

NAILAH LATIF AHMED

**O MICROBIOMA DE ÁREAS DE RECUO DE GELEIRAS NA
ILHA REI GEORGE, ANTÁRTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2022

NAILAH LATIF AHMED

**O MICROBIOMA DE ÁREAS DE RECUO DE GELEIRAS NA
ILHA REI GEORGE, ANTÁRTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Vivian Helena Pellizari

Versão original

São Paulo

2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Ahmed, Nailah Latif

O microbioma de áreas de recuo de geleiras na
Ilha Rei George, Antártica / Nailah Latif Ahmed;
orientadora Vivian Helena Pellizari. -- São Paulo,
2022.

131 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Microbioma. 2. Antártica. 3. Metagenômica. 4.
Mudanças climáticas. I. Pellizari, Vivian Helena,
orientador. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Candidato(a): Nailah Latif Ahmed

Título da Dissertação: O microbioma de áreas de recuo de geleiras na Ilha Rei George, Antártica

Orientador(a): Prof.(a) Dr(a) Vivian Helena Pellizari

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, em sessão pública realizada a /...../....., considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Maimuna Ayoob Punkhi e Abdul Latif Ahmed, que sempre incentivaram a leitura e o estudo, mas nunca imaginaram que o estudo seria tanto a ponto de realizar um pós-graduação. Sua coragem para criar uma vida nova do zero e me criar em um país do outro lado do mundo me inspira até hoje.

Agradeço à Allah, que me guia e sabe o melhor para mim.

Agradeço às agências de fomento CAPES, pela bolsa de estudo, e CNPq, pelo apoio ao projeto “A Vida Microbiana na Criosfera Antártica: Mudanças Climáticas e Bioprospecção (MICROSFERA)”.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço à Profa. Vivian Helena Pellizari, pela orientação e pelos conhecimentos científicos e didáticos.

Agradeço à Dr. Amanda Gonçalves Bendia, que durante muito tempo foi minha inspiração na busca por uma carreira como pesquisadora. Obrigada por me iniciar na Bioinformática e me acompanhar bem de pertinho durante esses anos.

Agradeço ao Prof. Rubens Tadeu Delgado Duarte por oferecer o material em que foi baseado essa dissertação e por todas as ideias que aperfeiçoaram o trabalho.

Agradeço à Universidade Federal do Rio de Janeiro, minha primeira casa, onde me formei Professora de Ciências e Biologia. Agradeço aos amigos que fiz durante a graduação, em especial Luísa Marins, Theo Ribeiro, Luís Felipe Correa, Larrisa Constant e Ligia Massa; e à BioSemana UFRJ, que me ensinou organização, paciência e me trouxe experiências maravilhosas mesmo passando 15h por dia na Ilha do Fundão.

Agradeço à Universidade de São Paulo pelo acolhimento e pela educação de qualidade.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana (IO-USP) pelas conversas, risadas, apoio e companhia no bandeirão.

Agradeço a Fernando Rossi e Fernanda Jamel, por serem ótimos amigos, seja para um jantar no final de semana ou ficar até meia-noite trabalhando com bioinformática.

Agradeço aos amigos da vida, em especial Julia Noia e João Veras, que ouvem meus desabaços e riem das minhas piadas. Mesmo meses sem nos vermos, nossa amizade RJ-SP não se abala.

Agradeço à Thales Moreira de Lima, que adentrou no mundo acadêmico ao meu lado. Obrigada por todos os anos de apoio e cumplicidade, tenho certeza que minha vida seria muito diferente e muito sem graça sem sua companhia e sua sabedoria.

Por fim, agradeço à todos os professores que me formaram, desde o Jardim até a Pós-Graduação. Nada disso seria possível sem seu conhecimento, paciência e afeto. Carrego um pouco de cada um de vocês em mim, vocês são indispensáveis.

Muito obrigada

*“A verdade é a filha do tempo e não da autoridade,
mas a dúvida é o começo da sabedoria”*

Galileu Galilei

RESUMO

AHMED, N.L. O microbioma de áreas de recuo de geleiras na Ilha Rei George, Antártica. 2022. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

As regiões polares são as que mais sofreram com o aumento da temperatura média global, cerca de 2,5°C desde os anos 1950, devido às atividades antrópicas. Uma consequência é o derretimento de geleiras, que expõe um solo com gradiente de fatores físicos, químicos e biológico e que é um modelo de estudo de sucessão ecológica microbiana. Este trabalho tem como objetivo compreender a comunidade microbiana da cronossequência das geleiras Collins (aprox. 3500 anos de retração) e Baranowski (aprox. 40 anos de retração), na Ilha Rei George, Antártica. Os métodos do estudo são baseados na metagenômica, técnica utilizada para determinar o DNA total de uma amostra ambiental. Utilizando ferramentas de bioinformática, é possível investigar a diversidade, taxonomia e os perfis funcionais da comunidade. Os resultados das análises de taxonomia de *reads* e diversidade mostram padrões de sucessão ecológica diferentes para as geleiras. Na geleira Collins, as comunidades microbianas são mais homogêneas, enquanto que a geleira Baranowski mostra mudanças na estrutura microbiana ao longo do transecto. A estratégia de reconstrução de MAGs permitiu estudar genomas específicos de cada geleira. Com as amostras da geleira Baranowski, foram reconstruídos mais genomas e de mais táxons bacterianos do que com as da geleira Collins. Para a anotação funcional, foram selecionados os MAGs de maior qualidade, organismos heterotróficos e aeróbios cujo metabolismo de carbono e nitrogênio permite a manutenção da comunidade local; genes de resistência são elementos importantes para sobrevivência; e genes de degradação revelam potenciais biotecnológicos. Nas análises de pangenoma, genes exclusivos dos MAGs explorados estavam relacionados a produção de biofilme, transferência horizontal e resistência a drogas e a estresses ambientais. Por fim, novos trabalhos podem ser iniciados utilizando outras técnicas, como transcriptômica e proteômica, para desvendar a comunidade microbiana do solo antártico no contexto das mudanças climáticas.

Palavras-chave: Microbioma. Antártica. Metagenômica. Mudanças climáticas.

ABSTRACT

AHMED, N.L. The microbiome of glacier retreat areas in King George Island, Antarctica. 2022. Thesis (Master in Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The polar regions are the ones that have suffered the most with the average global temperature increase, about 2.5°C since the 1950s, due to anthropic activities. A consequence is melting glaciers, which expose soil with gradient of physical, chemical and biological factors and is a microbial ecological succession study model. This study has the aim to comprehend the microbial community of the Collins (aprox. 3500 years of retraction) and Baranowski (aprox. 40 years of retraction) glaciers' chronosequence, in King George Island, Antarctica. The study methods are based on metagenomics, a technique used to determine the total DNA from an environmental sample. With bioinformatic tools, it is possible to investigate the community's diversity, taxonomy and functional profiles. The results of reads' taxonomy and diversity analyses show different ecological succession patterns for the glaciers. For Collins glacier, the microbial communities are homogeneous, whereas Baranowski glacier shows changes in the microbial structure along the transect. The MAGs reconstruction strategy allowed to study specific genomes from each glacier. With the Baranowski glacier's samples, more MAGs were reconstructed and from more bacterial taxa than with Collins glacier's samples. For functional annotation, high quality MAGs were selected, heterotrophic and aerobic organisms whose carbon and nitrogen metabolism enables local community maintenance; resistance genes are important elements for survival; and degradation genes reveal biotechnological potentials. In the pangenome analyses, exclusive genes from the explored MAGs were related to biofilm production, horizontal transfer, drugs and environmental stress' resistance. Finally, new studies can use other techniques, such as transcriptomics and proteomics, to unravel the microbial community of antarctic soil in the context of climate change.

Keywords: Microbiome. Antarctica. Metagenomics. Climate change.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pipeline simplificado para obtenção de MAGs a partir do metagenoma de uma amostra ambiental.....	35
Figura 2. Representação simplificada da cronossequência da geleira Baranowski segundo Duarte (2010).	39
Figura 3. Mapa da Ilha Rei George demarcando as geleiras Collins e Baranowski e a localização aproximada da coleta das amostras utilizadas neste estudo.....	42
Figura 4. Imagens das geleiras cujas amostras foram utilizadas neste estudo. a. Geleira Collins. b. Baranowski.....	44
Figura 5. Mapa dos pontos de amostragem no solo de recuo de geleiras em a. geleira Collins e b. geleira Baranowski. Os pontos C0 e C3 estão muito próximos para serem distinguíveis no mapa, assim como B0 e B1.....	45
Figura 6. Classificação taxonômica dos <i>reads</i> metagenômicos a nível de filo das amostras a. da geleira Collins e b. da geleira Baranowski.	58
Figura 7. Classificação taxonômica dos <i>reads</i> metagenômicos a nível de classe das amostras a. da geleira Collins e b. da geleira Baranowski.	59
Figura 8. Classificação taxonômica dos <i>reads</i> metagenômicos a nível de ordem das amostras a. da geleira Collins e b. da geleira Baranowski.	60
Figura 9. Classificação taxonômica dos <i>reads</i> metagenômicos a nível de família das amostras a. da geleira Collins e b. da geleira Baranowski.	61
Figura 10. Curva de rarefação para as amostras das geleiras Collins e Baranowski. O eixo X explicita a quantidade de espécies e, o eixo Y, o tamanho da amostra.	62
Figura 11. Visualização em gráfico dos valores de alfa diversidade (Shannon, Simpson, <i>Richness</i> e <i>Pielou's Evenness</i>).	64
Figura 12. Gráfico do teste ANOVA realizado para comparação de alfa diversidade (índices de Shannon e Simpson) entre as geleiras. As diferenças entre as geleiras não são significativas.	65
Figura 13. nMDS com as distâncias das amostras calculadas pelo índice Bray-Curtis e as variáveis ambientais analisadas. O stress foi avaliado em 0.06532934, que equivale a uma distorção baixa, ou seja, os dados multidimensionais em um gráfico com dimensões reduzidas são bem representados (CLARKE, 1993). Essas variáveis ambientais, no entanto, não são significativas estatisticamente.	66
Figura 14. Gráfico de barras da classificação taxonômica via GTDB-tk dos MAGs reconstruídos na abordagem co-assembly por geleira. a. Taxonomia dos 16 MAGs reconstruídos com as amostras da geleira Collins. b. Taxonomia dos 42 MAGs reconstruídos com as amostras da geleira Baranowski.	72
Figura 15. Mapa de calor do recrutamento de reads dos MAGs reconstruídos na abordagem co-assembly por geleira. a. Geleira Collins. b. Geleira Baranowski.	74
Figura 16. Presença de genes das vias do ácido cítrico, respiração aeróbia, fixação de carbono, lactose/galactose e amido/sacarose nos MAGs selecionados. Presença e ausência foram contabilizados a partir dos resultados das análises dos softwares DRAM, Rast Server, Patric e GhostKoala.	77

Figura 17. Presença de genes das vias de redução de nitrato, nitrificação, denitrificação e outros genes relacionados ao ciclo do nitrogênio nos MAGs selecionados. Presença e ausência foram contabilizados a partir dos resultados das análises dos softwares DRAM, Rast Server, Patric, FAMA e GhostKoala.....	78
Figura 18. Presença de genes das vias de redução de sulfato, metabolismo de cisteína/metionina e sulfotransferase nos MAGs selecionados. Presença e ausência foram contabilizados a partir dos resultados das análises dos softwares DRAM, Rast Server, Patric e GhostKoala.	78
Figura 19. Presença de genes de reparo de DNA, resposta à estresse, resistência a antibióticos, choque térmico e transferência horizontal de genes nos MAGs selecionados. Presença e ausência foram contabilizados a partir dos resultados das análises dos softwares DRAM, Rast Server, Patric e GhostKoala.	79
Figura 20. Presença de genes de degradação de glicídeos e compostos aromáticos nos MAGs selecionados. Presença e ausência foram contabilizados a partir dos resultados das análises dos softwares DRAM, Rast Server, Patric e GhostKoala. ..	79
Figura 21. Gráfico de barras da classificação taxonômica via GTDB-tk dos MAGs reconstruídos na abordagem co-assembly.	93
Figura 22. Mapa de calor do recrutamento de reads dos MAGs reconstruídos na abordagem co-assembly.....	94
Figura 23. Gráfico de barras da classificação taxonômica via GTDB-tk dos MAGs reconstruídos na abordagem <i>assembly</i>	99
Figura 24. Árvore filogenética com os gêneros <i>Rhodococcus</i> e <i>Nocardia</i> , explicitando a íntima relação do BAR_MAG_00002 e <i>Rhodococcus erythropolis</i> . Os genomas grifados em amarelo são os genomas adicionados para a análise.	101
Figura 25. Árvore filogenética com os gêneros de Thaumarchaeota e Euryarchaeota, confirmando a proximidade do MAG e dos genomas de Nitrososphaera. Os genomas grifados em amarelo são os genomas adicionados para a análise.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista das amostras e caracterização dos locais de amostragem.	46
Tabela 2. Dados do sequenciamento das amostras utilizadas no estudo, compreendendo o número total de pares de base e a quantidade de reads.	46
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos das amostras de solo da Geleira Collins.	47
Tabela 4. Parâmetros físico-químicos das amostras de solo da Geleira Baranowski.	48
Tabela 5. Valores dos parâmetros de alfa diversidade (Shannon, Simpson, Richness e Pielou's Evenness).	63
Tabela 6. Valores para o índice de dissimilaridade Bray-Curtis.	66
Tabela 7. Classificação taxonômica (até nível de gênero) pelo GTDB-Tk e qualidade (completude e contaminação) pelo CheckM dos MAGs reconstruídos a partir das amostras de solo do recuo da geleira Collins.	68
Tabela 8. Classificação taxonômica (até nível de gênero) pelo GTDB-Tk e qualidade (completude e contaminação) pelo CheckM dos MAGs reconstruídos a partir das amostras de solo do recuo da geleira Baranowski.	69
Tabela 9. MAGs selecionados para análise funcional e suas classificações taxonômicas de acordo com GTDB-Tk.	75
Tabela 10. Classificação taxonômica (até nível de gênero) pelo GTDB-Tk e qualidade (completude e redundância) pelo CheckM dos MAGs da abordagem co-assembly.	90
Tabela 11. Classificação taxonômica (até nível de gênero) pelo GTDB-tk e qualidade (completude e redundância) pelo CheckM dos MAGs da abordagem assembly.	96
Tabela 12. Valores de ANI, AAI e DDH para evidenciar as relações filogenéticas entre os MAGs e os genomas de banco de dados.	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UV – Ultravioleta

IPCC – Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (do inglês “*Intergovernmental Panel for Climate Change*”)

DNA – ácido desoxirribonucleico

NGS – Sequenciamento de nova geração (do inglês “*new generation sequencing*”)

RNAr – ácido ribonucleico ribossomal

TGS – Sequenciamento de terceira geração (do inglês “*third generation sequencing*”)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês “*polymerase chain reaction*”)

WGS – Do inglês “*whole genome shotgun*”

MAG – Do inglês “*metagenome-assembled genomes*”

USP – Universidade de São Paulo

LEMEX – Laboratório de Ecologia Molecular e Extremófilos

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

M.O. – Material orgânico

OTU - Unidades taxonômicas operacionais (do inglês “*operational taxonomic unit*”)

nMDS – Escalonamento multidimensional não métrico (do inglês “*non-metric multidimensional scaling*”)

ANOVA – Análise de Variância

AOA – Arqueia oxidadora de amônia (do inglês “*ammonia-oxidizing archaea*”)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. Geral.....	25
2.2. Específicos	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1. O ambiente antártico.....	26
3.2. Mudanças climáticas	27
3.3. Metagenômica e reconstrução de genomas microbianos.....	30
3.3.1. <i>Diversidade microbiana e influência dos fatores ambientais</i>	<i>32</i>
3.3.2. <i>Reconstrução de genomas microbianos.....</i>	<i>34</i>
3.4. Geleiras antárticas e sua diversidade microbiana	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1. Local de estudo.....	42
4.2. Amostragem	43
4.3. Análises físico-químicas	47
4.4. Bioinformática	48
4.4.1. <i>Anotação taxonômica dos reads.....</i>	<i>48</i>
4.4.2. <i>Diversidade microbiana</i>	<i>48</i>
4.4.2.1. <i>Análise multivariada</i>	<i>49</i>
4.4.3. <i>Reconstrução de MAGs.....</i>	<i>49</i>
4.4.3.1. <i>Co-assembly por geleira</i>	<i>50</i>
4.4.3.1.1. <i>Anotação funcional.....</i>	<i>51</i>
4.4.3.2. <i>Co-assembly</i>	<i>51</i>
4.4.3.3. <i>Assembly.....</i>	<i>51</i>
4.4.4. <i>Pangenômica e filogenômica.....</i>	<i>52</i>
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1. Anotação taxonômica dos reads.....	55
5.2. Diversidade microbiana e influência dos fatores ambientais	62
5.3. Co-assembly por geleira.....	66
5.3.1. <i>Anotação funcional</i>	<i>75</i>
5.3.1.1. <i>COL_MAG_00001: Nitrososphaeraceae.....</i>	<i>80</i>
5.3.1.2. <i>BAR_MAG_00002: Rhodococcus.....</i>	<i>82</i>

5.3.1.3.	BAR_MAG_00008: Saprospiraceae	83
5.3.1.4.	BAR_MAG_00009: <i>Aquaticitalea</i>	85
5.3.1.5.	BAR_MAG_00010: <i>Ferruginibacter</i>	85
5.3.1.6.	BAR_MAG_00011: Acidimicrobiales	86
5.3.1.7.	BAR_MAG_00014: <i>Lacibacter</i>	87
5.3.1.8.	BAR_MAG_00015: Chitinophagaceae	87
5.3.1.9.	BAR_MAG_00028: Chitinophagaceae	88
5.3.1.10.	BAR_MAG_00031: <i>Rhodoglobus</i>	88
5.4.	Co-assembly (combinação de todas as amostras).....	89
5.5.	Assembly.....	94
5.6.	Pangenômica e filogenômica	99
5.6.1.	BAR_MAG_00002.....	100
5.6.2.	COL_MAG_00001.....	103
6.	CONCLUSÃO	106
7.	REFERÊNCIAS.....	108

1. INTRODUÇÃO

A Antártica é conhecida como o “continente dos extremos” devido a suas condições ambientais que, em geral, limitam a sobrevivência dos organismos. Dependendo do hábitat, esse ambiente pode apresentar baixas temperaturas, alta incidência de radiação ultravioleta (UV), dessecação e baixa disponibilidade de nutrientes. Nesse continente, os micro-organismos são organismos mais abundantes, ocupando diversos nichos dos ecossistemas. O estudo da microbiologia Antártica iniciou-se nos anos de 1960, com trabalhos relacionados a bactérias, algas e fungos (DI MENNA; 1960; FLINT; STOUT, 1960; STRAKA; STOKES, 1960; CAMERON; KING; DAVID, 1970). Atualmente, com o avanço das tecnologias de amostragem e metodologias de pesquisa, diversos trabalhos de microbiologia, micologia, botânica e zoologia são publicados todos os anos. Entretanto, ainda há muito a se descobrir no continente mais intocado do planeta.

