

ROTEIRO PARA ELABORAÇÃO DE PROJETO

1. Título

DIVERSIDADE FUNCIONAL E TOLERÂNCIA A METAIS DE COMUNIDADES MICROBIANAS DO SOLO DA REGIÃO DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO -MG

2. Resumo

O Quadrilátero Ferrífero (QF) está localizado na porção centro-sul de Minas Gerais apresenta solo rico em metais e minerais de alto interesse econômico, o que justifica a intensa atividade mineradora na região. As comunidades microbianas em cavidades, principalmente em litologia ferrífera, são pouco conhecidas, e constituem a maior parte da biodiversidade da caverna e desempenham papel fundamental na manutenção do ecossistema cavernícola. O isolamento e a caracterização desta microbiota podem levar a identificação de novas espécies e a obtenção de substâncias de interesse biotecnológico, como substâncias antimicrobianas, quelantes de Fe e microrganismos tolerantes a metais. Neste cenário, o objetivo deste projeto será isolar e prospectar o potencial biotecnológico de bactérias cultiváveis isoladas de solos de cavernas ferríferas quanto a diversidade funcional da comunidade microbiana, bem como avaliar a tolerância aos metais e avaliar a produção de sideróforos dessa comunidade da região do quadrilátero ferrífero. Serão coletadas amostras de solos da camada superficial interna de duas cavernas (JK e Languardia) nas diferentes zonas (fótica, disfótica e afótica). Serão realizados testes de diversidade funcional pela técnica de Biolog EcoPlate, o teste de tolerância aos metais será realizado a partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) dos metais (Cd), (Cr), (Pb), (Fe),(Cu) e (As) e avaliação da produção de sideróforo pelo método CAS. Espera-se isolar e selecionar bactérias que apresentem aplicabilidade biotecnológica, bem como analisar a diversidade funcional microbiana, identificar a tolerância a metais de bactérias isoladas nos solos de cavernas na região do QF. Além disso, essas informações são fundamentais para ampliar o conhecimento sobre o patrimônio genético e da biodiversidade cavernícola do QF e para a elaboração de plano de manejo para a conservação dos recursos naturais espeleológicos ferríferos.

3. Contextualização e Justificativa

O Quadrilátero Ferrífero (QF) localiza-se na porção centro-sudeste do Estado de Minas Gerais, ocupando uma área aproximada de 7.000 km². A designação “Quadrilátero” é função do arranjo geométrico de sua morfoestrutura. O Quadrilátero Ferrífero está situado na região limítrofe do Cráton do São Francisco e Faixa Arauaí, na parte central do estado de Minas Gerais, sendo constituído por três grandes conjuntos de rochas: complexos ígneos-metamórficos de idade arqueana (embasamento), sequências arqueanas greenstone belt (Supergrupo Rio das Velhas), sequências paleo e mesoproterozóicas metassedimentares (supergrupos Minas e Espinhaço). A área de estudo está situada no limite oeste do Quadrilátero Ferrífero (Cassimiro, 2017). Segundo o Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas (CANIE – CECAV/ICMBio (CECAV, 2017) as cavernas no Quadrilátero Ferrífero estão associadas principalmente às formações ferríferas bandadas (itabiritos) e aos depósitos de canga de idade cretácea (Cassimiro, 2017).

A atividade mineralógica, apesar de importante, é sem dúvida uma das atividades que mais causa impacto ao meio ambiente, pois consiste fundamentalmente na extração de substâncias minerais do subsolo, sendo, portanto, a principal responsável pelo lançamento de cargas poluidoras. Na região do QF, por apresentar o maior contingente populacional do estado de Minas Gerais, já que agrega os municípios de Belo Horizonte e cidades próximas, os danos causados ao meio ambiente são ainda mais intensos e dentre as áreas que estão sendo perdidas devido à atividade mineralógica estão as regiões de canga.

Assim, é de suma importância avaliar as condições das cavernas dessa região que são compostas por comunidades subterrâneas únicas de organismos e microclimas, e frequentemente, sustentam densas populações de extremófilos, abrigando assim uma grande diversidade microbiana. No entanto, o seu patrimônio geoambiental e biológico ainda é pouco conhecido, principalmente quando associado às cangas e as formações ferríferas (CARMO, 2010). Apesar da importância e de majoritariamente as cavernas serem colonizadas por microrganismos (BARTON; NORTHUP, 2007), pouco se sabe sobre a sua distribuição, dinâmica populacional e a biogeoquímica da microbiota cavernícola (GERIC et al., 2004; NORTHUP; LAVOIE, 2004).

