíticas, sendo uma delas a já mencionada *H. hainangensis* que tem crescimento ótimo em pH 7, mas com capacidade de crescer de maneira mais lenta em pH abaixo de 3 (ZHANG *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2013; SANDERS *et al.*, 2016).

Organismo	Pontuação	Cobertura <i>Query</i>	Identidade	Número de acesso	Gene
Desertella yichangensis G8	2185	76%	99%	KX024690.1	18S rRNA
Trebouxiophyceae sp. BCP-EM2VF32	2089	77%	98%	KF693789.1	18S rRNA
Parachloroidium lobatum CAUP H8503	2012	90%	91%	HF586461.1	18S rRNA
Parachloroidium lobatum CAUP H8502	1975	89%	91%	HF586460.1	18S rRNA
Chloroidium saccharophilum CCAP 211/31	1881	89%	90%	FR865664.1	18S rRNA
Viridiella fridericiana SAG 10.92	1862	77%	94%	FM958481.1	18S rRNA
Trebouxiophyceae sp. KSI-1	1860	95%	98%	LC082307.1	18S rRNA
Viridiella fridericiana 237	1857	77%	94%	AJ439401.2	18S rRNA
Watanabea sp. BCP-SEV1VF9	1823	77%	94%	KF693804.1	18S rRNA
Watanabea sp. BCP-SEV2VF2	1803	73%	94%	KF693805.1	18S rRNA
Heveochlorella hainangensis FGG01	1962	100%	98%	EF595525.1	16S rRNA
Heveochlorella roystonensis ITBB A3-8	977	96%	95%	JN003600.2	16S rRNA
Chlorella luteoviridis CCAP 211/3	811	45%	95%	AJ242767.1	16S rRNA
Chlorella saccharophila 211-1d	771	94%	89%	D11349.1	16S rRNA
Chlorella sp. UMPCCC 1229	765	78%	89%	KM218899.1	16S rRNA
<i>Ettlia pseudoalveolaris</i> UTEX 975	713	94%	88%	KM462869.1	16S rRNA
Watanabea reniformis SAG 211-9b	710	94%	87%	KM462863.1	16S rRNA
Oocystis solitaria SAG 83.80	676	93%	87%	FJ968739.1	16S rRNA
Chlorophyta symbiont of Baikalospongia sp.	664	93%	87%	GU936886.1	16S rRNA
Uncultured chlorophyte clone 100M1_F12	660	55%	86%	DQ514040.1	16S rRNA
Heveochlorella hainangensis A354	785	91%	92%	KX235257.1	rbcL
Heveochlorella hainangensis	771	94%	91%	KR154341.1	rbcL
Heveochlorella sp. W15-14	737	93%	90%	KX235279.1	rbcL
Heveochlorella sp. W12-20	726	92%	90%	KX235288.1	rbcL
Heveochlorella sp. W12-16	726	92%	90%	KX235282.1	rbcL
Heveochlorella sp. W12-11	726	92%	90%	KX235276.1	rbcL
Heveochlorella sp. W15-6	723	93%	89%	KX235294.1	rbcL
Heveochlorella sp. W15-15	712	89%	90%	KX235281.1	rbcL
Heveochlorella sp. W15-5	704	92%	89%	KX235293.1	rbcL
Heveochlorella sp. W15-4	702	92%	89%	KX235292.1	rbcL

Tabela 6: 10 melhores correspondências do Blast para o cada um dos genes códigos de barra (18S rRNA, 16S rRNA e rbcL) da Heveochlorella sp. MCITV09.

\*Todos os alinhamentos possuem *e-value* igual a 0.0.

A posição filogenética do isolado MCITV09, baseado no gene rbcL (), reforça sua inclusão no gênero *Heveochlorella*, como um clado monofilético com os outros representantes do gênero, próximo da espécie *Heterochlorella luteoviridis*. Segundo SANDERS *et al.*, (2016), ainda é incerto se *H. luteoviridis* constitui um gênero independente ou outra espécie dentro do gênero *Heveochlorella*, até o presente eles são considerados gêneros irmãos.

SANDERS *et al.*, (2016) demonstraram que o gênero *Heveochlorella* habita também regiões tropicais e subtropicais por todo o globo terrestre e não apenas o leste asiático, onde ocorreram seus primeiros registros (ZHANG *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2013). Os mesmos autores ainda demonstraram a capacidade destes organismos em formar liquens e sugerem que são capazes de proliferar quando em vida livre. Assim, nossos resultados corroboram as hipóteses mais atuais acerca do gênero, visto que foi realizado o isolamento de uma *Heveochlorella* do plâncton de um ecossistema lêntico na região amazônica brasileira, bem como seu cultivo axênico em laboratório em pH 7,1 e 2,5, dados que manifestam a plasticidade adaptativa e ecológica desta microalga.



**Figura 5** Posição filogenética do isolado *Heveochlorella* sp. MCITV09 (em negrito), baseado em sequências de rbcL. Os números nos ramos correspondem a probabilidade posterior bayesiana (BPP) e ao valor de bootstrap (BS) por máxima verossimilhança, respectivamente. Os ramos espessos correspondem os que apresentaram valores de BPP ou BS significativos ( $\geq 0.95$  e  $\geq 70$ , respectivamente). A barra de escala representa o número estimado de substituições por sítio.