Um fenômeno em particular torna urgente entender o funcionamento das comunidades antárticas: as mudanças climáticas. Essas comunidades estão especialmente ameaçadas por tais mudanças, com a necessidade de se adaptar para enfrentar as novas condições ambientais. Segundo o Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC), as regiões polares são as que mais sofreram com o aumento da temperatura média global, desde os anos 1950. Como os fatores abióticos moldam a comunidade local, o aumento da temperatura e a intensificação da radiação solar, por exemplo, provocam uma mudança na abundância e riqueza de espécies terrestres e marinhas (YERGEAU *et al.*, 2012; BOFF, 2018). Contudo, considerando a variedade de hábitats antárticos, não é uma tarefa fácil prever as consequências das mudanças climáticas nos ecossistemas (COWAN, 2014).

Um dos mais importantes efeitos das mudanças climáticas na Antártica é a retração de geleiras. Entre os anos 1960 e 1990, a área global de geleira reduzida foi de aproximadamente 1%, sendo as geleiras alpinas as mais afetadas (DYURGEROV; MEIER, 1997; BARRY, 2006). De 1960 até os anos 2010, a taxa de perda anual foi de 0,35% (SHI-JIN; LAN-YUE, 2019). O solo associado ao derretimento de geleiras possui um gradiente de fatores físicos, químicos e biológicos que se forma durante décadas de transformação abiótica em poucos metros (SIGLER; ZEYER, 2004; DUARTE, 2010). Esse gradiente, denominado

cronossequência, culmina também na sucessão da comunidade microbiana, fúngica e vegetal.

A comunidade microbiana pode ser acessada por metodologias dependentes ou independentes de cultivo. Em um ambiente com condições dificilmente replicadas em laboratório, uma das melhores opções é realizar o sequenciamento de amostras ambientais. O WGS (do inglês “*whole genome shotgun*”) permite sequenciar todo o material genético contido em uma amostra. Após análises de bioinformática, é possível identificar micro-organismos, genes e funções e até reconstruir MAGs (do inglês “*metagenome-assembled genomes*”): genomas completos (ou quase completos) recuperados a partir do DNA ambiental sequenciado.

Considerando a escassez de trabalhos sobre o tema, mais estudos devem ser realizados para caracterizar os processos de sucessão ecológica nos solos da Antártica associados à retração de geleiras, com ênfase nos grupos microbianos e seus perfis metabólicos e funcionais, a fim de entender melhor os efeitos das mudanças climáticas no funcionamento das comunidades microbianas.

Esse trabalho foi desenvolvido no âmbito do Programa Antártico Brasileiro dentro dos projetos intitulados “A Vida Microbiana na Criosfera Antártica: Mudanças Climáticas e Bioprospecção” (MICROSFERA – CNPq-PROANTAR #407816/2013-5) sob coordenação da Profa. Vivian Pellizari e com cooperação do INCT-CRIOSFERA (CNPq 55.0353/2002-0) sob coordenação do Prof. Jefferson Simões.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Este estudo tem como objetivo geral compreender a comunidade microbiana do ponto de vista taxonômico e funcional, a partir de dados metagenômicos, ao longo da cronossequência de duas geleiras na Ilha Rei George com tempos de retração distintos: Geleira Collins (aprox. 3500 anos de retração) e Geleira Baranowski (aprox. 40 anos de retração).

2.2. Específicos

1. Entender a sucessão ecológica microbiana dos solos de recuo das geleiras Collins e Baranowski a partir de dados metagenômicos;
2. Comparar a diversidade microbiana no transecto de cada geleira e entre geleiras a partir de dados metagenômicos;
3. Reconstruir genomas microbianos (MAGs) ao longo dos solos de recuo das geleiras Collins e Baranowski;
4. Desvendar a taxonomia e o potencial metabólico dos MAGs, dando enfoque nos metabolismos do ciclo do carbono, ciclo do nitrogênio, ciclo do enxofre, degradação de carboidratos, reparo de DNA, resposta à estresses ambientais, resistência a antibióticos e transferência horizontal de genes;
5. Comparar genomas reconstruídos selecionados com seus respectivos genomas de referência por meio de análises de pangenoma.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O ambiente antártico

À primeira vista, o continente antártico parece inóspito à vida; porém, organismos como algas, fungos, bactérias e arqueias habitam diversos ecossistemas antárticos (SHIVAJI; REDDY; CATTOPADHYAY, 2017). Outros locais como o Ártico e as regiões alpinas também abrigam organismos capazes de sobreviver a condições adversas (SATHYANARAYANA; CHATTOPADHYAY; SHIVAJI, 2016). A Antártica se difere desses habitats por ser mais isolada e estar sob a influência do Oceano Austral, enquanto as outras duas áreas são rodeadas por terra, o que permite migração e fluxo gênico, por exemplo (PEARCE; WILSON, 2003). Na Antártica, a entrada de matéria alóctone no ecossistema, como partículas e organismos, se dá principalmente via dispersão aérea (PEARCE *et al.*, 2009; COWAN *et al.*, 2011) e marinha (KASPARI *et al.*, 2005; BARBARO *et al.*, 2017).

Os micro-organismos formam a biomassa mais abundante da Antártica e controlam grande parte do fluxo de carbono, nitrogênio, nutrientes e de energia (VINCENT, 2000; ANESIO *et al.*, 2017; YERGEAU *et al.*, 2012; ORTIZ *et al.*, 2020). Eles também são a base dos ecossistemas antárticos como, por exemplo, cianobactérias que atuam na produção primária (ANESIO *et al.*, 2017). Por fazerem parte de teias alimentares simples, o local é um ótimo modelo para entender os processos básicos microbianos, além de fornecer um laboratório natural para estudar a evolução e adaptação microbiana (VINCENT, 2000).

A Antártica, no entanto, não é composta apenas por habitats gelados. Ali, também é possível encontrar lagos salinos (BOWMAN *et al.*, 2000), desertos secos (DE LA TORRE *et al.*, 2003), lagos e solos com baixa disponibilidade de nutrientes (VANDER SCHAAF *et al.*, 2015; PEARCE *et al.*, 2012) e locais com altas temperaturas, como vulcões e fumarolas (BENDIA *et al.*, 2018a; BENDIA *et al.*, 2018b). Assim, os organismos são altamente adaptados às condições extremas e hostis, com diversas estratégias individuais, como *cold-shock proteins* para proteger ácidos nucleicos do congelamento (VERDE *et al.*, 2016); ou coletivas, como *quorum sensing* e formação de biofilmes (WONG *et al.*, 2019).

Apesar das adaptações específicas, comunidades microbianas que habitam a Antártica têm se mostrado possuir uma alta diversidade, tanto taxonômica quanto

funcional. Contudo, elas parecem ser sensíveis a impactos externos naturais, bem como antrópicos (WYNN-WILLIAMS, 1996; COWAN; TOW, 2004; GUTT *et al.*, 2021).

Devido ao isolamento do local, clima extremo (MONAGHAN; BROMWICH, 2008) e dificuldades de amostragem, ainda há muito a explorar sobre os micro-organismos que habitam a Antártica. Novas descobertas estão intimamente ligadas à biotecnologia, especialmente relacionadas a adaptações às condições extremas, como substâncias antimicrobianas e degradadoras (LO GIUDICE; FANI, 2015; COWTON, 2016).

3.2. Mudanças climáticas

Ao longo dos milhões de anos da história geológica da Terra, o planeta passou por diversos eventos de mudanças climáticas, como as glaciações causadas pela modificação da órbita da Terra (MULLER; MACDONALD, 1995). Apesar das causas naturais da variabilidade climática no passado, não há como negar as evidências de que as atuais mudanças climáticas são causadas por atividades antrópicas.

A atividade humana explora os recursos naturais, biodiversidade e processos ecossistêmicos (WALL, 2005). Como consequência, a quantidade de CO₂ e outros gases do efeito estufa na atmosfera, como CH₄ e N₂O, vêm se acumulando na atmosfera, em uma taxa muito mais rápida do que o previsto para o Período Quaternário (IPCC, 2007). A fim de entender melhor o clima passado, registros de testemunho de gelo possuem propriedades físicas que permitem reconstruir padrões climáticos antigos. De acordo com eles, a atual concentração de CO₂ na atmosfera é a maior dos últimos 800.000 anos (IPCC, 2007; MAYEWSKI *et al.*, 2009). Além disso, os padrões de circulação atmosférica que coincidiam com o aumento de temperaturas em épocas passadas não acontecem hoje, corroborando a hipótese de que as mudanças climáticas atuais não são naturais (MAYEWSKI; MAASCH, 2006).

Evidências das mudanças climáticas já podem ser encontradas no âmbito global, afetando os ambientes de diversas formas, dentre elas: aumento da frequência de eventos extremos, aumento da temperatura média da superfície do ar, aumento do nível dos oceanos, ventos mais fortes, acidificação do oceano, maior

fluxo de luz e radiação UV, derretimento de geleiras, entre outros (DEPPELER; DAVIDSON, 2017; BALTAR *et al.*, 2019)

A temperatura global, de modo geral, depende de três variáveis: recebimento de radiação solar (variável pelo movimento terrestre e intensidade solar), albedo e retorno da radiação refletida de volta para a Terra. Este último fator está intimamente relacionado à concentração de gases do efeito estufa (IPCC, 2007). Além disso, por conta de seu papel na circulação atmosférica, a Antártica sofre com a diminuição da camada de ozônio, de forma que há uma retroalimentação entre esse fenômeno e as mudanças climáticas (MAYEWSKI *et al.*, 2009).

Estudar as mudanças climáticas para prever e mitigar seus impactos tornou-se urgente. No campo da Meteorologia, métodos combinam sensoriamento remoto, modelos atmosféricos e registro de gelo para entender variações do clima ao longo do tempo (LEDLEY *et al.*, 1999; MONAGHAN; BROMWICH, 2008). No campo da Paleontologia e Geologia, o estudo de *proxies* permite inferir sobre e reconstruir climas do passado do planeta, ou paleoclima. Já a Biologia auxilia na manutenção e no estudo das respostas dos organismos e ecossistemas às novas condições climáticas.

A biodiversidade já está sendo afetada pelo fenômeno, a nível de espécie, população, comunidade e ecossistema. O maior receio é se as espécies (principalmente as com nicho restrito) poderão se adaptar às novas condições ambientais (BELLARD *et al.*, 2012; FODEN *et al.*, 2019; MALHI *et al.*, 2020). Isso acontece porque a maior parte dos processos biológicos ocorre a uma temperatura ótima (que depende do organismo); dessa forma, a temperatura é uma condição limitante (VERDE *et al.*, 2016). Ainda assim, poucos estudos foram realizados com foco no papel e nas respostas dos micro-organismos às novas condições climáticas (CAVICCHIOLI *et al.*, 2019). Isso é um problema porque os micro-organismos moldam os ecossistemas, seja participando das teias alimentares ou dos ciclos biogeoquímicos (KOH *et al.*, 2012).

As principais áreas de risco para as mudanças climáticas são as de maior altitude e maior latitude, incluindo a Península Antártica, que sofreu um aumento de 2,5 °C nos últimos 60 anos (IPCC, 2007). Segundo o IPCC (2014), a atividade antrópica é causadora da retração de geleiras desde os anos 1960. Estudos indicam que, apesar de a temperatura média do planeta nas últimas décadas ter aumentado, esse aumento é ainda mais intenso nos polos (HANSEN *et al.*, 1999; VAUGHAN *et*

al., 2003; MEREDITH; KING, 2005; CONVEY, 2006), causando diminuição das regiões de *permafrost*, liberação de carbono de águas profundas, derretimento de geleiras, diminuição da cobertura de neve e mudanças nas dinâmicas ecossistêmicas (VAUGHAN, 2005; CONVEY, 2006; MEREDITH *et al.*, 2017; BROWN *et al.*, 2019). As massas de ar também induzem a entrada de águas mais quentes na Corrente Circumpolar Antártica (VAUGHAN *et al.*, 2003; MEREDITH; HOGG, 2006), o que colabora ainda mais para a perda da camada de gelo antártica (HATTERMANN; LEVERMANN, 2009; PRITCHARD *et al.*, 2012).

Segundo Smith *et al.* (2020), a Antártica perdeu 118 bilhões de toneladas de *permafrost* por ano entre 2003 e 2019, contribuindo com o aumento de 5,2 mm do nível do oceano. Já o estudo de Cook *et al.* (2005) observou que 87% das geleiras da Península Antártica têm recuado em relação às suas posições mais antigas documentadas. Especificamente na Ilha Rei George, estima-se uma perda de 20 km² da cobertura de gelo local entre 2000 e 2008 (RÜCKAMP *et al.*, 2011).

O aquecimento da Antártica pode ser ainda retroalimentado devido ao processo de recuo das geleiras e de *permafrost*: o derretimento deixa solo exposto, e microrganismos que antes estavam em baixo metabolismo no gelo podem aumentar a taxa de respiração e, conseqüentemente, liberar CO₂ (DUARTE, 2010; WANG *et al.*, 2020). Outro motivador é a liberação de gases do efeito estufa, como o metano, que estavam depositados no *permafrost* (ZIMOV; SCHUUR; CHAPIN III, 2006; WALTER *et al.*, 2006; ANISIMOV, 2007). Além disso, a redução da camada de gelo diminui o albedo, aumentando a absorção de raios solares pelo planeta (MASSON-DELMOTTE *et al.*, 2006).

As mudanças climáticas já eram motivo de preocupação do século passado, como evidenciado pelo estudo de Ruess *et al.* (1999). De acordo com os autores, o aquecimento do solo ártico aumentaria os processos relacionados à fósforo e nitrogênio, o suficiente para o estabelecimento de plantas. Segundo Lee *et al.* (2017), o aquecimento global dará espaço para que os organismos se desenvolvam e se estabeleçam em solo recém exposto em decorrência do derretimento de geleiras. No entanto, isso também significa que espécies exóticas podem colonizar esses novos habitats (CLARK *et al.*, 2004; CONVEY; SMITH, 2004; CHOWN *et al.*, 2012; MOLINA-MONTENEGRO *et al.*, 2016; CONVEY; PECK, 2019). Uma vez que fatores abióticos (disponibilidade de água e nutrientes, luz e temperatura)

influenciam mais os ecossistemas antárticos do que os bióticos (como predação e competição), as consequências desse efeito não são totalmente compreendidas.

Ainda, Yergeau *et al.* (2012) e Boff (2018) comentam sobre a variação na comunidade microbiana em resposta às mudanças climáticas. Ambos os trabalhos sugerem uma transformação na composição da comunidade microbiana conforme o aumento de temperatura, dando espaço aos micro-organismos generalistas e copiotróficos, capazes de realizar diversos papéis ecológicos.

3.3. Metagenômica e reconstrução de genomas microbianos

Apesar da alta abundância e diversidade de micro-organismos, nem sempre é possível acessá-los a partir de métodos como cultura e microscopia. A Anomalia da Contagem de Placa (*Great Plate Count Anomaly*, em inglês) foi descrita por Staley e Konopka (1985), na qual foi observado que o número de células viáveis de uma mesma amostra em microscopia e cultura são divergentes. Ainda que a caracterização das cepas em cultura seja mais complexa e satisfatória (GONZÁLEZ-ROCHA *et al.*, 2017), estima-se que menos de 1% das bactérias da biosfera seja cultivável (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; EPSTEIN, 2013; ALNEBERG *et al.*, 2018). A justificativa para esse fenômeno é que a replicação das condições naturais de onde as amostras foram retiradas é muito difícil de ser realizada em laboratório (HARWANI, 2013). Já a replicação de condições polares, que compreende baixas temperaturas, dessecação e oligotrofia é um desafio ainda maior. Ademais, o acesso ao continente gelado não é trivial, de modo que pouquíssimos procaríotos antárticos foram isolados e cultivados (LAMBRECHTS; WILLEMS; TAHON, 2019).

Felizmente, foi possível contornar a Anomalia da Contagem de Placa com o advento das ferramentas moleculares, mais especificamente o sequenciamento de DNA (KNIGHT *et al.*, 2018). Desde o sequenciamento de Sanger (SANGER *et al.*, 1977) até o sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês “*new generation sequencing*”), os métodos se tornaram mais rápidos, acessíveis, com menor erro e maior capacidade de processamento de dados (BUERMANS; DEN DUNNEN, 2014; ROY *et al.*, 2018). É possível recuperar dados de amostras inteiras, contendo milhares de organismos sequenciando marcadores genéticos (como gene do RNA ribossomal 16S) ou sequências inteiras de nucleotídeos. Mais recentemente, o

chamado sequenciamento de terceira geração (TGS, do inglês “*third generation sequencing*”) vem revolucionando novamente as análises genéticas. O TGS supera a necessidade de amplificação do DNA via reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “*polymerase chain reaction*”) e aumenta o tamanho das sequências genéticas resultantes, criando os chamados *long-reads* (VAN DJIK *et al.*, 2018; AMARASINGHE *et al.*, 2020).