As bactérias constituem a maior parte da biodiversidade cavernícola e desempenham papel fundamental na manutenção desse ecossistema (ORTIZ et al., 2013), dando suporte para o crescimento de vários outros microrganismos quimio-organotróficos (CAÑVERAS et al, 2001), principalmente por estarem presentes sob ambiente oligotrófico, geralmente sobrevivem modificando sua via metabólica (IVANOVA et al., 2013), ou ainda, por sintrofia que representa um caso especializado de mutualismo, em que dois ou mais microrganismos combinam as suas capacidades metabólicas para catabolizar um determinado substrato, sendo as interações sintróficas obrigatórias ou facultativas (CAVALEIRO; ALVES, 2020).

O conhecimento sobre microrganismos cavernícolas no Brasil e mais especificamente das cavernas ferríferas, a respeito de sua plasticidade metabólica e/ou potencial biotecnológico são escassos. Neste contexto, o objetivo dessa proposta baseia-se na necessidade de estudos aprofundados visando analisar a diversidade funcional das comunidades microbianas das cavidades ferríferas do Quadrilátero Ferrífero, visto que esta UC está incluída como área prioritária de investigação no Plano Estratégico e de Pesquisas e Gestão do Conhecimento do ICMBio, destacando-se a estratégia 1 e 5, para o fornecimento de informações aos tomadores de decisão acerca do valor econômico da biodiversidade, partindo dos estudos multidisciplinares em microbiologia de cavernas, implicando em processos geológicos nas cavidades, e a microbiologia ambiental na identificação de novas espécies microbianas e exploração de novas moléculas biotecnológicas de fontes cavernícolas, a fim de comunicar a origem de produtos oriundos de UC's, para a promoção da expansão e conectividade de áreas protegidas.

Um dos principais objetivos no estudo da microbiota cavernícola é estabelecer uma relação entre taxonomia, distribuição, e suas respectivas funções ecológicas (STEELE; STREIT, 2005), sendo observado comumente diferentes grupos microbianos em solos, que podem ter um importante papel ecológico em ciclos biogeoquímicos de ecossistemas cavernícolas, mediando processos de mineralização (GONZALEZ-PIMENTEL et al., 2018), produzindo compostos bioativos, como antimicrobianos, que permitem o controle biótico em outras populações (RANGSEKAEW; PATHOM-AREE, 2019), além de serem capazes de degradar compostos orgânicos recalcitrantes (SONIA et al., 2011). Apesar da escassez de conhecimento sobre a taxonomia e plasticidade metabólica dos grupos microbianos em ecossistemas cavernícolas, é bem conhecido que estes dão uma contribuição relevante para os ciclos globais de carbono, nitrogênio e enxofre (CAVICCHIOLI, 2011; OFFRE; SPANG; SCHLEPER, 2013).

A caracterização da diversidade metabólica de amostras ambientais utilizando perfis fisiológicos em nível de comunidade por meio do sistema Biolog EcoPlate (Inc., Hayward, CA, EUA), tem sido uma ferramenta analítica promissora para determinar a capacidade de catabolismo de carbono de microrganismos durante o processo de crescimento celular em condições de placa (FEIGL ET AL, 2017), (SALOMO; MÜNCH; RÖSKE, 2009; GRZADZIEL; FURTAK; GALAZKA, 2019), e baseia-se em substratos com compostos de carbono de baixo peso molecular e podem ser realizadas a partir de culturas mistas ou isoladas de microrganismos e de amostras ambientais de solo, água e resíduos (PIERCE; WARD; DOBBS, 2014).

O ambiente cavernícola normalmente é considerado oligotrófico e apresenta características específicas que determinam a microbiota local. A comunidade microbiana presente nesse ambiente está exposta continuamente a condições hostis, sofrendo elevada pressão de seleção ambiental e podem ser uma

fonte potencial para novas descobertas de compostos bioativos com potencial biotecnológico (CHEEPHTAM, 2012; GHOSH; KUISIENE; CHEEPHTAM, 2017).