#### 5.3. Potencial Biotecnológico

#### 5.3.1. Genômica

#### 5.3.1.1. Controle de qualidade

O sequenciamento realizado na plataforma lon Torrent gerou aproximadamente 5 milhões de sequências, enquanto a plataforma Illumina produziu mais de 15 milhões. Após a finalização dos tratamentos de qualidade 21,48% das *reads* foram descartadas para a primeira biblioteca, e 7,89% para a segunda biblioteca (Tabela 7).

A plataforma de sequenciamento Illumina possui maior capacidade de gerar dados que a plataforma Ion Torrent, e os mesmos apresentam elevada média de qualidade Phred (SALIPANTE *et al.*, 2014; SANDMANN *et al.*, 2017); diversos estudos na literatura comprovam a importância do tratamento de qualidade para leituras geradas por sequenciadores de segunda geração, o que resultará em melhores resultados durante a montagem e consequentemente maior acurácia na anotação de genomas (BRANNOCK; HALANYCH, 2015; MORAN-GILAD *et al.*, 2015).

 Tabela 7: Dados das bibliotecas de Heveochlorella sp. MCITV09 sequenciadas pelas plataformas Ion Torrent e Illumina antes e após o controle de qualidade.

Bibliotecas	Ion Torrent	Illumina
Dados brutos*	5.191.306	15.474.240
Média de tamanho das leituras brutas	303	150
Dados Tratados**	4.076.283	14.253.122
Média de tamanho das leituras tratadas	319	150

\* Quantidade de leituras oriundas da plataforma

\*\* Quantidade de leituras após tratamentos de qualidade

#### 5.3.1.2. Montagem De Novo e anotação

A estratégia utilizada para montagem dos *scaffolds* possibilitou a separação entre os genomas organelares e o genoma cromossômico (Tabela 8). Assim, o genoma do cloroplasto foi montado em uma sequência única circular, contendo 131.313 pb e 34,42% de conteúdo GC (Figura 6); e foram anotados 92 genes, sendo 61 codificantes proteicos, 26 RNA transportadores (tRNAs), 2 rRNAs (16S e 23S rRNA) e 3 proteínas hipotéticas. O genoma mitocondrial foi montado em uma sequência única linear de 99.039 pb e 30,20% de conteúdo GC.

O genoma cromossomal foi montado em 23.775 scaffolds, contendo 80,5 Mpb (1,62 Mpb na maior sequência), 62,10% de conteúdo GC e N50 de 84 Kpb. A predição gênica do WebAugustus retornou 53.821 sequencias codificantes (CDS), das quais

9.651 tiveram função determinada pelo BlastKoala, o RNAmmer retornou 3 rRNAs (18S, 5.8S e 28S rRNA) e o tRNAscan-SE identificou 724 tRNAs.

							Genes	Total
Origem	Scaffolds	Tamanho (pb)	GC%	Proteínas	rRNA	tRNA	Hipotéticos	Genes
Cromossomal	23.775	80.510.176	62,10%	9.651	3	724	44.170	54.548
Plastidial	1	131.313	34,42%	61	2	26	3	92
Mitocondrial	1	99.039	30,20%	-	-	-	-	-





conteúdo GC a cada 50 pb.

#### 5.3.1.3. Genoma Cloroplastidial

Ao comparar o genoma do cloroplasto da *Heveochlorella* sp. MCITV09 com outros representantes da mesma classe (Trebouxiophyceae), depositados no banco de dados do NCBI (Tabela 9), nota-se que o conteúdo GC é similar ao de 19 dos 27 organismos (cuja diferença entre eles é menor ou igual a 5%). Um baixo conteúdo GC (< 40%) está relacionado a maior estabilidade da molécula de DNA e na sua capacidade de autorreplicação (DINER *et al.*, 2017), fatores que podem estar auxiliando na diminuição da pressão por mutações, principalmente quando a microalga está submetida a estresse.

 Tabela 9: Comparativo entre os genomas plastidias de Heveochlorella sp. MCITV09 e organismos da mesma classe (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) disponíveis no GenBank.