O processamento do resultado do sequenciamento é feito por meio de ferramentas de bioinformática. Devido à grande quantidade de dados, são necessários *pipelines* (roteiros passo-a-passo) de *softwares* para auxiliar na análise e interpretação dos resultados. Além disso, tornou-se essencial o desenvolvimento de bancos de dados coletivos para armazenamento e consulta da informação biológica (KANEHISA; BORK, 2003; ABDURAKHMONOV, 2016; DINIZ; CANDURI, 2017). Desde os anos 80, a bioinformática vem revolucionando diversas áreas das Ciências Naturais, como genética de populações, microbiologia, biologia molecular, sistemática e até medicina (GAUTHIER *et al.*, 2018; BAYAT, 2002). Apesar da clara importância, a bioinformática é pouco abordada nos cursos superiores das Ciências Naturais, sendo a maioria dos bioinformatas autodidatas (ATTWOOD *et al.*, 2019).

Os bioinformatas possuem à disposição uma infinidade de ferramentas computacionais para análise de seus dados. No entanto, todo ano há o desenvolvimento de novas tecnologias para acompanhar o crescimento na quantidade e qualidade das informações biológicas. Cada vez mais, há a necessidade de atuação conjunta de biólogos, estatísticos e cientistas da computação, além da integração entre os países, para otimizar essa tarefa.

Metagenômica é a área da Genética que utiliza o sequenciamento para acessar o material genético total de uma amostra ambiental (KIM *et al.*, 2013; ROUMPEKA *et al.*, 2017). O termo foi cunhado por Handelsman *et al.* em 1998, trabalho que utilizou amostras de DNA bacteriano de solo. Um dos maiores e mais conhecidos trabalhos desse tipo foi realizado por Venter *et al.* (2004), analisando amostras do Mar dos Sargaços. Os autores encontraram mais de 1 milhão de genes desconhecidos e classificaram taxonomicamente as bactérias presentes no ambiente. Contudo, a metagenômica pode ir além da taxonomia e caracterizar o potencial metabólico do ambiente estudado (SCHOLZ; LO; CHAIN, 2012; KIM *et al.*, 2013).

A informação genética não é a única que pode ser recuperada em sua totalidade: novos trabalhos também utilizam a metatranscriptômica (mede os níveis de mRNA), a metaproteômica (determina a abundância de peptídeos) e a metabolômica (quantifica a abundância de metabólitos nas células) (ZHANG; LI; NIE, 2010; HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017). Elas são comumente reunidos sob um termo: as ciências 'ômicas (DINIZ; CANDURI, 2017).

Para estudar um metagenoma a partir do NGS, é necessário construir as bibliotecas, ou seja, preparar as sequências de DNA antes de sequenciá-las. Elas são fragmentadas e são adicionados adaptadores ou *barcode* e, então, amplificadas via PCR (DI BELLA *et al.*, 2013; HEAD *et al.*, 2018). Os *amplicons* passam pelo sequenciador para realização do WGS. O primeiro organismo a ter seu genoma inteiro sequenciado através dessa abordagem foi a bactéria *Haemophilus influenzae* em 1995 (FLEISCHMANN *et al.*, 1995; BAYAT, 2002). O sequenciamento pode ser *single-end* ou *paired-end*, sendo o primeiro obtendo apenas a sequência de um fragmento de DNA em um sentido, enquanto que o *paired-end* lê o fragmento nos sentidos 3'→5' e 5'→3', tornando o alinhamento mais acurado e a detecção de mutantes mais fácil. O resultado do sequenciador chega em formato de *reads*: milhões de pequenas sequências de DNA com aproximadamente 150 pb (pela plataforma Illumina).

3.3.1. Diversidade microbiana e influência dos fatores ambientais

Bactérias, arqueias e formas de vida em geral não estão distribuídas homogeneamente na biosfera (MAGURRAN, 2004). Portanto, a diversidade pode ser descrita como “a variabilidade e abundância de organismos em um dado local e tempo” (MAGURRAN, 2005). Nos estudos ecológicos, pode-se definir três tipos de diversidade: alfa diversidade, descrevendo apenas uma comunidade; beta diversidade, comparando duas ou mais comunidades; e gamma diversidade, que compara a diversidade entre regiões geográficas.

Quantificar diversidade não é um processo trivial. Para isso, leva-se em consideração três atributos: riqueza, abundância e equitabilidade. A riqueza é descrita como o número bruto de espécies presentes na comunidade. A abundância calcula a quantidade de indivíduos de uma mesma espécie e, com essa informação gerada para todas as espécies, é possível determinar a abundância relativa. A

equitabilidade se refere a como essas espécies se distribuem (ou seja, quanto mais parecida a abundância dessas espécies, maior a equitabilidade). Os índices de diversidade costumam combinar as informações de riqueza e abundância.

Antes de determinar a diversidade propriamente dita, é necessário realizar uma curva de rarefação, para verificar se o esforço amostral foi suficiente para representar a comunidade microbiana local. Para o processo de rarefação, é comumente realizada uma reamostragem para que todas as amostras tenham o mesmo tamanho de biblioteca, eliminando dados até alcançar a menor amostra. No entanto, novos estudos vêm mostrando que essa forma de normalização pode ser falha, uma vez que despreza grande parte material genômico obtido (MCMURDIE; HOLMES, 2014; CAMERON et al. 2021).

Para as análises de alfa diversidade, os índices mais utilizados são Shannon e Simpson. O índice de Shannon é sensível a espécies raras, de forma que valoriza a riqueza. Estima a incerteza em predizer a espécie de um organismo amostrado levando em consideração os organismos anteriores (NAGENDRA, 2002; LAFORCE, 2019). Quanto maior o valor de Shannon, maior a diversidade. Já o índice de Simpson lida melhor com espécies abundantes, valorizando o conceito de equitabilidade. Consiste em calcular a probabilidade de dois organismos da comunidade selecionados ao acaso serem de espécies diferentes (HUNTER; GASTON, 1988; NAGENDRA, 2002). O resultado é uma escala de 0 a 1; quanto mais perto de 1, maior a diversidade. Já a equitabilidade de Pielou pode ser descrita como a “razão entre a diversidade observada e a máxima diversidade possível em uma coleção que possui o mesmo número de espécies” (PIELOU, 1966). O cálculo baseia-se no índice de Shannon, gerando um valor entre 0 e 1. Quanto menor o valor, menor a equitabilidade.

Para as análises de beta diversidade, o mais conhecido é o índice de dissimilaridade Bray-Curtis. É feito um cálculo de distância (dissimilaridade) que leva em consideração a abundância de espécies para gerar uma proporção (se 0, as amostras são iguais; se 1, as amostras não possuem nenhuma espécie em comum). Para visualizar este dado, é gerada uma ordenação, que permite a visualização de múltiplas variáveis em apenas duas dimensões. Quanto mais pertos os pontos referentes a dadas amostras, mais similares são suas comunidades microbianas.

Utilizando a matriz de dissimilaridade Bray-Curtis, é possível adicionar à ordenação componentes ambientais. Esses componentes são convertidos em

vetores e adicionados no escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS, do inglês “non-metric multidimensional scaling”), que também pode ser classificada como uma análise de composição. A partir do nMDS, é possível perceber o quão distantes estão as amostras e a influência dos parâmetros físico-químicos nas comunidades microbianas. Esse tipo de análise multivariada, no entanto, não tem valor estatístico (VICINI, 2005); para isso, é necessário recorrer a uma matriz de correlação, por exemplo, para gerar uma análise confirmatória.

3.3.2. Reconstrução de genomas microbianos

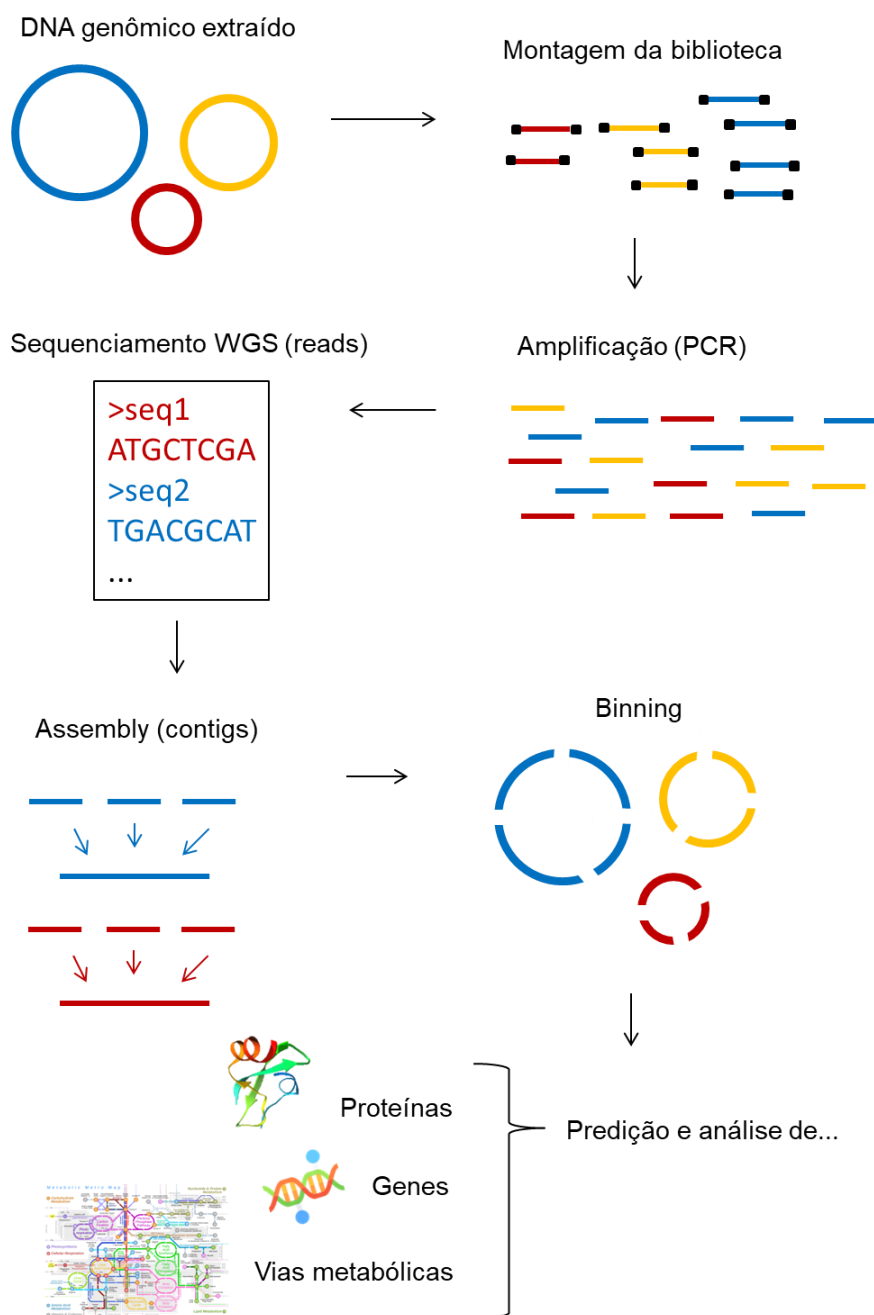
Para outros tipos de análise, os *reads* possuem pouca informação biológica, logo, precisam ser reunidos em sequências maiores, os *contigs*. A cada etapa, é necessário realizar controle de qualidade, descartando regiões indesejadas ou contaminadas dos *reads*. Profundidade (*depth*) ou cobertura (*coverage*) é um parâmetro importante nessa fase: refere-se à quantidade de vezes que um dado fragmento (múltiplas posições de nucleotídeos) foi sequenciado. Quanto maior a cobertura, melhor o processo de montagem, a acurácia e a confiabilidade dos *contigs* (COMMINS; TOFT; FARES, 2009; JIANG *et al.*, 2019).

A montagem de *contigs* (*assembly*) requer alto esforço computacional para ser realizado de forma satisfatória (COMMINS; TOFT; FARES, 2009). O *assembly* pode ser feito a partir do mapeamento de uma referência conhecida de banco de dados, ou apenas com a informação dos *reads*. Essa última, mais complexa, é denominada *assembly de novo*, e os softwares que realizam esta tarefa analisam a sobreposição de nucleotídeos em cada *read* para alongar a sequência em *contig*. No entanto, os *contigs* devem passar por um controle de qualidade para evitar quimerismo, ou seja, sequências de diferentes organismos que montaram um *contig* por sobreposição incorreta e aleatória (PAPUDESHI *et al.*, 2017). Depois da checagem de qualidade, os *contigs* já podem ser utilizados para outras análises, que dependem da pergunta científica de cada trabalho: classificação taxonômica, anotação gênica e funcional, filogenia, vias metabólicas, entre outros (CARRIÇO *et al.*, 2018).

Após o *assembly*, pode ser realizado o *binning*, processo em que os *contigs* são agrupados em grupos taxonômicos (geralmente da mesma população, segundo Strous *et al.* (2012)), ou *bins*. Os *bins* são montados a partir da análise da

composição dos *contigs* e de assinaturas genômicas como porcentagem de guanina e citosina (%GC), perfil k-mer e frequência de tetranucleotídeos (NOBLE; CITEK; OGUNSEITAN, 1998; TEELING *et al.*, 2004; PAPUDESHI *et al.*, 2017; FRIIOUX *et al.*, 2020). O *binning* facilita a classificação, anotação funcional e a construção de MAGs (SEDLAR; KUPKOVA; PROVAZNIK, 2017; ALNEBERG *et al.*, 2018). Um resumo das etapas para realização do metagenoma está na Figura 1.

Figura 1. Pipeline simplificado para obtenção de MAGs a partir do metagenoma de uma amostra ambiental.



Fonte: da Autora.

Anvi'o é uma plataforma de análise e visualização de dados ômicos (EREN *et al.*, 2015) usando a abordagem do *co-assembly*, isto é, reunindo informações genéticas de diversas amostras de uma só vez. O *pipeline* do *Anvi'o* permite o uso de linhas de comando no ambiente Linux e ainda uma interface visual para edição manual dos *bins*. Assim, é possível montar os MAGs, verificando completude (quanto o genoma está completo, em porcentagem) e contaminação ou redundância (o primeiro se trata da contaminação do genoma de interesse com sequências de outros organismos, enquanto que o segundo é a existência por múltiplas cópias de um gene que deveria ser cópia única no genoma; nesta dissertação, utilizaremos os conceitos de forma intercambiável). Um genoma de alta qualidade pode ser definido por ser >90% completo e <5% contaminado; de média qualidade, >50% completo e <10% contaminado; e de baixa qualidade, <50% completo e >10% contaminado (BOWERS *et al.*, 2017).

Análises de pangenoma também podem ser realizados no *Anvi'o*, comparando os genomas reconstruídos com genomas de referência da mesma espécie ou gênero encontrados em bancos de dados. Esse processo foi descrito pela primeira vez por Tettelin *et al.* (2005), que tentou entender a variabilidade genética do patógeno *Streptococcus agalactiae*. Durante os anos que se seguiram, o pangenoma era usado a nível de espécie ou, no máximo, a nível de gênero para comparar os genomas. Entretanto, trabalhos mais recentes (LUGLI *et al.*, 2017; RIJZAANI *et al.*, 2021) já utilizam o método para comparar gêneros na mesma família.

O pangenoma permite definir o *core genome*, ou seja, os genes presentes em todos os genomas ou cepas comparados, que em geral são genes ligados a metabolismos essenciais, e o *accessory genome*, genes encontrados em mais de um genoma, mas não em todos os analisados (pode ser dividido em *shell genome*, genes encontrados na maioria das cepas e *cloud genome*, genes acessórios encontrados na minoria dos genomas) (MEDINI *et al.*, 2005; KOONIN; WOLF, 2008; SNIPEN; USSERY, 2010). Os chamados *singletons* são os genes de maior interesse para este estudo, aqueles presentes em apenas um dos genomas (COSTA *et al.*, 2020). A genômica comparativa é uma proposta interessante para entender os limites de uma espécie microbiana pois, em cada habitat, há pressões seletivas distintas sobre os genes, além de novas oportunidades de eventos de transferência horizontal.

Para o prosseguimento das análises funcionais ou de pangenoma, por exemplo, o ideal é que se utilizem os MAGs com maior qualidade. Dessa forma, há uma maior confiança de que os genes encontrados são de fato daquele organismo e, que, por estar com sua sequência de DNA quase 100% completa, as vias metabólicas e seus respectivos genes também estarão completos ou quase completos.

3.4. Geleiras antárticas e sua diversidade microbiana

Geleiras são grandes massas de gelo que comportam cerca de 75% da água doce global (KNIGHT, 2004). Elas podem ser encontradas nos pólos, Ártico e Antártica, além do topo das montanhas, denominadas geleiras alpinas. Além de fazerem parte do ciclo hidrológico da Terra, também influenciam o balanço climático.

As comunidades microbianas das geleiras também são diversas e ativas, com particularidades nas regiões supraglacial, englacial, and subglacial (GARCÍA-LOPEZ *et al.*, 2021). De acordo com os autores desse trabalho, a área supraglacial, na superfície da geleira, é repleta de organismos fotoautotróficos; a área englacial, dentro do gelo, compreende seres metabolicamente ativos, que se comunicam através de sinais químicos; já a área subglacial, abaixo da geleira, é rica em material mineral e orgânico por causa do contato entre gelo e rocha, onde são encontrados organismos quimioautotróficos. A área ao redor da geleira também possui suas particularidades, como o solo de moraina.

O solo de moraina exposto pela retração de geleiras apresenta um contínuo de fatores físicos, químicos e biológicos, denominado cronossequência. Esse solo recém-exposto, protegido pelo gelo por dezenas até milhares de anos, é um modelo interessante para compreender a sucessão ecológica microbiana em áreas sensíveis a variações ambientais (SIGLER; ZEYER, 2004), uma vez que permite o estudo de várias décadas de mudanças ecológicas em distâncias de poucos metros (DUARTE, 2010).

Esse tipo de solo é moldado por atividades abióticas e bióticas. A umidade do solo decresce com a distância da geleira, uma vez que a água proveniente do derretimento se infiltra no solo exposto há menos tempo (STRAUSS; RUHLAND; DAY, 2009; BAJERSKI; WAGNER, 2013); a umidade influencia na respiração local, já que controla a solubilidade do oxigênio (REN; HU; BU, 2022). Considerando a

influência do oceano nas geleiras da Península Antártica, o *spray* marinho contribui para a inserção de nutrientes no local (GARCIA-LOPEZ; CID, 2017), e atua também como fonte de dispersão de bactérias (VINCENT, 2000; CHONG *et al.*, 2012a). Substratos alóctones ou provenientes de erosão e dispersão aérea também são processos conhecidos de *input* de minerais e outros nutrientes (HODKINSON; WEBB; COULSON, 2002). A radiação UV modela a comunidade microbiana na superfície do solo exposto, selecionando aqueles que possuem resistência (RIME *et al.*, 2014), o que determina os processos metabólicos predominantes. A temperatura do solo e do ar também são fatores que determinam estruturação microbiana, uma vez que o aquecimento do solo aumenta diversidade e função microbiana (DENNIS *et al.*, 2019; REN; HU; BU, 2022; FANIN *et al.*, 2022).