Considerando o papel essencial dos microrganismos nos ciclos biogeoquímicos e que podem influenciar a especiação e biodisponibilidade de metais, é relevante a pesquisa para obtenção de conhecimento mais abrangente sobre a taxonomia e diversidade da comunidade microbiana em solos com presença de metais (HAYAT et al., 2010; COSTA et al., 2015). Neste contexto, a grande escala e diversidade de metais subterrâneos e o impacto da corrosão desses metais, pode alterar substancialmente a química do solo e as comunidades microbianas (HUANG et al., 2021), sendo assim, necessário a análise do perfil fisiológico da comunidade microbiana, realizado com base na capacidade de usar diferentes fontes de carbono para caracterizar a diversidade microbiana nesses ambientes cavernícolas (FERNANDES et al., 2018).

Além disso, outro fator relevante é a busca por conhecimento quanto a forma pela qual os microrganismos adquirem ferro, normalmente é por meio de pequenas moléculas de baixo peso molecular denominadas de sideróforos, os quais possuem grande afinidade pelo íon. Tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, o ferro é reduzido de Fe^{3+} para Fe^{2+} no citosol e na presença destes sideróforos, que posteriormente são internalizados por meio de complexos contendo receptores e transportadores especializados, até enfim serem liberados no interior célula. Assim, os sideróforos atuam como agentes solubilizantes de ferro inorgânico ou compostos orgânicos em condições limitantes de ferro, disponibilizando este íon tanto para bactérias quanto para plantas (Manhaty et al., 2016).

Neste contexto, a descoberta de novos microrganismos potenciais produtores de sideróforos podem levar à identificação de novos compostos ou aos papéis que os sideróforos têm nas relações microbianas mistas, sendo de suma importância para compreensão das relações ecológicas da comunidade cavernícola. Além de quelar o ferro férrico (Fe^{3+}) do ambiente, os sideróforos podem aumentar o crescimento ou proteger as plantas de patógenos, são reconhecidos e usados por fungos e bactérias, servem no intemperismo mineral do solo e estão envolvidos direta ou indiretamente na biorremediação de poluentes ambientais, incluindo metais pesados e hidrocarbonetos (Ahmed e Holmström, 2014).

Deste modo, propomos aqui um projeto para avaliar e comparar a diversidade funcional da comunidade microbiana pelo método de microplacas Biolog EcoPlate, isolar e selecionar microrganismos que apresentem atividades funcionais com aplicabilidade biotecnológica e avaliar a tolerância aos metais e presença de sideróforos nesses microrganismos isolados dos solos de cavernas ferríferas do QF. Essas informações são fundamentais para ampliar o conhecimento sobre o patrimônio genético e a biodiversidade cavernícola do QF e para a elaboração de plano de manejo para a conservação dos recursos naturais espeleológicos ferríferos.

4. Objetivo

Analisar a diversidade funcional, avaliar a tolerância aos metais e presença de sideróforos nas comunidades microbianas cultiváveis do solo de cavernas ferríferas da região do Quadrilátero Ferrífero -MG.

5. Objetivos específicos

- Avaliar a diversidade metabólica da comunidade microbiana através do perfil fisiológico e funcional utilizando Biolog Ecoplate;
- Realizar o isolamento e prospecção de microrganismos com potencial biotecnológico a partir do solo de cavernas do QF;
- Avaliar a tolerância aos metais pelos microrganismos isolados dos solos de cavernas ferríferas;

- Realizar a determinação de metais visando avaliação da disponibilidade de elementos tóxicos e/ou de interesse comercial;
 - Avaliar a produção de sideróforos pelos microrganismos isolados dos solos das cavernas ferríferas;
- Construção do inventário e estabelecer uma coleção de culturas de linhagens microbianas em ágar estoque e criopreservada (-80 °C) das cavernas ferríferas do QF, com objetivo de promover a conservação do patrimônio microbiano espeleológico e da sua biodiversidade.

6. Metodologia

Local de estudo: As cavernas MS (607.550 m E / 7.763.020 m S, e altitude 1.373 metros) e JK (607.592 m E / 7.762.935 m S, e altitude e 1.371 metros) encontram-se na região de Itabirito, localizada no município de Nova Lima, MG. A coleta ocorrerá sob a licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) após a aprovação do projeto. Além disso, o pesquisador proponente irá solicitar licença junto ao SISGEN para acesso ao patrimônio genético e será encaminhada ao CECAV/ICMBio.