Organismo	RefSeq	Tamanho (pb)	GC %	Proteínas	rRNA	tRNA	Genes
<i>Heveochlorella</i> sp. MCITV09	-	131.313	34,42%	61	2	26	92
Auxenochlorella protothecoides	NC_023775.1	84.576	30,76%	78	2	31	111
Botryococcus braunii	NC_025545.1	172.826	42,45%	80	3	31	114
Chlorella sorokiniana	NC_023835.1	109.811	34,02%	78	3	31	112
Chlorella variabilis	NC_015359.1	124.579	34,01%	80	3	32	115
Chlorella vulgaris	NC_001865.1	150.613	31,56%	174	3	33	210
Choricystis parasitica	NC_025539.1	94.206	45,45%	79	3	29	111
Coccomyxa subellipsoidea	NC_015084.1	175.731	50,73%	80	3	32	115
Dicloster acuatus	NC_025546.1	169.201	30,02%	87	6	35	128
Edaphochlorella mirabilis	NC_025528.1	167.972	31,46%	77	6	32	115
Elliptochloris bilobata	NC_025548.1	134.677	45,77%	82	3	30	115
Fusochloris perforata	NC_025543.1	148.459	35,13%	75	3	29	107
Koliella longiseta	NC_025531.1	197.094	31,42%	80	6	32	118
Lobosphaera incisa	NC_025533.1	156.031	27,79%	78	3	30	111
Marvania geminata	NC_025549.1	108.470	38,21%	79	3	32	114
Microthamnion kuetzingianum	NC_025537.1	158.609	34,75%	75	3	29	107
Myrmecia israelensis	NC_025525.1	146.596	30,38%	78	3	31	112
Neocystis brevis	NC_025535.1	211.747	31,38%	84	3	30	117
Parachlorella kessleri	NC_012978.1	123.994	30,00%	84	6	36	126
Paradoxia multiseta	NC_025540.1	183.394	50,58%	90	3	32	125
Planctonema lauterbornii	NC_025541.1	114.128	33,17%	82	6	35	123
Pseudochlorella signiensis	NC_025529.1	236.463	33,37%	80	6	32	118
Pseudochloris wilhelmii	NC_025547.1	109.775	36,66%	84	6	36	126
Stichococcus bacillaris	NC_025527.1	116.952	31,85%	85	3	27	115
Symbiochloris reticulata	NC_025524.1	289.394	35,94%	82	3	31	116
Trebouxiophyceae sp.	NC_018569.1	149.707	57,66%	80	3	32	115
Watanabea reniformis	NC_025526.1	201.425	41,20%	87	3	28	118
Xylochloris irregularis	NC_025534.1	181.542	39,65%	96	6	38	140

A quantidade de genes (rRNAs, tRNAs e genes codificantes de proteínas) é menor que a de todas as espécies comparadas, o que pode estar relacionado com a necessidade de melhorar a anotação realizada; ou pode ter relação com a transferência gênica do cpDNA para o genoma cromossomal (NOT *et al.*, 2012); outra opção ainda é de que, por se tratar de um organismo ainda pouco conhecido, esta seja a estrutura do seu genoma. Está questão só pode ser totalmente esclarecida quando mais dados forem gerados acerca de novos isolados, visto que este é o primeiro registro genômico do gênero.

O tamanho do genoma cloroplastidial não é uniforme entre eles, variando em mais de 200 Kpb (de 84.576 a 289.394 pb). Outra característica, comum entre os 27 indivíduos previamente descritos, observada no cpDNA do novo isolado é a ausência da estrutura quadripartite (uma região de cópia única grande e uma região de cópia única curta intercaladas por duas regiões de repetição invertida). Tal estrutura está presente em diversas linhagens do reino Viridiplantae, incluindo tanto clorófitas quanto estreptófitas (NOT *et al.*, 2012).

#### 5.3.2. Proteômica

Das 53.821 CDSs, preditas pelo WebAugustus, 213 tiveram expressão identificada em pH 2,5, enquanto 232 foram expressas em pH 7,1 (Figura 7). Em conjunto, as proteínas expressas em ambas condições somam 247, sendo 42,51% sem função conhecida (Tabela 10), demonstrando a limitação do conteúdo disponível nos bancos de dados e corroborando a necessidade de intensificação de estudos aprofundados, que visem elucidar os potenciais metabólico e genético, bem como auxiliar no processo de compreensão dos mecanismos de adaptação da *Heveochlorella* sp. MCITV09, e de outras microalgas, a ambientes extremos.

Dentre as 198 proteínas expressas em ambas as condições, 24 foram consideradas diferencialmente expressas (Tabela 10), por apresentarem valores de  $\log_2$  do *fold change* maiores que 1 ou menores que -1, com significância estatística (p-valor  $\leq 0,1$ ). Das proteínas hiperexpressas, 71,43% tiveram uma função atribuída pelo BlastKoala (Tabela 11) e, nenhuma das hipoexpressas teve função identificada.



Figura 7 Diagrama de Venn representando o número de proteínas expressas por condição

Tabela 10: Quantidade de proteínas detectadas e de proteínas com expressão diferencial, para dois cultivos independentes da microalga *Heveochlorella* sp. MCITV09 em pH 2,5 e pH 7,1.

		Função	Função	
		Conhecida	Desconhecida	Total
Proteínas expressas		141	106	247
Proteínas com	Hiperexpressas*	14	4	18
expressão diferencial	Hipoexpressas**	0	6	6

\* Proteínas com  $\log_2 \text{ fold change} \ge 1 \text{ e p-valor} \le 0,1$ 

\*\* Proteínas com  $\log_2 \text{ fold change} \le -1 \text{ e p-valor} \le 0,1$ 

As estratégias mais difundidas entre as algas para tolerância ao estresse ácido são as capacidades de (1) diminuir a condutância da membrana plasmática para H<sup>+</sup>, (2) bombear H<sup>+</sup> para fora da célula e (3) tamponamento do citoplasma, o que acarreta em alto custo energético para produção e manutenção das enzimas de resistência (GROSS, 2000; GIMMLER, 2001; MESSERLI *et al.*, 2005; FUENTES *et al.*, 2016). No presente proteoma foram observados os 25 processos biológicos mais representativos do *Gene Ontology* (GO; Figura 8), identificados pelo Blast2GO, para as proteínas hiperexpressas na condição de pH ácido em relação ao meio neutro.