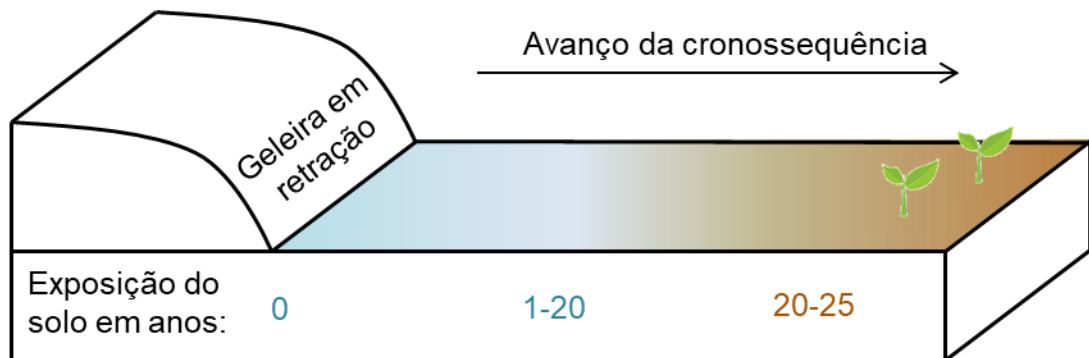
A composição de nutrientes do solo depende também da comunidade microbiana ativa. A fixação de carbono e nitrogênio é comum no início da cronossequência, realizada por integrantes do filo Cyanobacteria, por exemplo (LIU *et al.*, 2016; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2017; PESSI *et al.*, 2019). A concentração de carbono, nitrogênio, além de potássio e magnésio, aumenta conforme a progressão da cronossequência, permitindo a colonização do solo por novos táxons microbianos (DUARTE, 2010; LIU *et al.*, 2012; KWON *et al.*, 2015; NASH *et al.*, 2018; GARRIDO-BENAVENT *et al.*, 2020). O pH do solo se torna mais ácido ao final da cronossequência devido à decomposição de restos orgânicos (STRAUSS; RUHLAND; DAY, 2009; GARRIDO-BENAVENT, 2020), modificando a estrutura da comunidade ao longo do transecto (CHONG *et al.*, 2012b). Esses processos funcionais são indispensáveis para o desenvolvimento do solo na sucessão ecológica, facilitando a colonização local por novos táxons microbianos e plantas (SCHULZ *et al.*, 2013; KRAUZE *et al.*, 2021).

Vertebrados como pinguins e pinípedes também influenciam as propriedades físico-químicas do solo, como conteúdo de carbono, fósforo e, principalmente, nitrogênio (BOKHORST; CONVEY; AERTS, 2019), o que leva a um aumento do pH edáfico. Cascas de ovos, fezes e carcaças trazem *input* desses nutrientes para o solo antártico e moldam a comunidade microbiana (GUO *et al.*, 2018; Ramírez-Fernández *et al.*, 2019). Por exemplo, Ramírez-Fernández *et al.* (2021) compararam metagenoma de solos antárticos influenciados ou não por animais e encontraram mais cópias de genes relacionados ao ciclo do nitrogênio nos solos impactados pelos vertebrados.

Estudos já revelaram os processos de sucessão ecológica microbiana em solos de recuo de geleira do Ártico (KAŠTOVSKÁ *et al.*, 2005; SCHÜTTE *et al.*, 2009; DENG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2017) e em geleiras alpinas (TSCHERKO *et al.*, 2003a; PHILIPPOT *et al.*, 2011; BROWN; JUMPPONEN, 2013; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2017), mas ainda há muito a se descobrir sobre as geleiras antárticas.

Dados obtidos em projetos anteriores por nosso grupo de pesquisa (DUARTE, 2010 e resultados não publicados) revelaram com mais detalhes a sucessão ecológica microbiana no solo recém exposto pela geleira Baranowski (retração de aproximadamente 450m nos últimos 40 anos) (ARAGONY-NETO, 2001; LAFORCE, 2019). Os resultados obtidos por Duarte (2010) demonstraram que a sucessão ecológica da geleira ocorre em 3 etapas: 1) comunidade abaixo do gelo é exposta; 2) comunidade original sofre mudanças graduais durante cerca de 20 anos, substituída por outros micro-organismos; 3) novas mudanças na comunidade devido à presença de nutrientes como potássio, magnésio e nitrogênio (Figura 2).

Figura 2. Representação simplificada da cronossequência da geleira Baranowski segundo Duarte (2010).



Fonte: da Autora

No solo recém exposto da Geleira Baranowski, a classe Betaproteobacteria foi a mais abundante – 48% (DUARTE, 2010). Em um estudo realizado em Larsemann Hills, Leste da Antártica, Actinobacteria era o táxon dominante (BAJERSKI; WAGNER, 2013), em contraste com Proteobacteria na Geleira Wanda (PESSI *et al.*, 2015) e na Geleira Hurd (GARRIDO-BENAVENT *et al.*, 2020), ambas na Península Antártica. Apesar desses trabalhos terem sido realizados com amostras de locais diferentes da Antártica, todos corroboram a hipótese de que a

diversidade microbiana aumenta de acordo com a disponibilidade de nutrientes como carbono e nitrogênio, por exemplo.

Duarte (2010) também realizou a quantificação da liberação de CO₂ (respiração do solo) ao longo do transecto da geleira Baranowski. A análise mostrou um aumento na taxa de respiração do solo mais recente para o solo mais antigo. Esses resultados sugerem um aumento da biomassa microbiana e da comunidade ativa ao longo da cronossequência, hipótese corroborada também no estudo conduzido por Sipes *et al.* (2022) no *permafrost* do Ártico.

Mais recentemente, um trabalho de conclusão de curso (LAFORCE, 2019) buscou indicadores microbianos das mudanças climáticas a partir de amostras de solos expostos por duas geleiras da Ilha Rei George com tempo de retração distintos: Geleira Baranowski (aprox. 450 anos de retração) (DUARTE, 2010), e Geleira Collins (aprox. 3500 anos de retração) (HALL, 2007), as mesmas amostras utilizadas no presente estudo. A autora definiu etapas de sucessão em que a comunidade se altera rapidamente para a geleira Baranowski. No entanto, para a geleira Collins, a mudança na comunidade se observa de forma lenta, sem definição de etapas claras na sucessão ecológica microbiana. Quanto aos indicadores microbianos, a autora encontrou que famílias como Bernardetiaceae, Blastocatellaceae, Chroococcidiopsaceae, Deinococcaceae e Phormidiceae apareceram nas amostras de solo a partir de 50m de distância da geleira Baranowski, causando desaparecimento de outros táxons, indicando desequilíbrio na comunidade.

Esses trabalhos empregaram ferramentas moleculares para alcançar seus objetivos, utilizando o sequenciamento do gene rRNA 16S. Os estudos abordam somente a comunidade do ponto de vista taxonômico, e não funcional a partir de dados metagenômicos e reconstrução de MAGs.

Usando a estratégia de metagenômica, Kayani *et al.* (2018) montou nove *bins* a partir de amostras metagenômicas da geleira Matanuska, no Ártico. Todos os *bins* possuíam completude >70% e contaminação <10%, sendo caracterizados, então, de média qualidade. Dentre os *bins*, foi possível definir o gênero de cinco. Além disso, o potencial metabólico dos *bins* também foi analisado quanto a presença ou ausência de genes do metabolismo do carbono, nitrogênio e enxofre. Já o estudo de Xue *et al.* (2020), reconstruiu 56 MAGs de diferentes filos bacterianos, como Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes, obtidos a partir de amostras do *permafrost* de

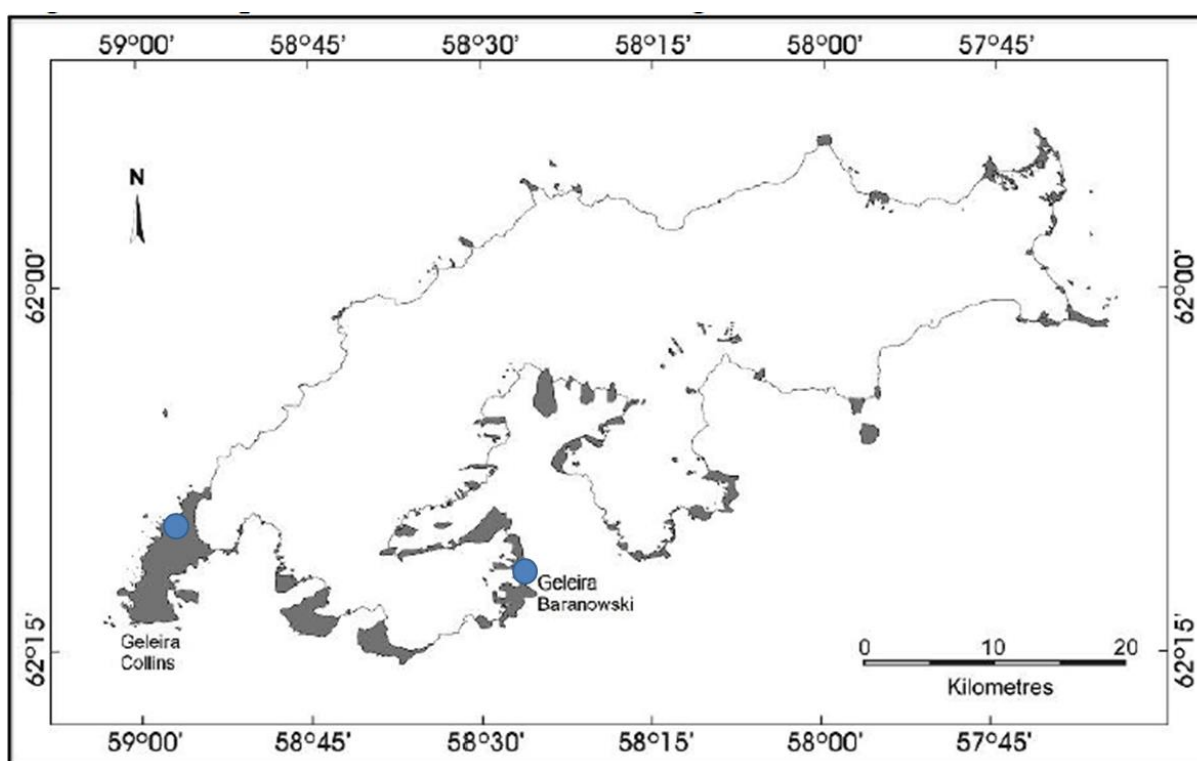
Svalbard, na Noruega. O potencial metabólico dos MAGs foi aferido, analisando genes do metabolismo de carbono, nitrogênio, enxofre e resposta a estresses. Foi encontrada a respiração aeróbia como principal via de produção de energia, alguns genes relacionados a denitrificação e redução de nitrato, além de redução de sulfito. Ortiz *et al.* (2021) obteve sucesso ao reconstruir 101 MAGs de alta qualidade e 350 de média qualidade a partir de amostras de solo associadas à Geleira Mackay, Antártica. Segundo os autores, os táxons dominantes encontrados no estudo se referem a clados nativos e adaptados ao hábitat antártico e compreendem organismos aeróbios e com capacidade de fixar carbono via H_2 e CO .

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de estudo

As amostras estudadas são provenientes de duas geleiras na Ilha Rei George, Ilhas Shetland do Sul, Península Antártica, geleira Collins e geleira Baranowski (Figura 3).

Figura 3. Mapa da Ilha Rei George demarcando as geleiras Collins e Baranowski e a localização aproximada da coleta das amostras utilizadas neste estudo.



Fonte: Laforce (2019), adaptado.

A Geleira Collins, ou Domo Bellingshausen, tem mostrado uma posição estável ou até avançada nos últimos 3500 anos (HALL, 2007). Porém, o estudo mais recente de Simões *et al.* (2015) mostra que o aquecimento regional vem causando retração da geleira, ainda que de forma lenta. Se esse cenário de aquecimento continuar, estima-se que até 2070, a geleira Collins perderá cerca de 35% de sua área total (PETSCH *et al.*, 2020) e, em 2292, desaparecerá completamente (RÜCKAMP *et al.*, 2011). Desde 1985, a geleira Baranowski vem sofrendo uma retração de cerca de 450m (DUARTE, 2010). Esse recuo já foi monitorado em diversos estudos a partir do ano de 1956 (PERONDI, 2018; SZIŁO; BIALIK, 2018).

Estima-se que a Ilha Rei George perdeu cerca de 8,6% de sua cobertura de gelo até 2008 (SIMÕES *et al.*, 1999; RÜCKAMP *et al.*, 2011), sofrendo retração de outras geleiras além destas, como Wanda e Ecology (DA ROSA, 2008).

4.2. Amostragem

Para condução do presente estudo, foram utilizadas amostras provenientes do projeto Microsfera: “A Vida Microbiana na Criosfera Antártica: Mudanças Climáticas e Bioprospecção” (CNPq-PROANTAR #407816/2013-5), coordenado pela profa. Vivian Helena Pellizari, do Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo (USP). Sete amostras foram coletadas pela equipe no solo exposto do recuo da geleira Baranowski na Operação Antártica (OPERANTAR XXXIII) do verão 2014/2015, e sete no solo exposto do recuo da geleira Collins na Operação Antártica (OPERANTAR XXXV) do verão 2014/2015 (Figuras 4 e 5). O solo foi coletado de 0 a 10 cm de profundidade, em triplicata.

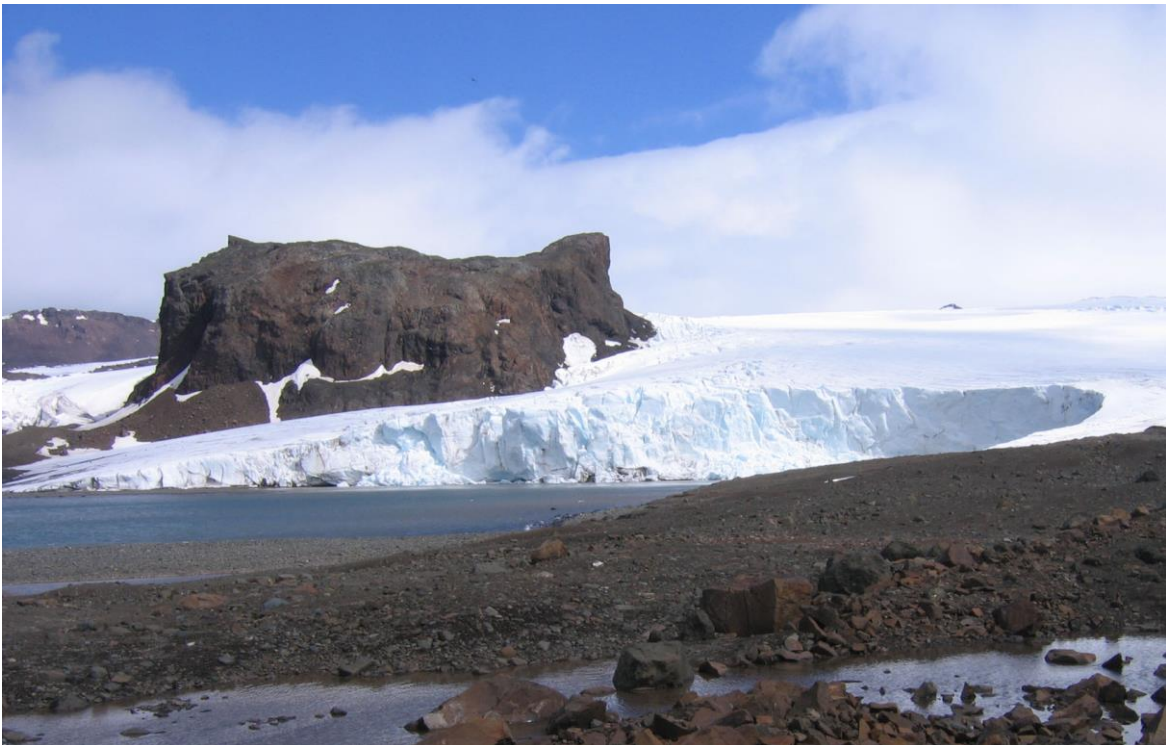
Após a coleta na Ilha Rei George, as 14 amostras antárticas foram armazenadas a -20 °C no Laboratório de Ecologia Molecular e Extremófilos na Universidade Federal de Santa Catarina (LEMEX/UFSC). A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Ecologia Molecular e Extremófilos/Universidade Federal de Santa Catarina, utilizando o *PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBio), sob coordenação do Prof. Rubens Duarte, integrante da equipe do projeto MICROSFERA, seguindo protocolo do fabricante. Após a extração, prosseguiu-se para o sequenciamento com a plataforma *Illumina HiSeq 2500* utilizando sistema *2x100 paired-end*. A empresa Zymo Research (EUA) foi contratada para realização desse serviço. As amostras C200 e B1 não possuíram qualidade e quantidade de DNA suficiente para o sequenciamento, portanto não foram utilizadas no estudo. As amostras e características locais se encontram na Tabela 1. Os dados do sequenciamento se encontram na Tabela 2.