Amostragem: As coletas das amostras serão na estação seca e chuvosa, na camada superficial da caverna, nos primeiros 10 cm. A caverna será classificada em zonas, de acordo com Trajano e Bichuette (2006) quando possível, coletando-se de 100 a 500 g de solo em cada zona afótica, penumbra e entrada, totalizando 3 pontos de amostragem. As amostras serão acondicionadas em sacos plásticos estéreis (ziplock), com o auxílio da pá de jardinagem estéril, sendo limpa a cada coleta com álcool 70%, identificadas e armazenadas em caixa térmica a 4°C para o transporte.

Isolamento microbiano: As amostras de solo serão peneiradas, homogeneizadas e retiradas subamostras (10 g) e enriquecidas em frascos de vidro de 500 mL contendo 90 mL de meio salino mineral (MSM), com 0,81g de NaCl em 90 mL de água destilada. As amostras serão incubadas em agitador orbital (150 rpm) a 30°C, por 24 horas. Após esse período, será realizada diluições seriadas de 10⁻² a 10⁻⁵, sendo retirada alíquotas de 100 µL das diluições e semeadas na superfície do meio Luria Bertani (LB), com o auxílio da alça de Drigalski. As placas serão incubadas a 30°C no período de 24 a 72 h. As linhagens microbianas serão conservadas em meio Ágar Estoque e a -80oC.

Análise Diversidade Funcional: A determinação do perfil metabólico da comunidade microbiana dos solos das cavernas, será avaliado usando Biolog Ecoplate (Biolog EcoPlate™ Inc., Hayward, CA, EUA) contendo 31 fontes de carbono sendo os substratos polímeros, carboidratos, ácido carboxílico, aminoácidos, amina/amida e fenólico. As amostras serão padronizadas de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland em solução tampão fosfato esterilizado (PBS), e será retirado 100 µl do inóculo em suspensão em cada poço de uma microplaca Biolog e incubado a 30oC por 7 dias. Uma suspensão de cultura pura de Escherichia coli (ATCC 25922) será usada como controle positivo, enquanto Água Milli-Q será usada como controle negativo, nos poços da microplaca correspondentes (KONER et al., 2021).

Determinação e tolerância aos metais: As amostras de solos serão digeridas por meio de procedimentos de abertura/digestão ácida com pesagem de 1g de solo seco e com granulometria padronizada em tubo de vidro para bloco digestor e, posteriormente adição de uma mistura de ácido nítrico e ácido percórico na proporção 2:1 (v/v). Os tubos com as amostras serão levados ao bloco digestor e aumentando gradativamente a temperatura até 1600 oC por 40 minutos. Após este período, será elevado a temperatura até 2100°C por aproximadamente 20 minutos. Posteriormente será esfriado e filtrado em papel qualitativo e transferido para balões de 50mL completando o volume para realizar as determinações de metais por técnicas de Espectrometria de Absorção Atômica com atomização por chama (FAAS). Serão analisados os metais pesados ou de relevância ambiental: Cd, Pb, Cr e os de relevância comercial: Al, Fe, Cu, Zn e Mn (AOAC, 2012).

O teste de tolerância aos metais pesados será realizado a partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM). A CIM será realizada em placa de 96 poços para cultivo de células de acordo com Wiegand et al. (2008) com modificações. Os isolados serão inoculados em 90 µL de caldo Triptona de Soja (TSB), e posteriormente será aplicado 100 µL da solução mãe contendo 2.000 mg/L dos sais metálicos, usando a técnica de diluição seriada, nas concentrações de 1.9 a 1000 mg/L. O inóculo de 10 µL da suspensão bacteriana será aplicado em cada poço, ajustado a partir da escala 0,5 de Mc Farland. O controle negativo será realizado somente com TSB, TSB e solução de metal e apenas solução de metal, para controle positivo será utilizada TSB e suspensão bacteriana. A placa será incubada a 30°C por 24h. Após o período de incubação, a leitura será realizada pelo desenvolvimento celular que será mensurado em DO600nm leitor de microplaca (Epoch™ - BioTek) (GRZADZIEL; GALAZKA, 2018).