Locus	Produto	Número KO	pH 7,1 Log <sub>2</sub> da Intensidade total dos espectros	pH 2,5 Log <sub>2</sub> da Intensidade total dos espectros	Log <sub>2</sub> Fold change*
g22262	ATPeV1A – Subunidade A da H+-ATPases do tipo V	K02145	10,80	15,52	4,72
g15663	GBE1 – Enzima Ramificadora de 1,4-alfa-Glucana	K00700	10,11	14,06	3,95
g24746	UGP2 – UTP-Glucose-1-Fosfato Uridililtransferase	K00963	8,64	12,43	3,79
g21913	ASD – Aspartato-Semialdeído Desidrogenase	K00133	10,56	13,80	3,24
g11539	eEF1A – Fator de alongamento 1-alfa	K03231	13,11	16,11	3,01
g2487	LHCA5 – Proteína de ligação 5 do complexo de captação de luz l	K08911	9,95	12,91	2,96
g17369	Endoglucanase	K01179	10,14	12,45	2,31
g16687	GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	K00134	13,22	15,45	2,23
g14886	Subunidade do tipo beta-2 da Proteína de ligação a nucleotídeos de guanina	K14753	12,34	14,46	2,12
g9345	LHCA3 – Proteína de ligação 3 do complexo de captação de luz l	K08909	9,98	11,95	1,97
g12793	H2A – Histona H2A	K11251	10,53	12,32	1,79
g14197	DLAT – Diidrolipoamida acetiltransferase (E2)	K00627	10,06	11,66	1,61
g22887	EFG – Fator de alongamento G	K02355	10,05	11,29	1,24
g22919	psbO – proteína estabilizadora de manganês (MSP) do fotossistema II	K02716	15,95	17,15	1,20

Tabela 11 Proteínas hiperexpressas pela Heveochlorella sp. MCITV09 quando cultivada em pH ácido (2,5), em comparação com o cultivo em pH neutro (7,1).

\* São mostrados apenas resultados cujos valores são estatisticamente significativos (p-valor ≤ 0,1)



Figura 8 Gráfico com os 25 processos biológicos, do *Gene Ontology*, mais representativos dos genes hiperexpressos pela *Heveochlorella* sp. MCITV09 cultivada em pH ácido (2,5), para o total de genes anotados em cada categoria.

Destacam-se os processos relacionados com o metabolismo energético, como a fotossíntese, que possui 3 proteínas hiperexpressas, em meio a 30 proteínas anotadas nesta categoria do GO (), sendo dois componentes do complexo proteico coletor de luz do fotossistema I (LHCA3 e LHCA5) e a proteína estabilizadora de manganês do fotossistema II (PsbO). Além destas, a (item d) mostra outras proteínas hiperexpressas, que estão sendo utilizadas pela *Heveochlorella* sp. MCITV09 como forma de armazenar e acelerar sua produção de energia, são elas: duas enzimas envolvidas na transformação de glicose em amido (GBE1 – Enzima Ramificadora de 1,4-alfa-Glucana e UGP2 – UTP-Glucose-1-Fosfato Uridililtransferase), uma enzima da glicólise (GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e um componente enzimático da descarboxilação do piruvato (DLAT – Diidrolipoamida acetiltransferase).



Figura 9 a) Proteínas transmembranas responsáveis pela fotossíntese. b) Complexos proteico captador de luz. c) Genes envolvidos na fotossíntese da *Heveochlorella* sp. MCITV09. Os retângulos representam os enzimas hiperexpressas em pH 2,5 (vermelho), identificados no proteoma (azul) ou encontrados somente no genoma (amarelo). Adaptado do serviço web Kegg (http://www.genome.jp/kegg).



Figura 10 Vias metabólicas da Heveochlorella sp. MCITV09 relacionadas com a produção de energia. Os retângulos representam os enzimas hiperexpressas em pH 2,5 (vermelho), identificados no proteoma (azul) ou encontrados somente no genoma (amarelo). Adaptado do serviço web Kegg (http://www.genome.jp/kegg).

Todas as enzimas supracitadas evidenciam o estresse energético sofrido pela microalga, decorrente do estresse ácido. Principalmente pelo fato de exercerem funções chave nos processos que atuam.

A última proteína inclusa nos processos de produção de energia é uma endoglucanase (EC 3.2.1.4), enzima que realiza a primeira etapa de quebra da celulose, gerando polissacarídeos menores (também chamados de celodextrinas), que podem servir para reestruturação da parede celular ou como fonte de glicose (MACLACHLAN; CARRINGTON, 1991; RODRIGUES; BON, 2011).

Outro conjunto de enzimas hiperexpressas pela *Heveochlorella* sp. MCITV09, em resposta ao estresse ácido, formado por uma enzima envolvida na biossíntese de aminoácidos (ASD – Aspartato-Semialdeído Desidrogenase), uma histona (H2A) e dois fatores de alongamento da síntese proteica (eEF1A – Fator de alongamento 1alfa e EFG – Fator de alongamento G), sugere uma possível alteração na dinâmica de síntese de proteínas, de modo similar ao observado na resposta da *Dunaliella salina* a alta salinidade (LISKA, 2004).