Figura 4. Imagens das geleiras cujas amostras foram utilizadas neste estudo. a. Geleira Collins. b. Baranowski.

a



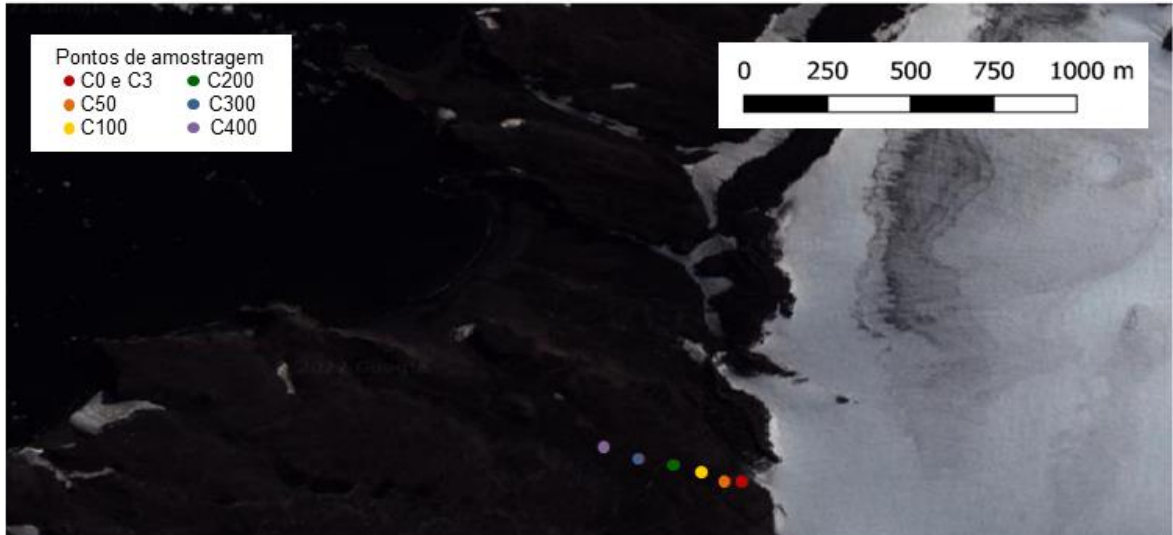
b



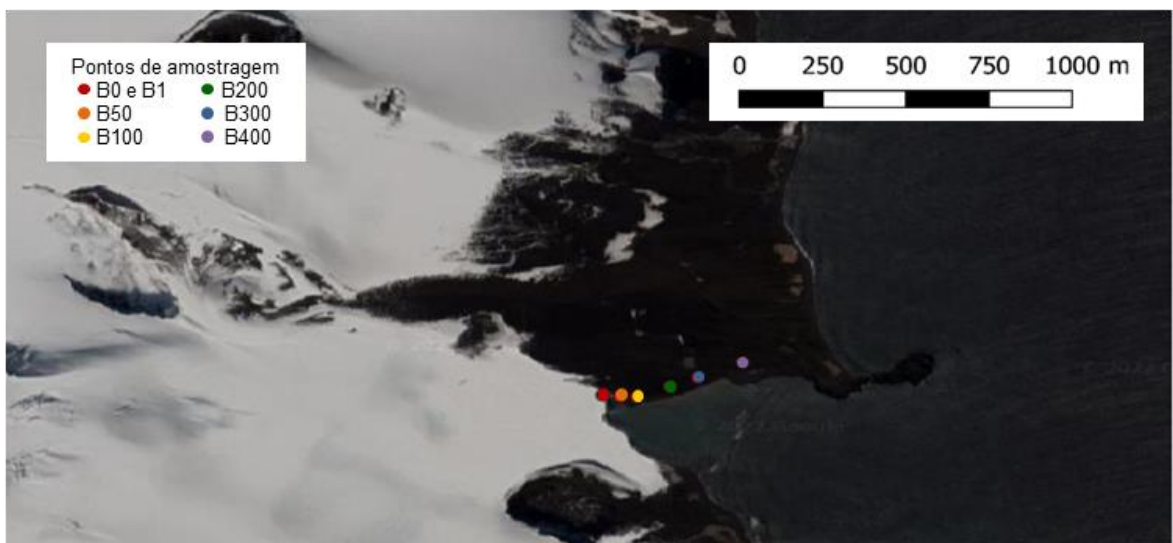
Fonte: Foto original da geleira Collins: Carolina Alves Fernandes, 2017. Foto original da geleira Baranowski: Rubens Duarte, 2008.

Figura 5. Mapa dos pontos de amostragem no solo de recuo de geleiras em a. geleira Collins e b. geleira Baranowski. Os pontos C0 e C3 estão muito próximos para serem distinguíveis no mapa, assim como B0 e B1.

a



b



Fonte: Thales Moreira de Lima, adaptado.

Tabela 1. Lista das amostras e caracterização dos locais de amostragem.

Amostra	Geleira	Distância da geleira (m)	Temperatura do solo (°C)	Coordenadas
C0	Collins	0	0,9	62°9'49.26"S 58°55'22.38"O
C3	Collins	3	5,1	62°9'49.26"S 58°55'22.62"O
C50	Collins	50	2,7	62°9'49.2"S 58°55'25.7"O
C100	Collins	100	3,9	62°9'48.24"S 58°55'30.36"O
C200	Collins	200	4,9	62°9'47.4"S 58°55'35.94"O
C300	Collins	300	3,5	62°9'46.56"S 58°55'42.72"O
C400	Collins	400	4,5	62°9'45.18"S 58°55'49.5"O
B0	Baranowski	0	0,7	62°11'55.6"S 58°26'56.2"O
B1	Baranowski	1	0,7	62°11'55.6"S 58°26'56.1"O
B50	Baranowski	50	7,1	62°11'55.7"S 58°26'52.8"O
B100	Baranowski	100	8,7	62°11'55.7"S 58°26'49.4"O
B200	Baranowski	200	8,4	62°11'54.4"S 58°26'42.8"O
B300	Baranowski	300	9,2	62°11'53.4"S 58°26'37.2"O
B400	Baranowski	400	9,3	62°11'51.7"S 58°26'28.4"O

Fonte: da Autora.

Tabela 2. Dados do sequenciamento das amostras utilizadas no estudo, compreendendo o número total de pares de base e a quantidade de reads.

Amostras	Geleira	Número de pares de base	Número de sequências (reads)
C0	Collins	221.445.397	1.334.174
C3	Collins	204.719.291	1.240.054
C50	Collins	198.424.692	1.178.502
C100	Collins	65.095.245	386.487
C300	Collins	79.581.851	476.765
C400	Collins	281.442.649	1.706.295
B0	Baranowski	312.477.987	1.865.686
B50	Baranowski	389.038.226	2.396.074
B100	Baranowski	240.368.345	1.450.866
B200	Baranowski	207.002.083	1.244.778
B300	Baranowski	207.220.187	1.251.338
B400	Baranowski	340.938.675	2.038.438

Fonte: da Autora.

4.3. Análises físico-químicas

Após a chegada das amostras de solo no Brasil, as análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Análises Ambientais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) da USP. Foram quantificados pH, material orgânico (M.O.), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mn), alumínio (H+Al), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn) e a granulometria (silte, argila e areia). As características, bem como os valores para cada amostra estão nas Tabelas 3 e 4. Esses dados foram utilizados para a análise multivariada.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos das amostras de solo da Geleira Collins.

Parâmetro	Unidade	C0	C3	C50	C100	C300	C400
pH	-	6.1	6.1	6.1	6	5.7	5.6
M.O.	g.dm. ⁻³	5	5	6	4	9	6
P	mg.dm. ⁻³	369	320	340	269	270	257
K	mmolc.dm. ⁻³	11.9	9.9	7.9	6.7	6.6	16.2
Ca	mmolc.dm. ⁻³	197	236	210	153	119	470
Mg	mmolc.dm. ⁻³	101	110	125	136	81	78
H+Al	mmolc.dm. ⁻³	16	15	16	18	18	25
Cu	mg.dm. ⁻³	4.1	4.2	4.6	2.8	4.5	1.6
Fe	mg.dm. ⁻³	67	64	45	67	77	39
Mn	mg.dm. ⁻³	38.7	12.8	10.3	4.4	4	1.7
Zn	mg.dm. ⁻³	0.4	0.3	0.2	0.4	0.6	0.2
Areia	g.kg ⁻¹	786	820	816	712	524	798
Silte	g.kg ⁻¹	162	129	102	236	345	125
Argila	g.kg ⁻¹	52	52	82	52	131	77

Fonte: da Autora

Tabela 4. Parâmetros físico-químicos das amostras de solo da Geleira Baranowski.

Parâmetro	Unidade	B0	B50	B100	B200	B300	B400
pH	-	6.7	6.2	6.5	6.5	6.6	6.5
M.O.	g.dm ⁻³	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5
P	mg.dm ⁻³	470	284	338	287	277	487
K	mmolc.dm ⁻³	8.9	2.5	1.9	2.6	2.4	4.7
Ca	mmolc.dm ⁻³	477	509	701	522	500	559
Mg	mmolc.dm ⁻³	40	29	31	42	25	43
H+Al	mmolc.dm ⁻³	10	9	9	10	9	11
Cu	mg.dm ⁻³	4.8	4.5	3.1	4.7	3.6	5.2
Fe	mg.dm ⁻³	7	6	5	12	10	11
Mn	mg.dm ⁻³	13.6	5.2	4.5	5.8	5.6	5
Zn	mg.dm ⁻³	0.1	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2
Areia	g.kg ⁻¹	764	574	496	489	488	770
Silte	g.kg ⁻¹	132	271	295	330	308	128
Argila	g.kg ⁻¹	103	155	209	181	205	102

Fonte: da Autora

4.4. Bioinformática

4.4.1. Anotação taxonômica dos reads

Os *reads* foram processados no programa Kaiju v1.7.3 (MENZEL; NG; KROGH, 2016) com as especificações padrão na plataforma KBase (ARKIN *et al.*, 2018) (<https://kbase.us/>). O programa classifica taxonomicamente *reads* provenientes de sequenciamento metagenômico. Kaiju usa como base bancos de dados de proteínas microbianas e virais e, por isso, é mais sensível do que outras ferramentas que performam a mesma tarefa, segundo seus criadores.

4.4.2. Diversidade microbiana

Para as análises de diversidade a partir dos *reads* metagenômicos, foi utilizado um *software* de perfilamento taxonômico denominado mOTU *profiler* v.3.0.2 (RUSCHEWEYH *et al.*, 2021), que classifica os *reads* em unidades taxonômicas operacionais (OTU, do inglês “*operational taxonomic unit*”) metagenômicas. O comando usado foi `motus profiler` para gerar o perfilamento das amostras e, para uni-los, `motus merge`.

Para processar e analisar a tabela de *output* do mOTU *profiler*, foi usado o RStudio v.2022.02.3 com R v.4.2.0 (TEAM, 2013) e os pacotes *phyloseq*, *ggplot2*,

janitor, *dplyr*, *tibble*, *vegan*, *viridis*, *lattice*, *devtools*, *matrixStats* e *reshape2*, tanto para a curva de rarefação quanto para calcular a diversidade. Os índices de diversidade selecionados para alfa diversidade foram Shannon, Simpson, Riqueza (*richness*) e Equitabilidade de Pielou (*eveness*). Para verificar se houve diferenças significativas entre as duas geleiras, foi realizado o teste Análise de Variância (ANOVA) para Shannon e Simpson. Já o índice de beta diversidade selecionado foi Bray-Curtis.

4.4.2.1. Análise multivariada

Com a finalidade de relacionar os dados físico-químicos com a beta diversidade, foi montado um gráfico de nMDS. Para gerá-lo, foi utilizado o *output* do *mOTU profiler* e os dados físico-químicos no R, utilizando os pacotes *readr* e *vegan* para a avaliar a dissimilaridade das amostras via Bray-Curtis e interferência de M.O., P, K, Ca, Mg, H+Al, Cu, Fe, Mn e Zn.

4.4.3. Reconstrução de MAGs

Para montar os MAGs, foram realizadas três abordagens: *co-assembly* por geleira, *co-assembly* com todas as amostras e *assembly* (com as amostras separadamente). Na primeira, um banco de *contigs* para cada geleira foi montado. Na segunda abordagem, os *contigs* foram montados a partir da combinação de todas as amostras. A terceira envolveu criar um banco de *contigs* específico para cada amostra.

O primeiro passo foi a filtragem por qualidade dos *reads*. O sequenciamento *paired-end* resultou em arquivos R1 e R2 de cada amostra, que foram processadas pelo seguinte comando: *iu-filter-quality-minoche* no ambiente Linux. Essa etapa deve ser feita porque, apesar da alta tecnologia empregada nos processos de sequenciamento, eles não estão isentos de erros. Falhas na extração de DNA, PCR e até mesmo durante o sequenciamento em si são comuns, e podem comprometer o seguimento das análises se não identificados a tempo. Esses erros podem ser criação de sequências quiméricas, inserções e deleções de nucleotídeos e variação do tamanho dos *reads* (DICKIE, 2010; LAEHNEMANN; BORKHARDT; MCHARDY, 2016).

4.4.3.1. Co-assembly por geleira

Todo o fluxo de trabalho do *co-assembly* foi realizado a partir do *pipeline* do *anvi'o* v7 (<https://merenlab.org/tutorials/assembly-based-metagenomics/>, acessado pela última vez em 27/07/2022), criado por Eren *et al.*, 2015.

Após a filtragem dos *reads*, o programa MEGAHIT v1.2.9 (LI *et al.*, 2015) foi utilizado para realizar o *co-assembly de novo*. O comando reuniu todos os *contigs* montados no arquivo *contigs.fa* e descartou aqueles com menos de 1000 pb. O mapeamento de *reads* foi realizado com o programa Bowtie2 v2.3.4.1 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012), alinhando *reads* com os *contigs* montados a partir do comando *bowtie2-build*. Ao final desta etapa, foram gerados arquivos *.sam*, *.bam*, *.bt2*, *.bam.bai*, além do arquivo *.fastq* original para cada amostra.

O banco de dados de *contigs* foi criado a partir do comando *anvi-gen-contigs-database* e analisado por *anvi-display-contigs-stats*. O banco de dados reúne todas as informações a respeito dos *contigs*, como frequências *k-mer*, posições de ORFs, anotação funcional e taxonômica de genes, entre outros.

O próximo passo foi a criação de perfis (*profile*) pelo comando *anvi-profile*. Cada arquivo *.bam* originado na etapa de mapeamento foi processado e ligado ao banco de dados de *contigs*. Além disso, os *contigs* com menos de 2500 pb foram descartados. Após o perfilamento, foi feita a junção de todos os perfis com o comando *anvi-merge* e, depois, *anvi-cluster-contigs*. Este comando utiliza o CONCOCT v1.1.0 (ALNEBERG *et al.*, 2014), um programa que agrupa *contigs* em genomas, ou seja, realizando o *binning*.

O próximo passo foi refinar os *bins* manualmente a partir da interface gráfica do *anvi'o* com o comando *anvi-refine*. O comando *anvi-summarize* foi utilizado para visualizar as características dos *bins* que, depois de refinados e selecionados, já podem ser considerados MAGs (se a qualidade for média ou alta). A partir deste comando, foi possível conferir completude, redundância, taxonomia, bem como a porcentagem de recrutamento dos *reads* que formaram cada MAG. O processamento dos MAGs foi realizado pelo comando *anvi-rename-bins*, que renomeou os MAGs e descartou aqueles com completude abaixo de 30% e redundância acima de 10%.

Para uma classificação taxonômica mais robusta, foi utilizada a ferramenta GTDB-Tk v2.0.0 (CHAUMEIL *et al.*, 2020) a partir do comando *gtdbtk*

`classify_wf`. E para índices mais confiáveis de completude e contaminação foi usada a ferramenta CheckM v1.2.0 (PARKS *et al.*, 2015) pelo comando `checkm lineage`.

4.4.3.1.1. Anotação funcional

A busca por genes de interesse começou a partir de uma revisão de estudos de metagenoma de *permafrost*, geleiras e solos antárticos, árticos e alpinos. A partir daí, montou-se um banco de dados com os genes de interesse para serem buscados nos MAGs selecionados com maior qualidade. Eles foram divididos em nove categorias: genes do ciclo do carbono, ciclo do nitrogênio, ciclo do enxofre, degradação (de carboidratos complexos e compostos), reparo de DNA, resposta à estresse, choque térmico, resistência a antibióticos e transferência horizontal.

Os softwares e ferramentas utilizados para anotação funcional foram DRAM (SHAFFER *et al.*, 2020), Rast Server (AZIZ *et al.*, 2008), Patric (DAVIS *et al.*, 2020), FAMA (KAZAKOV; NOVICHKOV, 2019) e Kegg/GHOSTKOALA (KANEHISA; SATO; MORISHIMA, 2016). DRAM é um *software* que utiliza linha de comando no Linux, `DRAM.py annotate`. O comando gera arquivos como lista de genes e mapas de calor de vias metabólicas selecionadas. Rast e Patric são ferramentas *online* em que é possível fazer o *upload* das sequências de DNA de interesse e obter, como *output*, uma lista de genes correspondentes à sequência inicial. O FAMA é um *software* ainda em fase de testes presente no KBase, que traz um perfil funcional focado nos genes do ciclo do nitrogênio. O GhostKoala também é uma ferramenta *online* que resulta em uma análise completa da presença de vias metabólicas em um genoma usando como referência o banco de dados KEGG. Todas as ferramentas foram utilizadas para a confirmação das funções anotadas.

4.4.3.2. Co-assembly

O mesmo *pipeline* do *anvi'o* v7 foi utilizado para a montagem de *contigs* a partir das 12 amostras conjuntamente a partir do *co-assembly*. Os MAGs e *bins* foram montados e também submetidos ao GTDB-tk v2.0.0 e ao CheckM v1.2.0.

4.4.3.3. Assembly

O *anvi'o* é uma ferramenta que apenas produz resultados de *co-assembly*, de forma que o *assembly* foi realizado a partir de outros programas. Então, utilizou-se a plataforma *online* KBase. Para a montagem dos *contigs* para cada amostra

individualmente, e posterior montagem de genomas, os aplicativos selecionados foram montadores de *contigs*, *binning*, de extração de bins, otimizador de *bins*, avaliadores de qualidade e de taxonomia.

Foram testados dois montadores de *contigs*, Megahit (o mesmo usado nas análises de *co-assembly* no *anvi'o*) v1.2.9 e metaSPAdes v3.15.3. (Nurk *et al.*, 2017) com o parâmetro “menor tamanho de *contig*” 2000 pb. Os outros parâmetros eram padrão dos dois montadores. MetaSPAdes retornou com *assemblies* com grande número de *mismatches*, então o montador foi descartado.