A CBM será realizada a partir dos resultados preliminares da inibição do crescimento no ensaio de CIM, sendo retirada 2 µL de cada poço que não apresentou crescimento bacteriano no teste de CIM, e inoculado em meio TSA em placa de Petri. A placa será incubada na estufa a 30°C por 24 horas para avaliação de crescimento das colônias bacterianas.

Detecção de sideróforo em solução pelo método do CAS: Serão adicionados 6 mL de HDTMA 10 mM em balão volumétrico de 100 ml e diluído com água. Uma mistura de 1,5 ml de ferro(III) (1 mM FeCl₃ em HCl 10 mM) e 7,5 ml de solução de CAS (2 mM). Piperazina anidra 4,307 g será dissolvida em água e 6,25 ml de HCl 12 M.. Esta solução (pH 5,6) será adicionada ao balão volumétrico até completar os 100 ml. Esta solução foi estocada em ausência de luz. Uma alíquota de 0,5 ml da solução de sideróforo ou sobrenadante de cada cultura será misturada com 0,5 ml da solução de CAS (A). Um branco (Aref) será preparado usando exatamente os mesmos componentes, menos o sideróforo (p.e. o meio não inoculado usado para a cultura das bactérias). Após atingir o equilíbrio, a absorbância será a 630 nm. O cálculo da produção de sideróforo será da seguinte maneira: $A/Aref$ (A = absorbância da amostra, Aref = absorbância do branco).

Análise estatística: A capacidade dos microrganismos de utilizar diferentes fontes de carbono em comunidades microbianas será medida pelo desenvolvimento médio de cor do poço (AWCD) (GARLAND; MILLS, 1991), onde as leituras serão realizadas no tempo zero (T0), após 12 horas de incubação, e a cada 24 horas por 7 dias consecutivos, até obtenção de uma AWCD de 0,8–1,0 unidade de absorbância para cada placa.

Para ampliar a uniformidade para caracterizar os níveis de padrões e utilização de microrganismos por fonte de carbono e metais (KEYLOCK, 2005; STRONG, 2016), será utilizado o índice de diversidade de Shannon-Wiener (H'), afim de representar a razão do valor de absorbância de cada poço para os valores de absorbância total de todos os poços (KEYLOCK, 2005; SPELLERBERG, 2008). O índice de uniformidade de Shannon (E), será utilizado para representar o número total de fontes de carbono e metais consumidos, e do número de poços que ocorreu variação de coloração (KEYLOCK, 2005), já o índice de diversidade de Simpson (D), será empregado para refletir a diversidade funcional metabólica das comunidades microbianas (GE et al., 2018).

Para estimar a distância entre as linhagens de acordo com os perfis metabólicos e sensibilidade aos metais, será aplicado a análise de agrupamentos (Clustering Dendogram), para isso, serão utilizados os resultados do NMDS e ANOSIM que apresentarão efeitos significativos ($p < 0,05$ e $R^2 > 0,60$). A análise dos clusters se dará por ANOVA, onde a matriz de distância entre os clusters será medida usando o método de Ward (ANGEL et al.; 2010).

Os experimentos serão realizados em triplicata e os resultados serão expressos como média \pm desvio padrão. Todas as análises serão realizadas no software R Core Team utilizando o pacote “Vegan”, para o NMDS será utilizado a função “metaMDS” e para o cluster “hcluster”.

Coleção de culturas de microrganismos cavernícolas: Todos os isolados microbianos serão caracterizados quanto a sua morfologia e coloração de Gram e, em seguida, registrados, catalogados e armazenados em ágar estoque e criopreservados a -80°C.

8. Resultados a serem alcançados

1. Caracterizar o perfil fisiológico e funcional da comunidade microbiana em relação a utilização de 31 fontes de carbonos utilizando Biolog Ecoplate;
2. Identificar a tolerância aos metais dos microrganismos isolados dos solos de cavernas ferríferas;
3. Avaliar os sideróforos presentes nos microrganismos isolados das cavernas ferríferas;
4. Prospectar os microrganismos com diferentes potenciais biotecnológicos a partir do solo de cavernas do QF;
5. Estabelecer a primeira coleção de culturas de linhagens microbianas em ágar estoque e criopreservada (-80 °C) das cavernas ferríferas do QF com objetivo de promover a conservação do patrimônio microbiano espeleológico e da sua biodiversidade.