A proteína com maior diferença de expressão (mais de 26x superior no meio com pH ácido, em relação ao meio com pH neutro) foi a subunidade A da H<sup>+</sup>-ATPases vacuolar. O conjunto completo desta bomba de prótons utiliza a energia da hidrolise de ATP para promover o fluxo de H<sup>+</sup> do citoplasma para o lúmen de vacúolos ou diretamente para o exterior celular (BORON, 2004; TAYLOR; BROWNLEE; WHEELER, 2012). A presença desta subunidade no proteoma da *Heveochlorella* sp. MCITV09 e seu nível de expressão corroboram a importância deste sistema para a tolerância das microalgas em ambiente de estresse elevado, bem como evidenciam o papel da própria subunidade A como fator fundamental para a rápida e eficiente regulação da atividade de regulação homeostática, devido a sua sensibilidade para a ativação ou desativação da bomba (PARIDA; DAS, 2005; CIPRIANO *et al.*, 2008).

## 6. CONCLUSÃO

Os ecossistemas lênticos da região de Carajás se mostraram promissores para a prospecção de microalgas acidotolerantes, cultiváveis em condições de laboratório. A utilização de microscopia óptica para identificação morfológica dos gêneros da classe Trebouxiophyceae se mostra ineficiente, tornando imprescindível a utilização de outros métodos. O sequenciamento de genes código de barra mostrou-se como uma ferramenta prática e altamente eficiente, na identificação preliminar de um novo isolado microalgal. As análises genômica e proteômica empregadas no presente estudo contribuíram para o entendimento do processo de resistência ao estresse ácido no gênero *Heveochlorella*, demonstrando seu aumento de demanda energética, bem como apresenta a subunidade A da H<sup>+</sup>-ATPases vacuolar como candidato na regulação homeostática da população estudada.

## REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, 13 mar. 2003.

BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, maio 2012.

BARCLAY, W.; APT, K. Strategies for Bioprospecting Microalgae for Potential Commercial Applications. In: **Handbook of Microalgal Culture**. 2. ed. Oxford, UK: John Wiley & Sons Ltda, 2013. p. 69–79.

BARCYTĖ, D.; HODAČ, L.; NEDBALOVÁ, L. Lunachloris lukesovae gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid green alga isolated from soil in South Bohemia, Czech Republic. **European Journal of Phycology**, v. 52, n. 3, p. 281–291, 3 jul. 2017.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae**: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. 2. ed. Boca Raton, EUA: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2014.

BARTON, L. L.; MANDL, M.; LOY, A. (Ed.). **Geomicrobiology**: Molecular and environmental perspective. Dordrecht, Holanda: Springer Netherlands, 2010.

BELLINGER, E. G.; SIGEE, D. C. A Key to the More Frequently Occurring Freshwater Algae. In: **Freshwater Algae**: Identification, Enumeration and Use as Bioindicators. 2. ed. Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons Ltda, 2015. p. 141–252.

BICKERTON, P. et al. Spatial and temporal specificity of Ca 2+ signalling in Chlamydomonas reinhardtii in response to osmotic stress. **New Phytologist**, v. 212, n. 4, p. 920–933, dez. 2016.

BICUDO, C. E. de M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil**: Chave para identificação e descrições. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2006.

BLANC, G. *et al.* The Chlorella variabilis NC64A Genome Reveals Adaptation to Photosymbiosis, Coevolution with Viruses, and Cryptic Sex. **The Plant Cell**, v. 22, n. 9, p. 2943–2955, set. 2010.

BORON, W. Regulation of intracellular pH. **Advances in physiology education**, v. 28, p. 160–179, 2004.

BRAKE, S. S.; HASIOTIS, S. T. Eukaryote-Dominated Biofilms and Their Significance in Acidic Environments. **Geomicrobiology Journal**, v. 27, n. 6–7, p. 534–558, 10 set. 2010.

BRANNOCK, P. M.; HALANYCH, K. M. Meiofaunal community analysis by highthroughput sequencing: Comparison of extraction, quality filtering, and clustering methods. **Marine Genomics**, v. 23, p. 67–75, out. 2015.

BRASIL. **Relatório Técnico 23**: Perfil da Mineração de Cobre. Brasília, DF: Ministério de Minas e Energia, 2009.

CADORET, J.-P.; GARNIER, M.; SAINT-JEAN, B. Microalgae, Functional Genomics and Biotechnology. In: PIGANEAU, G. (Ed.). **Genomic Insights into the Biology of Algae** (Advances in Botanical Research, v. 64). San Diego, EUA: Elsevier Ltd, 2012. p. 285–341.

CIPRIANO, D. J. et al. Structure and regulation of the vacuolar ATPases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1777, n. 7–8, p. 599–604, jul. 2008.

DARIENKO, T. et al. Evaluating the Species Boundaries of Green Microalgae (Coccomyxa, Trebouxiophyceae, Chlorophyta) Using Integrative Taxonomy and DNA Barcoding with Further Implications for the Species Identification in Environmental Samples. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0127838, 16 jun. 2015.

DARIENKO, T.; GUSTAVS, L.; PRÖSCHOLD, T. Species concept and nomenclatural changes within the genera Elliptochloris and Pseudochlorella (Trebouxiophyceae) based on an integrative approach. **Journal of Phycology**, v. 52, n. 6, p. 1125–1145, dez. 2016.

DARRIBA, D. et al. Europe PMC Funders Group jModelTest 2 : more models , new heuristics and high- performance computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 6–9, 2015.