Para o *binning*, foram testados também dois aplicativos: CONCOCT (o mesmo usado nas análises de *co-assembly* no *anvi'o*) v1.1 e MaxBin2 v2.2.4 (WU; SIMMONS; SINGER, 2016). O parâmetro de “tamanho mínimo de *contig*” foi de 2000 pb e, no MaxBin2, também selecionou-se os marcadores de Bacteria e Archaea. Os outros parâmetros foram padrão dos montadores. No caso do *binning*, o CONCOCT retornou com muitos *bins*, sendo a maioria de baixa qualidade, depois de testados no CheckM v1.0.18. O otimizador DASTool v1.1.2 (SIEBER *et al.*, 2018) foi acionado para combinar os esforços dos dois montadores para resultar em binings de maior qualidade. No entanto, o aplicativo não conseguiu realizar sua tarefa. Portanto, os MAGs com melhor qualidade selecionados foram reconstruídos com o auxílio dos programas Megahit e MaxBin2, que também passaram pelos aplicativos CheckM v1.0.18 e GTDB-Tk v1.1.0. Os MAGs com completude acima de 30% foram selecionados para uma classificação e análise de qualidade mais robusta no ambiente Linux, utilizando os mesmo programas, mas em versões mais atualizadas do que as presentes no KBase, GTDB-tk v2.0.0 e CheckM v1.2.0.

4.4.4. Pangenômica e filogenômica

Os genomas selecionados para o estudo do pangenoma vieram do *co-assembly* por geleira: um genoma bacteriano (BAR_MAG_00002) da geleira Baranowski e um de arqueia (COL_MAG_00001) da geleira Collins. Esses MAGs foram escolhidos por serem de alta qualidade e serem de táxons de importância ecológica. Os genomas de referência para comparação foram selecionados a partir do banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), observando o local de coleta do genoma em questão e buscando selecionar origens tanto antárticas quanto de outros locais.

BAR_MAG_00002 foi classificada taxonomicamente como *Rhodococcus* e o gênero é de interesse biotecnológico por conta de sua alta capacidade de degradação de diversos compostos tóxicos. Foram selecionados cinco genomas de cromossomos do banco de dados com os seguintes *accession number*: CP034152 (*Rhodococcus* sp. NJ-530, isolado de gelo marinho próximo à Estação Antártica Chinesa Zhongshan, em Larsemann Hills, Antártica Leste); CP010797 (*Rhodococcus* sp. B7740, isolado de gelo marinho ártico); CP024890 (*Rhodococcus ruber*, isolado de lodo ativado de resíduo farmacêutico em Shaoxing, China); CP050124 (*Rhodococcus erythropolis*, isolado de solo contaminado com petróleo em Gansu, China); e CP070609 (*Rhodococcus koreensis*, isolado da rizosfera de *plantlets* de maçã, Alemanha).

COL_MAG_00001 foi classificada como pertencente à família Nitrososphaeraceae, a qual engloba arqueias oxidadoras de amônia que possuem um papel importante no ciclo global de nitrogênio. Os *accession number* dos genomas selecionados para o estudo de pangenoma foram: CP007536 (*Nitrososphaera viennensis*, isolado de solo de jardim na Áustria); CP012850 (*Candidatus Nitrosocosmicus oleophilus*, isolado de sedimento contaminado por hidrocarbonetos, em Nova Iorque); CP017922 (*Candidatus Nitrosocosmicus hydrocola*, isolado de sistema de tratamento de esgoto, no Canadá); CP007174 (*Candidatus Nitrososphaera evergladensis*, sequenciado a partir de uma cultura de enriquecimento de solo proveniente do *Everglades Agricultural Area*, Flórida, EUA); e CP002408 (*Candidatus Nitrososphaera gargensis*, sequenciado a partir de uma cultura de enriquecimento).

A árvore filogenética referente a cada grupo de genomas foi montada no KBase, pelo aplicativo Insert Genome Into SpeciesTree v2.2.0. A justificativa da geração das árvores filogenéticas é entender a distância filogenética entre as espécies utilizadas na análise de pangenoma e confirmar a proximidade evolutiva do BAR_MAG_00002 e outras linhagens do gênero *Rhodococcus*, e o COL_MAG_00001 e outras linhagens da família Nitrososphaeraceae.

A análise foi realizada a partir do pipeline do *anvi'o* para pangenomics (<https://merenlab.org/2016/11/08/pangenomics-v2/>, acessado pela última vez em 27/05/2022) também no *anvi'o* v7. No ambiente Linux, foi utilizado o comando `anvi-gen-genomes-storage` para armazenar os genomas selecionados para o pangenoma e, depois `anvi-pan-genome` para realizar a análise. Para a

visualização no navegador a partir da interface operável manualmente, o comando foi `anvi-display-pan`.

A identidade de nucleotídeo média (ANI, do inglês “*average nucleotide identity*”) foi calculada para compreender a distância evolutiva entre os MAGs e cada genoma correspondente do banco de dados. Esse valor é obtido a partir de similaridades das sequências conservadas de dois genomas, com o auxílio de genes marcadores (GORIS *et al.*, 2007; ARAHAL, 2014). Apesar de ANI não possuir um valor fixo que delimite gênero ou classe (QIN *et al.*, 2014), pois a identidade média varia de táxon para táxon, ANI de 95% ou superior é o suficiente para definir organismos de uma mesma espécie (RODRIGUEZ-R; KONSTANTINIDIS, 2014). Da mesma forma, a identidade de aminoácido média (AAI, do inglês “*average aminoacid identity*”) compara a sequência de aminoácidos e é mais utilizada para organismos mais distantes entre si, uma vez que as proteínas podem se manter mais conservadas do que a sequência nucleotídica (RODRIGUEZ-R; KONSTANTINIDIS, 2014). ANI e AAI foram determinadas pelas calculadoras presentes no [site `http://enve-omics.ce.gatech.edu/`](http://enve-omics.ce.gatech.edu/) (acessado pela última vez em 27/07/2022).

Já a hibridização DNA–DNA (DDH, do inglês “*DNA–DNA hybridization*”) é uma forma de comparar o conteúdo GC% de duas sequências e definir se são de uma mesma espécie ou não. Micro-organismos da mesma espécie têm o conteúdo GC% de cerca de 99% similar (MEIER-KOLTHOFF; KLENK; GÖKER, 2014). O DDH foi estimado com a ferramenta online do [site `https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php`](https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php) (acessado pela última vez em 27/07/2022).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Anotação taxonômica dos *reads*

A grande maioria dos *reads* (entre 60% e 40%) não obteve correspondência com sequências presentes no bancos de dados. Isso está representado na parte superior de cada gráfico, em que a porcentagem de *reads* classificada variou de 40% a 60%, dependendo da amostra. Mesmo que uma parcela dos *reads* não tenha sido classificada, é possível traçar um perfil filogenético característico para as duas geleiras.

A presença de vírus foi detectada em todas as amostras. Para analisar esse grupo mais a fundo, seria necessário o uso de softwares específicos para vírus. Apesar de pouco estudados na Antártica, os vírus são de extrema importância para as funções ecossistêmicas (mediando transferência horizontal genética) e estruturação das comunidades microbianas (controlando o crescimento populacional de bactérias) (PEARCE; WILSON, 2003; LÓPEZ-BUENO *et al.*, 2009). Além dos bacteriófagos, também são encontrados vírus que afetam plantas, animais (por exemplo, pinguins e focas), bem como humanos (PEARCE; WILSON, 2003; HOPKINS; SWANSON; TALIANIKSY, 2014).

Em relação aos filos do domínio Bacteria, houve predominância de Bacteroidota (novo nome do filo Bacteroidetes, segundo Oren e Garrity (2021)), Proteobacteria, Actinobacteria, Cyanobacteria e Firmicutes, para as amostras das duas geleiras. Além disso, houve um aumento no número de táxons na composição da comunidade ao longo da progressão da cronossequência.

Em ambas as geleiras também foram encontrados organismos do domínio Archaea, porém, a baixíssima abundância na geleira Baranowski não permitiu a visualização na figura. Na geleira Collins, os representantes do domínio Archaea com maior predominância eram dos filos Thaumarchaeota e Euryarchaeota nas amostras expostas há mais tempo, C300 e C400 (Figura 5). A nível de gênero, *Nitrososphaera* chama atenção por oxidar amônia, atuando ativamente no ciclo do nitrogênio. O domínio Archaea, em geral, não possui alta diversidade em solos áridos e polares (POINTING *et al.*, 2009; COWAN, 2014).

Observando a abundância relativa dos táxons na Geleira Collins, não há uma mudança significativa na comunidade ao longo da cronossequência, possivelmente por causa de sua lenta retração (SIMOES *et al.*, 2015), o que torna o solo mais

homogêneo e sem etapas distinguíveis de sucessão ecológica microbiana. A amostra que mais destoa em relação ao resto do transecto é C300, provavelmente por causa da baixa contagem de *reads* total na amostra.

Sobre a geleira Baranowski, houve um aumento na abundância relativa de Bacteroidota e diminuição na abundância de Proteobacteria e Actinobacteriota ao longo do transecto. Esta análise corrobora os resultados encontrados por Laforce (2019), que demonstra clara mudança na comunidade ao longo do transecto da geleira Baranowski. A autora relata cinco estágios de sucessão ecológica na cronosequência da geleira, no entanto, a amostra B1, presente no referido trabalho, não foi utilizada aqui devido à baixa quantidade de DNA ambiental para realização do metagenoma *shotgun*, portanto, só é possível definir quatro estágios de sucessão. O primeiro estágio refere-se a B0; o segundo estágio, a B50; o terceiro estágio, a B100 e B200; e o quarto estágio, a B300 e B400.

O filo Bacteroidota é conhecido por viver em solos mais antigos e por degradar polímeros complexos, o que indica sua função como decompositor em áreas mais ricas em nutrientes (AISLABIE *et al.*, 2013; MATEOS-RIVERA *et al.*, 2016), enquanto Proteobacteria e Actinobacteria são táxons presentes em praticamente todos os tipos de solo. O filo Actinobacteriota ainda é conhecido por habitar ambientes gelados e com pouca oferta de nutrientes (ZHANG *et al.*, 2015; MATEOS-RIVERA *et al.*, 2016).

O filo Cyanobacteria foi encontrado a partir de 50m do transecto da geleira Baranowski, aumentando sua abundância relativa a 100m e 200m, e diminuindo novamente a partir de 300m de distância da geleira. Esses resultados estão de acordo com Nemergut *et al.* (2007), Bardgett *et al.* (2007) e Mateos-Rivera *et al.* (2016), na hipótese de que, no início da cronosequência, há presença de organismos heterotróficos que se utilizam do carbono retido no solo logo após o derretimento da geleira; nas etapas intermediárias Cyanobacteria fixa carbono e nitrogênio para a comunidade que se estabelecerá nas próximas etapas; nas etapas finais de sucessão, a complexidade da comunidade microbiana e surgimento de plantas gera competição, causando declínio de Cyanobacteria. Esse comportamento da comunidade não ocorre no transecto da geleira Collins, em que se encontra Cyanobacteria em todas as amostras com abundância similar. Cianobactérias antárticas possuem adaptações para as condições extremas, formando biofilme e

colaborando para a fixação de carbono e nitrogênio no ecossistema (PANDEY et al., 2004; VELICHKO et al., 2021).

O filo Firmicutes já foi registrado em habitats gelados e, uma vez que esse táxon é conhecido por suas bactérias formadoras de esporos, acredita-se que esse recurso as auxilie a suportar as condições antárticas (GUPTA *et al.*, 2015; RAMOS *et al.*, 2019). Os organismos do filo Acidobacteria, em geral, dependem do pH relativamente baixo e da oligotrofia (MÄNNISTÖ; TIROLA; HÄGGBLÖM, 2007), no entanto, existem espécies mesofílicas que podem explicar sua presença em todo o transecto, ainda que em baixa abundância. Já os filos Verrucomicrobiota (novo nome do filo Verrucomicrobia, segundo Whitman *et al.* (2018) e Gemmatimonadota (novo nome do filo Gemmatimonadetes, segundo Whitman *et al.* (2018) são comuns em solos e considerados cosmopolitas, além de já terem sido encontrados em estudos na Antártica (BAJERSKI; WAGNER, 2013; GANZERT; BAJERSKI; WAGNER, 2014; PESSI *et al.*, 2015).

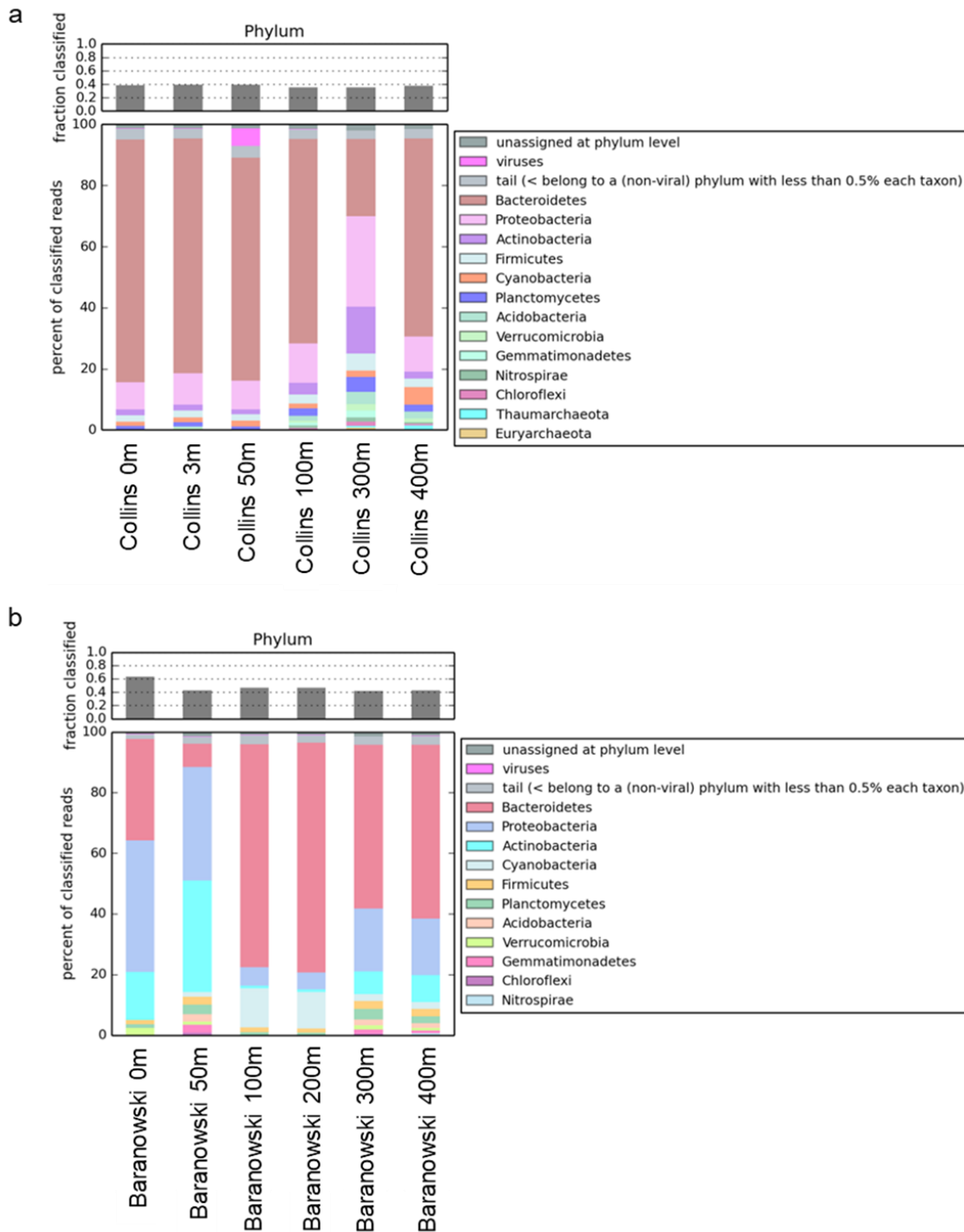
Quanto aos níveis taxonômicos mais específicos, foram encontradas comunidades com pouca variação na abundância e composição taxonômica nas amostras da geleira Collins, sendo as classes mais presentes Chitinophagia, Flavobacteriia, Cytophagia e Sphingobacteriia (Figura 6). As classes do domínio Archaea estavam em baixa predominância. Já na geleira Baranowski, houve um aumento na abundância relativa da classe Chitinophagia e Cytophagia ao longo do transecto, e diminuição na abundância de Flavobacteriia, Actinobacteriota, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria.

O mesmo padrão para as geleiras pode ser observado a nível de ordem (Figura 7). As ordens mais presentes ao longo de todo o transecto da geleira Collins foram Chitinophagales, Flavobacteriales, Cytophagales e Sphingobacteriales. Já na geleira Baranowski, há uma mudança na comunidade de B0, em que se encontrava uma abundância relativa maior de Flavobacteriales, para as comunidades B100, B200, B300 e B400, em que a ordem mais abundante se tornou Chitinophagales.