9. Produtos

1. Documento com fotografias de campo e laboratoriais constando as indicações dos padrões de degradação das fontes de carbono e de tolerância de metais;
2. Caracterização do perfil fisiológico e funcional da comunidade microbiana de cavidades ferríferas em métodos dependentes de cultura;
3. Escalonamento da diversidade de metais subterrâneos e o impacto da corrosão do metal na química do solo e das comunidades microbianas;
4. Identificação de microrganismos com a presença de sideróforos e análise do potencial biotecnológico para biorremediação de metais
5. Criação de um catálogo descritivo das linhagens microbianas isoladas relacionado ao perfil biotecnológico e sua aplicação em processos biológicos que apresentam menor impacto ambiental.

10. Cronograma de execução

Tabela contendo a Ação/Atividade e o período de execução mensal, bimestral, trimestral ou semestral.

1. ATIVIDADES	2. CRONOGRAMA (TRIMESTRAL)							
	2022/2023				2023/2024			
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º
Expedição de campo	X			X				
Coleta de solo/amostras	X			X				
Análise diversidade funcional		X	X	X	X	X	X	
Determinação e tolerancia a metais			X	X	X	X	X	
Identificação de sideróforos			X	X	X	X	X	

Estabelecer coleção de culturas		X	X	X	X	X		X
Tabulação e apresentação de dados parciais		X		X		X		
Relatório técnico parcial		X		X		X		
Relatorio financeiro parcial	X	X	X	X	X	X	X	
Divulgação de resultados parciais				X				
Tabulação e apresentação dos dados finais							X	X
Relatório técnico final								X
Relatório financeiro final								X

13. Equipe

3. Nome Função Instituição Formação

Acadêmica Lattes

Fabiana Gisele da Silva Pinto Coordenadora geral e responsável técnica do projeto Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI) -UNIOESTE doutor <http://lattes.cnpq.br/9361463429150328>

Affonso Celso Gonçalves Junior Colaborador nas análises de metais Laboratório de Química Aplicada e Ambiental-UNIOESTE doutor <http://lattes.cnpq.br/0274178372961922>

Brenda Almeida Lima Pesquisa e desenvolvimento e coleta de dados em campo Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI) -UNIOESTE Mestranda em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – UNIOESTE <http://lattes.cnpq.br/1333678230103833>

José Augusto Pires Bitencourt Colaborador nas análises de diversidade metabarconding Instituto Tecnológico Vale – ITV doutor <http://lattes.cnpq.br/1330312158604944>

14. Planejamento Financeiro

DIÁRIA	Quant.	Valor Unitário	Valor Total	Memória de cálculo
Diárias de Campo	10	R\$ 177,00	R\$ 1.770,00	R\$ 1.770,00
Hospedagem	10	RS 200,00	R\$ 2.000,00	R\$ 2.000,00
TOTAL				R\$3.770,00

Viagem	Quant.	Valor Unitário	Valor Total	Memória de cálculo
Passagem Aérea	4	R\$ 1.200,00	R\$ 4.800,00	R\$ 4.800,00
Combustível (240 L/ viagem x 2 campos)	2 (480 L)	R\$ 7,00 por Litro	R\$ 3.360,00	R\$ 3.360,00
Locação veículo 4X4 (1 veículo/viagem x 2 viagens – 3 diárias)	2	R\$ 800,00/ diária	R\$ 4.800,00	R\$ 3.600,00
TOTAL				R\$ 11.680,00

Bolsa de Formação Acadêmica	Quant.	Valor Unitário	Valor Total	Memória de cálculo
Apoio Técnico	1	R\$ 2.000,00/mês x 24 meses	R\$ 48.000,0	R\$ 48.000,00