DAS, B. K. et al. Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization. **Water Research**, v. 43, n. 4, p. 883–894, mar. 2009a.

DAS, B. K. et al. Eukaryotes in acidic mine drainage environments: potential applications in bioremediation. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 8, n. 3, p. 257–274, 18 set. 2009b.

DIERCKXSENS, N.; MARDULYN, P.; SMITS, G. NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 4, p. gkw955, 24 out. 2016.

DINER, R. E. et al. Diatom centromeres suggest a mechanism for nuclear DNA acquisition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 29, p. E6015–E6024, 18 jul. 2017.

DNPM. **Anuário Mineral Brasileiro**. Brasília: Departamento Nacional de Produção Mineral - DNPM, 2010.

DOMOZYCH, D. S. et al. The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. 82, p. 1–7, 8 May 2012.

DOPSON, M. et al. S. Metal resistance or tolerance? Acidophiles confront high metal loads via both abiotic and biotic mechanisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 157, 2014.

DOSHI, S. M. **Bioremediation of Acid Mine Drainage Using Sulfate-Reducing Bacteria**. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 2016.

FUCÍKOVÁ, K. et al. New phylogenetic hypotheses for the core Chlorophyta based on chloroplast sequence data. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 2, n. 63, p. 1–12, 17 out. 2014.

FUENTES, J. L. et al. Phylogenetic characterization and morphological and physiological aspects of a novel acidotolerant and halotolerant microalga Coccomyxa onubensis sp. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 6, p. 3281–3282, 12 dez. 2016.

GIMMLER, H. Acidophilic and Acidotolerant Algae. In: **Algal Adaptation to Environmental Stresses**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001. p. 259–290.

GROSS, W. Ecophysiology of algae living in highly acidic environments. **Hydrobiologia**, v. 433, n. 1/3, p. 31–37, Aug. 2000.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <a href="http://www.algaebase.org">http://www.algaebase.org</a>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

HANYUDA, T. et al. Phylogenetic relationships within Cladophorales (Ulvophyceae, Chlorophyta) inferred from 18S rRNA gene sequences, with special reference to aegagropila linnaei. **Journal of Phycology**, v. 38, n. 3, p. 564–571, 2002.

HOFF, K. J.; STANKE, M. WebAUGUSTUS--a web service for training AUGUSTUS and predicting genes in eukaryotes. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. W1, p. W123–W128, 1 jul. 2013.

HOGSDEN, K. L.; HARDING, J. S. Consequences of acid mine drainage for the structure and function of benthic stream communities: a review. **Freshwater Science**, v. 31, n. 1, p. 108–120, mar. 2012.

HONG, S.-J.; LEE, C.-G. Microalgal Systems Biology Through Genome-Scale Metabolic Reconstructions for Industrial Applications. In: KIM, S.-K. (Ed.). **Handbook** of Marine Microalgae. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 353–370.

HU, K. et al. A New Heterotrophic Strain for Bioleaching of Low Grade Complex Copper Ore. **Minerals**, v. 6, n. 1, p. 12, 6 fev. 2016.

HUSS, V. A. et al. Phylogenetic relationships and taxonomic position of Chlorella-like isolates from low pH environments. **BMC Evolutionary Biology**, v. 2, n. 1, p. 13, 2002.

IBAMA. Plano de manejo para uso múltiplo da Floresta Nacional de Carajás. [s.l.] Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2003.

ICMBIO. **Plano de Manejo Floresta Nacional de Carajás:** Diagnóstico. Brasília, DF: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2016a. v.1

ICMBIO. **Plano de Manejo Floresta Nacional de Carajás:** Planejamento. Brasília, DF: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2016b. v. 2

JOHNSON, D. Recent Developments in Microbiological Approaches for Securing Mine Wastes and for Recovering Metals from Mine Waters. **Minerals**, v. 4, n. 2, p. 279–292, 14 abr. 2014.

JOHNSON, M. et al. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Web Server, p. W5–W9, 19 maio 2008.

JUÁREZ, Á. B. et al. A Parachlorella kessleri (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) strain from an extremely acidic geothermal pond in Argentina. **Phycologia**, v. 50, n. 4, p. 413–421, 13 jul. 2011.

KANEHISA, M.; SATO, Y.; MORISHIMA, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 4, p. 726–731, fev. 2016.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Mol. Biol. Evol.**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 15 jun. 2012.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. DNA Barcodes: Methods and Protocols. In: WALKER, J. M.; ERICKSON, D. L. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. New York, NY: Springer Science & Business Media, 2012. p. 3–8.

LAGESEN, K. et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 9, p. 3100–3108, maio 2007.

LANE, A. E.; BURRIS, J. E. Effects of Environmental pH on the Internal pH of Chlorella pyrenoidosa, Scenedesmus quadricauda, and Euglena mutabilis. **Plant physiology**, v. 68, n. 2, p. 439–42, 29 ago. 1981.

LELIAERT, F. et al. DNA-based species delimitation in algae. **European Journal of Phycology**, v. 49, n. 2, p. 179–196, 3 abr. 2014.

LISKA, A. J. Enhanced Photosynthesis and Redox Energy Production Contribute to Salinity Tolerance in Dunaliella as Revealed by Homology-Based Proteomics. **Plant Physiology**, v. 136, n. 1, p. 2806–2817, 1 set. 2004.