Os organismos da família Chitinophagaceae, como os gêneros *Flavisolibacter* e *Panacibacter*, e da família Flavobacteraceae, como o gênero *Flavobacterium*, foram os mais abundantes tanto na geleira Collins quanto na geleira Baranowski (Figura 8). Chitinophagaceae já foi documentada na Antártica, mais especificamente em solos de recuo de geleiras e, por causa da sua capacidade de degradação de carboidratos complexos, acredita-se que influencia no pH do solo (PERSHINA *et al.*,

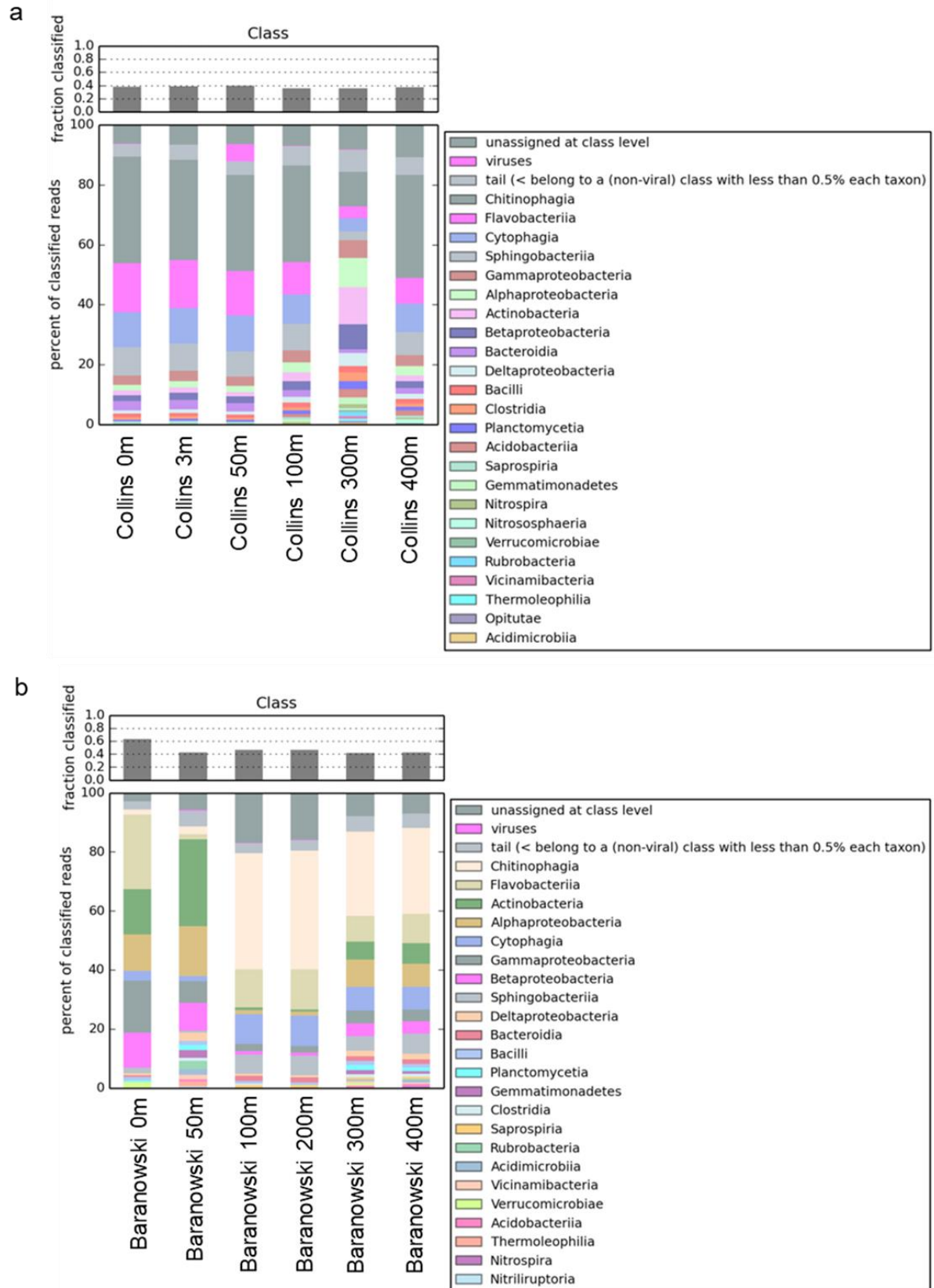
2018; KRAUZE *et al.*, 2021). Muitas espécies de *Flavobacterium* psicrófilicas já foram isoladas da Antártica, algumas das quais possuem poder de degradação de biomoléculas como celulose e quitina (BOWMAN, 2006).

Figura 6. Classificação taxonômica dos *reads* metagenômicos a nível de filo das amostras a. da geleira Collins e b. da geleira Baranowski.



Fonte: da Autora.

Figura 7. Classificação taxonômica dos *reads* metagenômicos a nível de classe das amostras a. da geleira Collins e b. da geleira Baranowski.



Fonte: da Autora.

Figura 8. Classificação taxonômica dos *reads* metagenômicos a nível de ordem das amostras a. da geleira Collins e b. da geleira Baranowski.

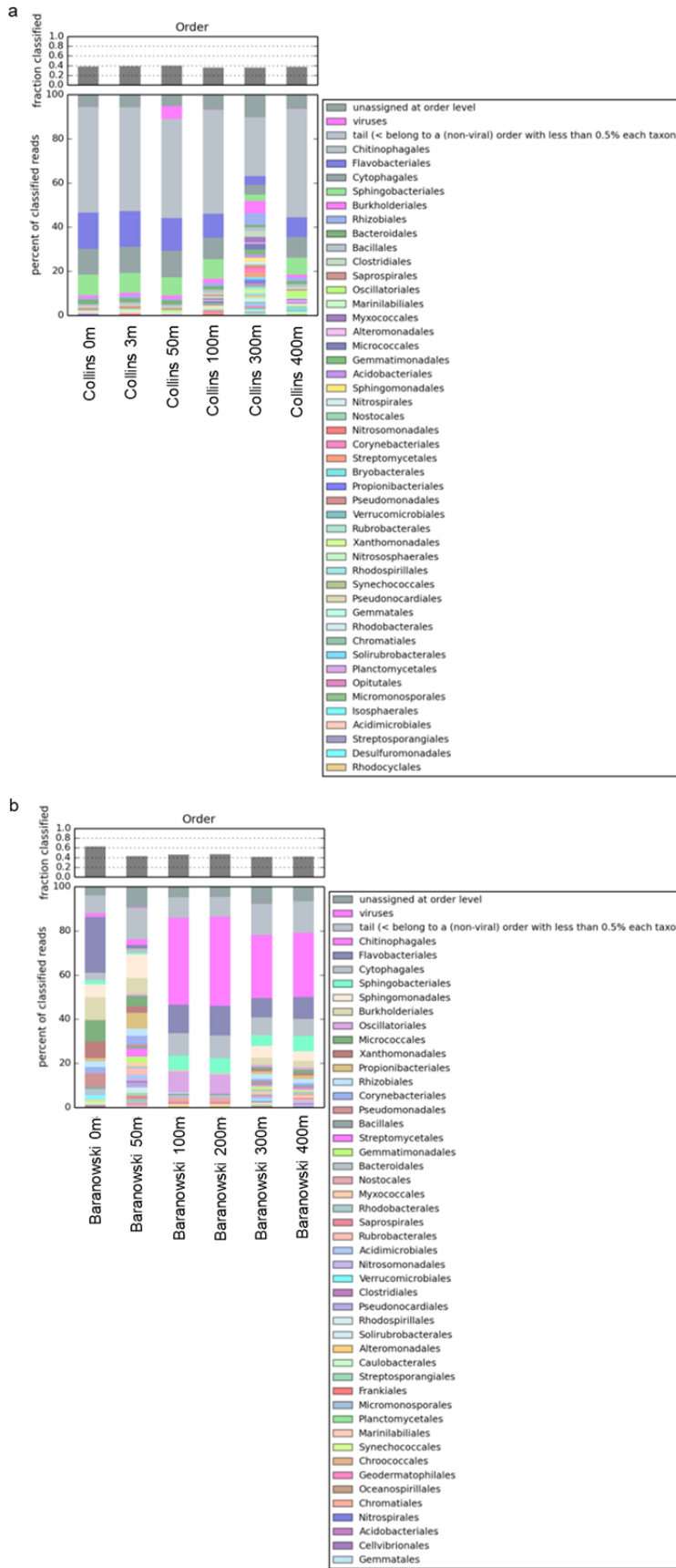
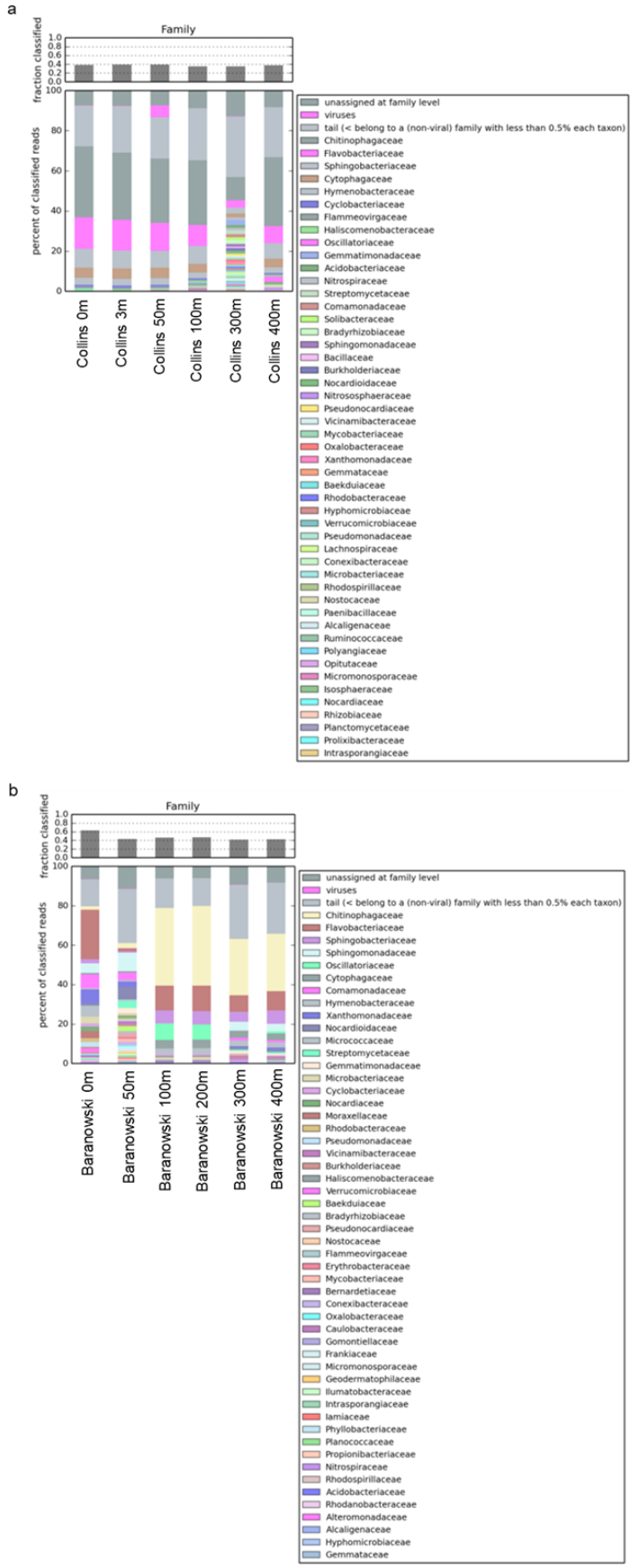


Figura 9. Classificação taxonômica dos reads metagenômicos a nível de família das amostras a. da geleira Collins e b. da geleira Baranowski.

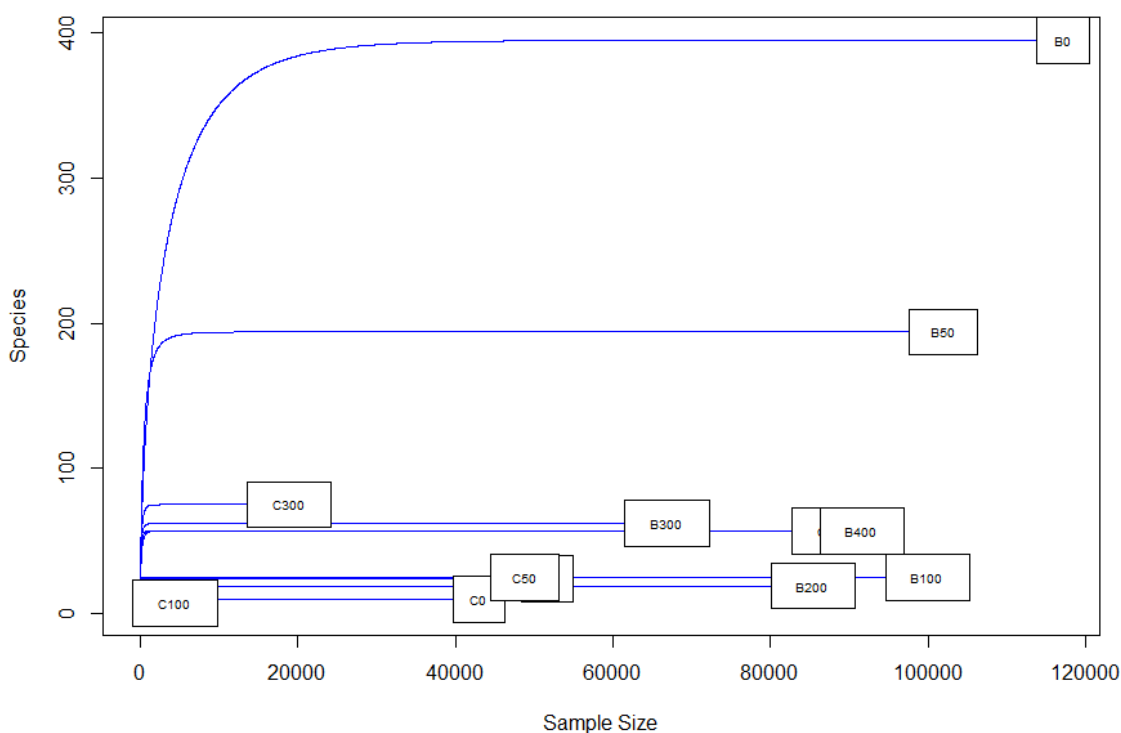


Fonte: da Autora.

5.2. Diversidade microbiana e influência dos fatores ambientais

A curva de rarefação para as amostras das geleiras Collins e Baranowski (Figura 9) evidencia um esforço amostral suficiente para todas as amostras, que atingiram o platô, apenas com exceção da amostra C100, logo, os resultados de alfa e beta diversidade para essa amostra podem estar enviesados.

Figura 10. Curva de rarefação para as amostras das geleiras Collins e Baranowski. O eixo X explicita a quantidade de espécies e, o eixo Y, o tamanho da amostra.



Fonte: da Autora.

A análise de diversidade com os valores de Shannon, Simpson, Equitabilidade de Pielou (*evenness*) e Riqueza (*richness*) estão na Tabela 5, com visualização gráfica na Figura 10.

Para a geleira Collins, as amostras com maior riqueza e diversidade de Shannon foram as do final do transecto, C300 e C400. Por outro lado, a abundância dos táxons não se mostrou bem distribuída, de forma que a equitabilidade foi baixa. Para o índice de Simpson, não houve grande variação entre as amostras. Nas amostras da geleira Baranowski, a diversidade de Shannon e Simpson foram altas no início da sucessão ecológica para as amostras B0 e B50, diminuíram nas etapas

intermediárias, B200 e B300, e voltaram a aumentar no final do transecto, B300 e B400 (como descrito por Duarte (2010)). A maior riqueza se concentrou também no início do transecto, porém, com menor equitabilidade. A abundância relativa mais homogênea se encontra no final do transecto, indicando que a comunidade não tem muitos táxons dominantes, logo, pode ser considerada estável (DOAK *et al.*, 1998; HILLEBRAND; BENNETT; CADOTTE, 2008).

Hillebrand, Bennett e Cadotte (2008) escrevem que as atividades antrópicas moldam e modificam as comunidades animais e vegetais, em geral diminuindo equitabilidade, especialmente quando leva-se em consideração surgimento de espécies exóticas e extinção de espécies raras. Os autores não comentam sobre as comunidades microbianas, que parecem seguir padrões mais complexos. Outros estudos sugerem que uma equitabilidade alta, sem muitas espécies no extremo, ou seja, muito abundantes ou muito raras, podem responder melhor a mudanças ambientais (CHAPIN III *et al.*, 2000; Wittebolle *et al.*, 2009; ROHR *et al.*, 2016).

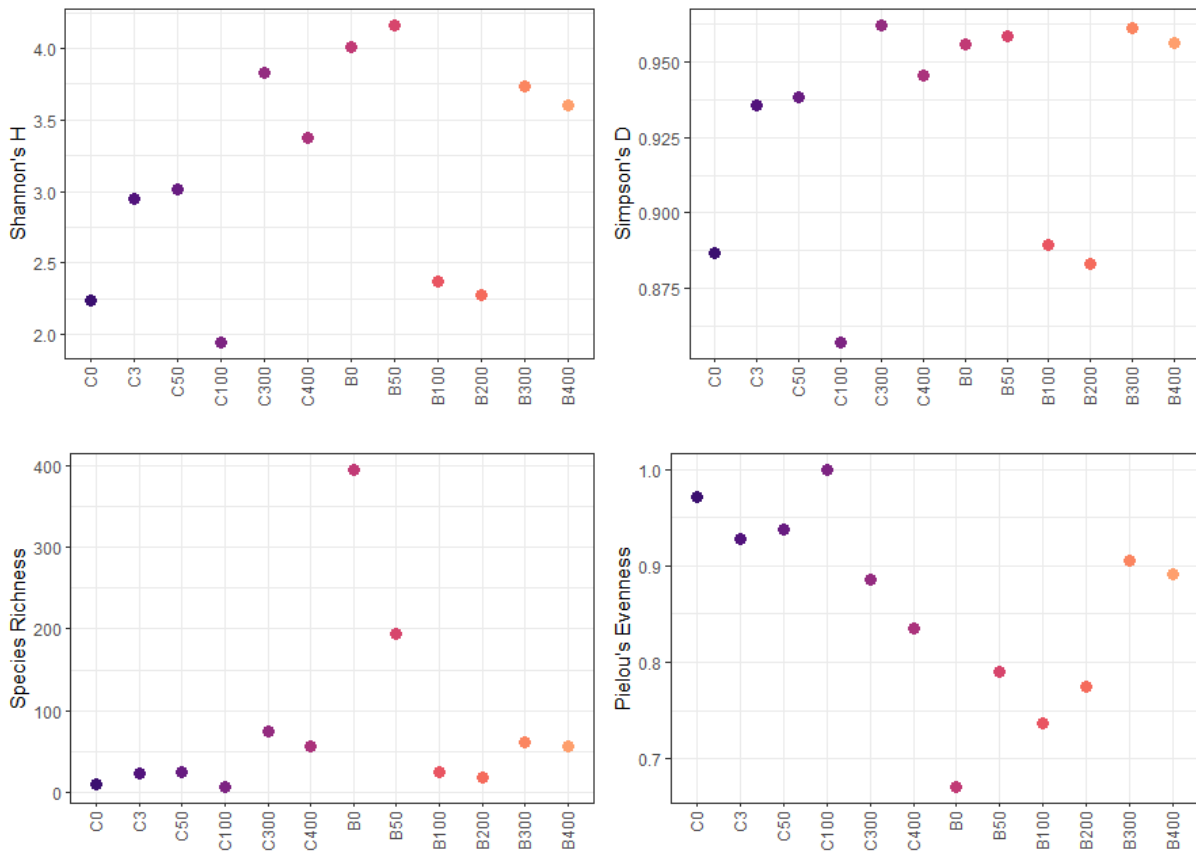
Esses resultados não corroboram com os dados encontrados por Laforce (2019), que encontrou uma diminuição da diversidade ao longo da sucessão da geleira Collins e obteve valores dos índices de Shannon maiores para Collins do que para Baranowski. Isso pode ter acontecido devido ao método utilizado, uma vez que o sequenciamento *shotgun* pode recuperar mais organismos, já que não depende de *primers*, como o sequenciamento do RNAr 16S.