TOTAL				R\$ 48.000,00
-------	--	--	--	---------------

Material de consumo	Quant.	Valor Unitário	Valor Total	Memória de cálculo
Placas Biolog Ecoplate (para diversidade funcional)	20	R\$ 300,00	R\$ 6.000,00	R\$ 6.000,00
Reagentes em geral, meios de cultura e consumíveis (diversidade funcional e manutenção microrganismos na coleção)	1	R\$ 10.000,00	R\$ 10.000,00	R\$ 10.000,00
Padrões de metais certificados e reagentes (para análise de metais)	1	R\$ 5.000,00	R\$ 5.000,00	R\$ 10.000,00
TOTAL				R\$ 26.000,00
Material permanente	Quant.	Valor Unitário	Valor Total	Memória de cálculo
Leitor de microplacas - Espectrofotômetro UV-visível com capacidade para leitura de microplacas de 0 a 999 nm (Para quantificação da diversidade funcional)	1	R\$ 100.000,00	R\$ 100.000,00	R\$ 100.000,00
Kit com 5 micropipetadores monocanal (análises de metais/sideróforos/funcionais)	1	R\$ 6.000,00	R\$ 6.000,00	R\$ 6.000,00
TOTAL				R\$ 106.000,00
TOTAL GERAL DO PROJETO				R\$195.450,00

14. Referências

ANGEL, Roey et al. Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient. The ISME Journal, v. 4, n. 4, p. 553-563, 2010.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists. 19. ed. Maryland: AOAC, 2012.

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

BARTON, Hazel A. et al. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. Journal of Cave and Karst Studies, v. 69, n. 1, p. 163-178, 2007.

C. CAÑVERAS, S. et al. Microorganisms and microbially induced fabrics in cave walls. Geomicrobiology Journal, v. 18, n. 3, p. 223-240, 2001.

CAPORASO, J. Gregory et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Methods, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.

CARMO, F.F. Importância Ambiental e Estado de Conservação dos Ecossistemas de Cangas no Quadrilátero Ferrífero e Proposta de Áreas-alvo para a Investigação e Proteção da Biodiversidade em Minas Gerais. 2010.

- 90p. Dissertação (Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- CASSIMIRO, J. R. (2017). Avaliação do potencial espeleológico e do estado de conservação das cavidades naturais subterrâneas no entorno da Rede de Distribuição de Gás Natural – RDGN Linha Tronco MBR (Mineração Brasileira Reunidas), Vargem Grande, Município de Nova Lima, 167p.
- CAVALEIRO, Ana Júlia; ALVES, Madalena M. Digestão anaeróbia. *Revista de Ciência Elementar*, v. 8, n. 1, 2020.
- CAVICCHIOLI, Ricardo. Archaea—timeline of the third domain. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 51-61, 2011.
- CLARKE, K.R. and GORLEY, R.N., 2015, PRIMER v7: User Manual/Tutorial. PRIMER-E, Plymouth. (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research), 3 Meadow View, Lutton, Ivybridge, Devon PL21 9RH, United Kingdom. 214 p.
- COSTA, Patrícia S. et al. Metagenome of a microbial community inhabiting a metal-rich tropical stream sediment. *PLoS One*, v. 10, n. 3, p. e0119465, 2015.
- FERNANDES, Camila Cesário et al. Bacterial communities in mining soils and surrounding areas under regeneration process in a former ore mine. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, p. 489-502, 2018.
- GARLAND, Jay L.; MILLS, Aaron L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 8, p. 2351-2359, 1991.
- GERIČ, Barbara; PIPAN, Tanja; MULEC, Janez. Diversity of culturable bacteria and meiofauna in the epikarst of Škocjanske jame caves (Slovenia). *Acta Carsologica*, v. 33, n. 1, 2004.
- GHOSH, Soumya; KUISIENE, Nomedá; CHEEPHAM, Naowarat. The cave microbiome as a source for drug discovery: reality or pipe dream?. *Biochemical Pharmacology*, v. 134, p. 18-34, 2017.
- GONZALEZ-PIMENTEL, Jose L. et al. Yellow coloured mats from lava tubes of La Palma (Canary Islands, Spain) are dominated by metabolically active Actinobacteria. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.
- GRZADZIEL, Jarosław; GALAZKA, Anna. O experimento de longo prazo com microplaquetas revela uma forte influência do tipo de solo na composição das bactérias e sua diversidade funcional. *Applied Soil Ecology*, v. 124, p. 117-123, 2018.
- HAYAT, Rifat et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of microbiology*, v. 60, n. 4, p. 579-598, 2010.
- HEBERLE, H., MEIRELLES, G.V., DA SILVA, F.R., Telles, G.P., MINGHIM, R., 2015, InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*, v. 16, p. 169.
- HUANG, Ye et al. Responses of soil microbiome to steel corrosion. *npj Biofilms and Microbiomes*, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2021.
- IVANOVA, Violina et al. High phylogenetic diversity of bacteria in the area of prehistoric paintings in Magura Cave, Bulgaria. *Journal of Cave and Karst Studies*, v. 75, n. 3, p. 218, 2013.
- JACOBI, Claudia M. et al. Iron geosystems: priority areas for conservation in Brazil. *Mining in Ecologically Sensitive Landscapes*, p. 55-78, 2015.
- KEYLOCK, C. J. Simpson diversity and the Shannon–Wiener index as special cases of a generalized entropy. *Oikos*, v. 109, n. 1, p. 203-207, 2005.