LIU, C. et al. CpGAVAS, an integrated web server for the annotation, visualization, analysis, and GenBank submission of completely sequenced chloroplast genome sequences. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 715, 2012.

LOWE, T. M.; CHAN, P. P. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W54–W57, 8 jul. 2016.

MA, S. et al. A novel species in the genus Heveochlorella (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) witnesses the evolution from an epiphytic into an endophytic lifestyle in tree-dwelling green algae. **European Journal of Phycology**, v. 48, n. 2, p. 200–209, maio 2013.

MACKINDER, L. C. M. The Chlamydomonas CO 2 -concentrating mechanism and its potential for engineering photosynthesis in plants. **New Phytologist**, p. 1-8, 2017.

MACLACHLAN, G.; CARRINGTON, S. Plant Cellulases and Their Role in Plant Development. In: HAIGLER, C. H.; WEIMER, P. J. (Ed.). **Biosynthesis and biodegradation of cellulose**. Nova York, EUA: Marcel Dekker, 1991. p. 599–600.

MADEIRA, J. A. et al. (Ed.). **Geossistemas Ferruginosos do Brasil**: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais. Belo Horizonte, MG: 3i Editora, 2015. p. 521–545.

MALAVASI, V. et al. DNA-based taxonomy in ecologically versatile microalgae: A reevaluation of the species concept within the coccoid green algal genus Coccomyxa (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0151137, 30 mar. 2016.

MARTINS, F. D. et al. (Ed.). Fauna da Floresta Nacional de Carajás: Estudos sobre vertebrados terrestres. São Paulo, SP: Nitro Imagens, 2012.

MESSERLI, M. A. et al. Life at acidic pH imposes an increased energetic cost for a eukaryotic acidophile. **The Journal of experimental biology**, v. 208, n. Pt 13, p. 2569–79, 1 jul. 2005.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: GATEWAY COMPUTING ENVIRONMENTS WORKSHOP (GCE), 2010, New Orleans, LA. **Anais**... [s.l.]: IEEE, 2010. p. 1-8.

MONTEIRO, L. V. S. et al. Mineral chemistry of ore and hydrothermal alteration at the Sossego iron oxide–copper–gold deposit, Carajás Mineral Province, Brazil. **Ore Geology Reviews**, v. 34, n. 3, p. 317–336, nov. 2008.

MORAN-GILAD, J. et al. Proficiency testing for bacterial whole genome sequencing: an end-user survey of current capabilities, requirements and priorities. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 174, 3 dez. 2015.

NANCUCHEO, I.; JOHNSON, D. B. Significance of Microbial Communities and Interactions in Safeguarding Reactive Mine Tailings by Ecological Engineering. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8201–8208, 1 dez. 2011.

ŇANCUCHEO, I.; JOHNSON, D. B. Acidophilic algae isolated from mine-impacted environments and their roles in sustaining heterotrophic acidophiles. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 325, p. 1-8, Sep. 2012.

NEUSTUPA, J. et al. Parachloroidium gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel genus of coccoid green algae from subaerial corticolous biofilms. **Phycologia**, v. 52, n. 5, p. 411–421, 4 set. 2013.

NISHIKAWA, K.; TOMINAGA, N. Isolation, growth, ultrastructure, and metal tolerance of the green alga, Chlamydomonas acidophila (Chlorophyta). **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 65, n. 12, p. 2650–6, 22 dez. 2001.

NOT, F. et al. Diversity and Ecology of Eukaryotic Marine Phytoplankton. In: PIGANEAU, G. (Ed.). **Genomic Insights into the Biology of Algae** (Advances in Botanical Research, v. 64). San Diego, EUA: Elsevier Ltda, 2012. p. 1–53.

OISHI, Bruno Oliva. **Estudo da capacidade de sorção de cobre por Pseudomonas putida sp. em reator.** 2014. Tese (Doutorado em Biotecnologia) -Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PAL, R.; CHOUDHURY, A. K. A Brief Introduction to Phytoplanktons. In: **An Introduction to Phytoplanktons**: Diversity and Ecology. Nova Delhi, India: Springer India, 2014a. p. 1–41.

PAL, R.; CHOUDHURY, A. K. **An Introduction to Phytoplanktons**: Diversity and Ecology. Nova Delhi, India: Springer India, 2014b.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, n. 3, p. 324–349, mar. 2005.

PÉREZ-PÉREZ, M. E. et al. The Deep Thioredoxome in Chlamydomonas reinhardtii : New Insights into Redox Regulation. **Molecular Plant**, v. 10, n. 8, p. 1107–1125, ago. 2017.

PICK, U. Dunaliella Acidophila: A Most Extreme Acidophilic Alga. In: SECKBACH, J. (Ed.). **Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999. p. 465–478.

PROCHÁZKOVÁ, K.; NĚMCOVÁ, Y.; NEUSTUPA, J. Phyllosiphon ari sp. nov. (Watanabea clade, Trebouxiophyceae), a new parasitic species isolated from leaves of Arum italicum (Araceae). **Phytotaxa**, v. 283, n. 2, p. 143, 3 nov. 2016.

RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltda, 2013.

RODRIGUES, A. F. da S.; HEIDER, M.; FONSECA, D. S. Cobre. In: RODRIGUES, A. F. DA S. (Ed.). **Economia Mineral do Brasil**. Brasília, DF: DNPM, 2009. p. 216–235.

RODRIGUES, M. A.; BON, E. P. da S. Evaluation of Chlorella (Chlorophyta) as Source of Fermentable Sugars via Cell Wall Enzymatic Hydrolysis. **Enzyme Research**, p. 1–5, 2011.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539–542, maio 2012.

ROTHBERG, J. M. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 348–352, 20 jul. 2011.

SAHOO, P. K. et al. Influence of seasonal variation on the hydro-biogeochemical characteristics of two upland lakes in the Southeastern Amazon, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 4, p. 2211–2227, dez. 2016.

SALIPANTE, S. J. et al. Performance Comparison of Illumina and Ion Torrent Next-Generation Sequencing Platforms for 16S rRNA-Based Bacterial Community Profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 24, p. 7583–7591, 15 dez. 2014.

SANDERS, W. B. et al. Heveochlorella (Trebouxiophyceae): a little-known genus of unicellular green algae outside the Trebouxiales emerges unexpectedly as a major clade of lichen photobionts in foliicolous communities. **Journal of Phycology**, v. 52, n. 5, p. 840–853, out. 2016.

SANDMANN, S. et al. GLM-based optimization of NGS data analysis: A case study of Roche 454, Ion Torrent PGM and Illumina NextSeq sequencing data. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171983, 21 fev. 2017.

SANTHANAM, R. et al. Analysis of Plant-Bacteria Interactions in Their Native Habitat: Bacterial Communities Associated with Wild Tobacco Are Independent of Endogenous Jasmonic Acid Levels and Developmental Stages. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e94710, 11 abr. 2014.

SCHAEFER, C. E. G. R. et al. The Physical Environment of Rupestrian Grasslands (Campos Rupestres) in Brazil: Geological, Geomorphological and Pedological Characteristics, and Interplays. In: **Ecology and Conservation of Mountaintop grasslands in Brazil**. [s.l.] Springer International Publishing, 2016a. p. 15–53.

SCHAEFER, C. E. G. R. et al. Características químicas e mineralogia de solos perférricos da Serra Sul de Carajás Chemical and mineralogy of iron rich soils from Serra Sul de Carajás. **Ciências Naturais**, v. 11, n. 1, p. 57–69, 2016b.

SCHIPPERS, A. et al. Biomining: Metal Recovery from Ores with Microorganisms. In: SCHIPPERS, A.; GLOMBITZA, F.; SAND, W. (Ed.). **Geobiotechnology I**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 1–47.

SCHNEIDER, T.; RIEDEL, K. Environmental Proteomics: Studying Structure and Function of Microbial Communities. In: **Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. p. 91–108.

SCHRODA, M.; HEMME, D.; MÜHLHAUS, T. The Chlamydomonas heat stress response. **The Plant Journal**, v. 82, n. 3, p. 466–480, maio 2015.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135–1145, out. 2008.

SONG, H. et al. Three novel species of coccoid green algae within the Watanabea clade (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5465–5477, 1 dez. 2016.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and postanalysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312–1313, 2014.

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **Bioinformatics**, v. 11, n. 7, p. 1–9, 2010.

TAYLOR, A. R.; BROWNLEE, C.; WHEELER, G. L. Proton channels in algae: reasons to be excited. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 11, p. 675–684, nov. 2012.

TOMITANI, A. et al. The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecularphylogenetic and paleontological perspectives. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 14, p. 5442–5447, 4 abr. 2006.

VASCONCELOS, J. M. et al. Solos metalíferos: atributos químicos nas diferentes fitofisionomias da Serra Sul, Serra dos Carajás, Pará, Brasil. **Ciências Naturais**, v. 11, n. 1, p. 49–55, 2016.

VINCENT, A. T. et al. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. **Journal of Microbiological Methods**, v. 138, p. 60–71, jul. 2016.

WANG, W. et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, v. 27, n. 13, p. 2782–2786, 2006.

WATANABE, M. M.; TANABE, Y. Biology and Industrial Potential of Botryococcus braunii. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, Reino Unido: John Wiley & Sons Ltda, 2013. p. 369–387.

WEHR, J. D.; SHEATH, R. G.; KOCIOLEK, J. P. (Ed.). **Freshwater Algae of North America**: Ecology and Classification. 2. ed. Londres, Reino Unido: Elsevier Inc., 2015.

WINCK, F. V.; PÁEZ MELO, D. O.; GONZÁLEZ BARRIOS, A. F. Carbon acquisition and accumulation in microalgae Chlamydomonas: Insights from "omics" approaches. **Journal of Proteomics**, v. 94, p. 207–218, dez. 2013.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. **ISRN Ecology**, v. 2011, p. 1–20, 2011.

ZHANG, J. et al. Morphology and phylogenetic position of a trebouxiophycean green alga (Chlorophyta) growing on the rubber tree, Hevea brasiliensis, with the description of a new genus and species. **European Journal of Phycology**, v. 43, n. 2, p. 185–193, maio 2008.

ZUCOLOTO, B.; DRUMOND, V.; MAIA, V. *et al.* Enzymatic potential of heterotrophic bacteria from a neutral copper mine drainage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 846–852, 2016.