- KONER, Suproakash et al. Assessment of Carbon Substrate Catabolism Pattern and Functional Metabolic Pathway for Microbiota of Limestone Caves. *Microorganisms*. 2021.
- MAHANTY, T.; BHATTACHARJEE, S.; GOSWAMI, M.; BHATTACHARYYA, P.; DAS, B.; GHOSH, A. et al. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* v. 24, p. 3315–3335. 2017.
- MONTEIRO, Hevelyn S. et al. (U–Th)/He geochronology of goethite and the origin and evolution of cangas. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 131, p. 267-289, 2014.
- NORTHUP, D.E; LAVOIE K.H. Microbiology in caves. pp. 506-509. In: Gunn, John (ed.) *Encyclopedia of Cave and Karst Science*. New York: Fitzroy Dearborn Publishers, 2004.
- OFFRE, Pierre; SPANG, Anja; SCHLEPER, Christa. Archaea in biogeochemical cycles. *Annual Review of Microbiology*, v. 67, p. 437-457, 2013.
- PAUN, Victoria I. et al. First report on antibiotic resistance and antimicrobial activity of bacterial isolates from 13,000-year old cave ice core. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2021.
- QUAST, Christian et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012.
- RANGSEEKAEW, Pharada; PATHOM-AREE, Wasu. Cave actinobacteria as producers of bioactive metabolites. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 387, 2019.
- RIQUELME, Cristina et al. Biotechnological potential of Actinobacteria from Canadian and Azorean volcanic caves. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 101, n. 2, p. 843-857, 2017.
- SHUSTER, David L. et al. Cosmogenic ^3He in hematite and goethite from Brazilian “canga” duricrust demonstrates the extreme stability of these surfaces. *Earth and Planetary Science Letters*, v. 329, p. 41-50, 2012.
- SHUSTER, David L. et al. Weathering geochronology by (U-Th)/He dating of goethite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 69, n. 3, p. 659-673, 2005.
- SONIA, Mokni-Tlili et al. Studies on the ecology of actinomycetes in an agricultural soil amended with organic residues: II. Assessment of enzymatic activities of Actinomycetales isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 10, p. 2251-2259, 2011.
- SPELLERBERG, I. F. Shannon–Wiener index. *Encyclopedia of Ecology*. 3249–3252. 2008.
- STEELE, Helen L.; STREIT, Wolfgang R. Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. *FEMS Microbiology Letters*, v. 247, n. 2, p. 105-111, 2005.
- STRONG, W. L. Biased richness and evenness relationships within Shannon–Wiener index values. *Ecological indicators*, v. 67, p. 703-713, 2016.
- THOMPSON, Brandon et al. Metabarcoding comparison of prokaryotic microbiomes from appalachian karst caves to surface soils in southwest Virginia, USA. *Journal of Cave & Karst Studies*, v. 81, n. 4, 2019.
- TRAJANO, Eleonora, *Biologia subterrânea: introdução* / Eleonora Trajano, Mana Elina Bichuette. - São Paulo; Redespeleo, 2006.
- WIEGAND, Irith; HILPERT, Kai; HANCOCK, Robert EW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, v. 3, n. 2, p. 163-175, 2008.

WOOLEY, John C.; GODZIK, Adam; FRIEDBERG, Iddo. A primer on metagenomics. *PLoS Computational Biology*, v. 6, n. 2, p. e1000667, 2010.