Tabela 5. Valores dos parâmetros de alfa diversidade (Shannon, Simpson, Richness e Pielou's Evenness).

Amostra	Shannon	Simpson	Richness	Pielou's Evenness
C0	2,235362	0,8866742	10	0,9708054
C3	2,947008	0,935708	24	0,9272995
C50	3,017732	0,9385073	25	0,9375111
C100	1,94591	0,8571429	7	1,000000
C300	3,825316	0,9622767	75	0,8860049
C400	3,378304	0,945612	57	0,8355827
B0	4,010626	0,9558656	395	0,6707983
B50	4,164806	0,9585923	194	0,7906072
B100	2,371927	0,8894961	25	0,7368805
B200	2,280643	0,883268	19	0,7745596
B300	3,734945	0,9611473	62	0,904973
B400	3,600604	0,9562399	57	0,890566

Fonte: da Autora

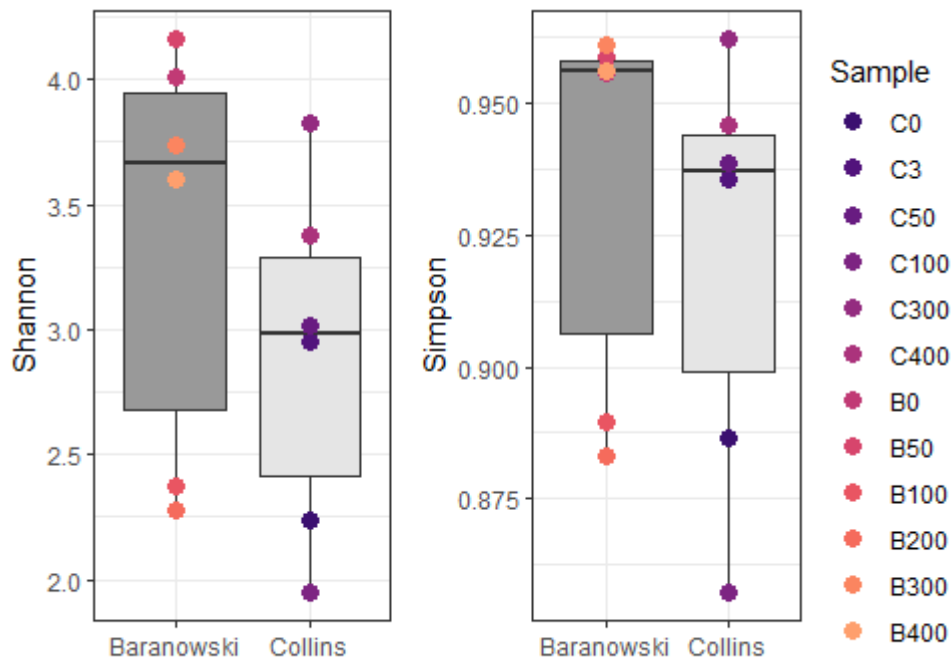
Figura 11. Visualização em gráfico dos valores de alfa diversidade (Shannon, Simpson, Richness e Pielou's Evenness).



Fonte: da Autora.

O teste ANOVA realizado para comparação dos índices de Shannon e Simpson entre as geleiras não gerou resultados significativos (Figura 11). Portanto, não é possível determinar com confiança que uma geleira possui comunidades mais diversas que a outra. Os valores de p tanto para os índices de Shannon quanto para Simpson ficaram acima do proposto para o teste ($p < 0,05$ para dados significativos): Shannon com $p = 0,314$ e Simpson com $p = 0,57$.

Figura 12. Gráfico do teste ANOVA realizado para comparação de alfa diversidade (índices de Shannon e Simpson) entre as geleiras. As diferenças entre as geleiras não são significativas.



Fonte: da Autora

Para beta diversidade, o índice de dissimilaridade Bray-Curtis está representado na Tabela 6. O nMDS com representação gráfica dos valores de Bray-Curtis e os parâmetros ambientais está na Figura 12.

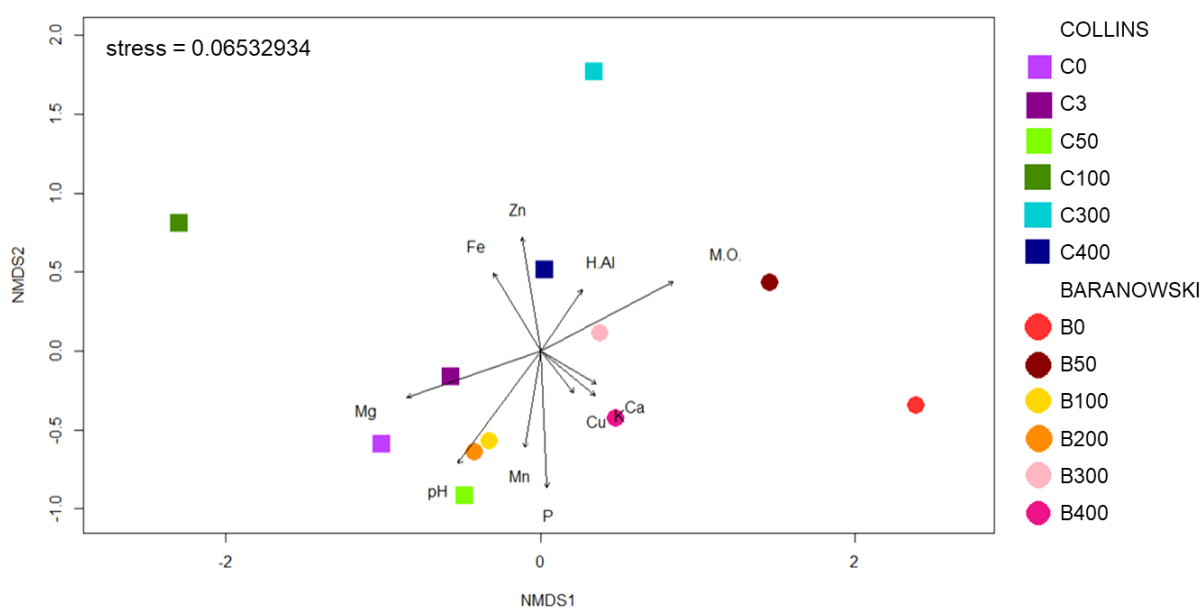
Os resultados de beta diversidade mostram que as amostras iniciais C0, C3, C50 e C400 são similares entre si. C300 é a mais diferenciada do transecto e, sendo uma das amostras com menos pares de base sequenciados, explica o alto valor de Bray-Curtis. Quanto à geleira Baranowski, as amostras B0 e B50 são distintas entre si e das outras amostras da mesma geleira. B100 e B200 são muito similares entre si, e o mesmo ocorre com B300 e B400. Esses resultados evidenciam ainda mais os diferentes padrões da sucessão ecológica das duas geleiras.

Tabela 6. Valores para o índice de dissimilaridade Bray-Curtis.

Amostra	C0	C3	C50	C100	C300	C400	B0	B50	B100	B200	B300	B400
C0	0,000											
C3	0,315	0,000										
C50	0,366	0,247	0,000									
C100	0,973	0,978	0,976	0,000								
C300	0,913	0,830	0,918	0,938	0,000							
C400	0,371	0,466	0,550	0,986	0,792	0,000						
B0	0,923	0,781	0,823	0,990	0,923	0,847	0,000					
B50	0,824	0,793	0,810	0,988	0,904	0,739	0,638	0,000				
B100	0,398	0,552	0,593	0,988	0,953	0,422	0,860	0,772	0,000			
B200	0,330	0,506	0,551	0,986	0,947	0,391	0,875	0,789	0,082	0,000		
B300	0,633	0,517	0,520	0,982	0,882	0,529	0,716	0,658	0,684	0,669	0,000	
B400	0,420	0,501	0,544	0,987	0,925	0,388	0,735	0,603	0,500	0,485	0,483	0,000

Fonte: da Autora.

Figura 13. nMDS com as distâncias das amostras calculadas pelo índice Bray-Curtis e as variáveis ambientais analisadas. O stress foi avaliado em 0.06532934, que equivale a uma distorção baixa, ou seja, os dados multidimensionais em um gráfico com dimensões reduzidas são bem representados (CLARKE, 1993). Essas variáveis ambientais, no entanto, não são significativas estatisticamente.



Fonte: da Autora.

5.3. Co-assembly por geleira

A abordagem *co-assembly* por geleira gerou, para a geleira Collins, 16 genomas, sendo apenas o COL_MAG_00001 de alta qualidade. Dentre os outros MAGs, 2 eram de média qualidade e 13, de baixa qualidade. Esses genomas

utilizaram 13.540 contigs (cerca de 16% de todos os contigs montados a partir dos *reads* de metagenoma) e 58,25Mb (cerca de 37% de todos os nucleotídeos do banco de dados de *contigs*). A lista completa de genomas com sua qualidade pelo CheckM e informação taxonômica pelo GTDB-Tk está na Tabela 7.

Para a geleira Baranowski, reconstruíram-se 42 genomas, sendo 2 de alta qualidade, 13 de média qualidade e 27 de baixa qualidade. Esses genomas utilizaram 36.797 *contigs* (cerca de 22% de todos os contigs montados a partir das *reads* de metagenoma) e 211,73Mb (cerca de 53% de todos os nucleotídeos do banco de dados de *contigs*). A lista completa de genomas com sua qualidade pelo CheckM e informação taxonômica pelo GTDB-tk está na Tabela 8.

A qualidade dos MAGs tanto nesta abordagem quanto na de *co-assembly* com todas as amostras possuíam diferenças nos valores de completude e contaminação quando calculadas no *anvi'o* e no CheckM. Foi escolhida a ferramenta do CheckM, uma vez que é um software que utiliza mais parâmetros e marcadores para este cálculo (PARKS *et al.*, 2015)

Tabela 7. Classificação taxonômica (até nível de gênero) pelo GTDB-Tk e qualidade (completude e contaminação) pelo CheckM dos MAGs reconstruídos a partir das amostras de solo do recuo da geleira Collins.

MAGs Collins	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Completude CheckM	Contaminação CheckM
MAG_01	Archaea	Thermoproteota	Nitrososphaeria	Nitrososphaerales	Nitrososphaeraceae		91,42%	0,00%
MAG_02	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Ferruginibacter</i>	68,77%	1,08%
MAG_03	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Ferruginibacter</i>	60,55%	13,18%
MAG_04	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Palsa-955	60,63%	8,84%
MAG_05	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae		50,03%	17,12%
MAG_06	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	UBA10324		37,93%	6,28%
MAG_07	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	UBA10324		41,03%	0,10%
MAG_08	Bacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteriia				17,15%	1,14%
MAG_09	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Palsa-955	15,92%	1,28%
MAG_10	Bacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteriia				64,98%	0,00%
MAG_11	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Palsa-955	40,26%	5,75%
MAG_12	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	JJ008	13,28%	0,19%
MAG_13	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	51,9%	0,00%
MAG_14	Bacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteriia				31,43%	1,72%
MAG_15	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	JAAFHG01	48,62%	0,00%
MAG_16	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	AKYH767	B-17BO	UBA4416	41,61%	2,22%

Fonte: da Autora.

Tabela 8. Classificação taxonômica (até nível de gênero) pelo GTDB-Tk e qualidade (completude e contaminação) pelo CheckM dos MAGs reconstruídos a partir das amostras de solo do recuo da geleira Baranowski.

MAGs Baranowski	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Completude CheckM	Contaminação CheckM
MAG_01	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae		92,86%	11,33%
MAG_02	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Mycobacteriales	Mycobacteriaceae	<i>Rhodococcus</i>	91,12%	1,68%
MAG_03	Bacteria	Actinobacteriota	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae	CADCVQ01	93,3%	23,29%
MAG_04	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Saccharospirillaceae	<i>Reinekea</i>	88,21%	22,71%
MAG_05	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprospiraceae		75,99%	15,78%
MAG_06	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	AKYH767-A	OLB10		79,81%	39,96%
MAG_07	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Pseudoxanthomonas_A</i>	83,4%	33,86%
MAG_08	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprospiraceae		88,04%	1,10%
MAG_09	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Aquaticitalea</i>	80,33%	3,78%
MAG_10	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Ferruginibacter</i>	89,46%	3,65%
MAG_11	Bacteria	Actinobacteriota	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales			92,32%	2,31%
MAG_12	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia				68,8%	15,95%
MAG_13	Bacteria	Gemmatimonadota	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae		78,39%	2,75%
MAG_14	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Lacibacter</i>	87,06%	0,66%
MAG_15	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	JJ008	81,64%	2,23%
MAG_16	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	JJ008	68,55%	20,61%
MAG_17	Bacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteriia	Cyanobacteriales	Microcoleaceae	<i>Microcoleus</i>	63,29%	1,00%
MAG_18	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae		79,22%	21,17
MAG_19	Bacteria	Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Akkermansiaceae	UBA1315	66,6%	3,9
MAG_20	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Flavisolibacter</i>	93,25%	26,35
MAG_21	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	63,42%	15,02
MAG_22	Bacteria	Actinobacteriota	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae	SEOHO-28	50,08%	2,59
MAG_23	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	JJ008	62,24%	1,35

MAGs Baranowski	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Completeness CheckM	Contaminação CheckM
MAG_24	Bacteria	Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Akkermansiaceae	UBA1315	69,22%	17,69
MAG_25	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Propionibacteriales	Nocardiodaceae	<i>Aeromicrobium</i>	39,75%	7,97
MAG_26	Bacteria	Actinobacteriota	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae	CADCVQ01	63,48%	22,8%
MAG_27	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Cytophagales	Cyclobacteriaceae	<i>Algoriphagus</i>	84,59%	11,87%
MAG_28	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae		89,68%	4,87%
MAG_29	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomicrobium</i>	67,83%	12,76%
MAG_30	Bacteria	Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Akkermansiaceae	UBA1315	55,64%	8,10%
MAG_31	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Actinomycetales	Microbacteriaceae	<i>Rhodoglobus</i>	80,09%	3,96%
MAG_32	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter_A</i>	85,67%	12,93%
MAG_33	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Mycobacteriales			50,26%	14,69%
MAG_34	Bacteria	Patescibacteria	Saccharimonadia	Saccharimonadales			52,65%	24,36%
MAG_35	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae		42,01%	18,44%
MAG_36	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria				39,2%	0,35%
MAG_37	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Palsa-955	48,43%	11,57%
MAG_38	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Cytophagales	Cyclobacteriaceae	<i>Algoriphagus</i>	24,55%	1,88%
MAG_39	Bacteria	Gemmatimonadota	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	UBA4720	48,26%	4,95%
MAG_40	Bacteria	Bacteroidota	Ignavibacteria	SJA-28	B-1AR		47,02%	1,72%
MAG_41	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Propionibacteriales	Nocardiodaceae	<i>Nocardioides</i>	5,6%	0,12%
MAG_42	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas_E</i>	42,56%	0,87%

Fonte: da Autora.

Na geleira Collins, os MAGs reconstruídos foram classificados em três filios: Thaumarchaeota, Cyanobacteria e Bacteroidota; e três classes: Nitrososphaeria (1 MAG), Cyanobacteriia (3 MAGs) e Bacteroidia (12 MAGs). Dentre os 12 MAGs de Bacteroidia, oito foram classificados na família Chitinophagaceae. Apenas COL_MAG_00002, COL_MAG_00003 (ambos *Ferruginibacter*) e COL_MAG_00013 (*Flavobacterium*) chegaram à nível de gênero, e houve recrutamento de *reads* de todas as amostras. Tanto *Ferruginibacter* quanto *Flavobacterium* são gêneros encontrados comumente na Antártica, em solos com alta concentração de nutrientes e moléculas complexas (HOLMES, 1992; KIM *et al.* 2012).

A classificação dos MAGs na Baranowski correspondeu a: filo Bacteroidota, classe Bacteroidia, que foi a com maior classificação de MAGs (17 MAGs) (assim como na geleira Collins), classe Ignavibacteria (1 MAG); filo Proteobacteria, classes Gammaproteobacteria (6 MAGs) e Alphaproteobacteria (1 MAG); filo Actinobacteriota, classes Actinomycetia (7 MAGs), Thermoleophilia (3 MAGs) e Acidimicrobiia (1 MAG); filo Gemmatimonadota, classe Gemmatimonadetes (2 MAGs); filo Cyanobacteria, classe Cyanobacteriia (1 MAG); filo Verrucomicrobiota, classe Verrucomicrobiae (3 MAGs); Patescibacteria, classe Saccharimonadia (1 MAG) (Figura 13). Todos fazem parte de táxons já descritos em habitats antárticos. Os MAGs classificados como Actinobacteriota, Proteobacteria e Verrucomicrobiota foram reconstruídos a partir das *reads* das amostras B0 e B50. MAGs relacionados a Bacteroidota e Cyanobacteria foram reconstruídos a partir de *reads* das etapas intermediárias e finais da cronossequência.

Proteobacteria, especificamente Gammaproteobacteria, é comumente associada a comunidades marinhas (LEE *et al.*, 2015; FRANCO *et al.*, 2017), mas também há registros em solos altamente nutritivos (AISLABIE *et al.*, 2009). Gemmatimonadota é um dos filios encontrados em solos, em especial locais que possuem baixa disponibilidade de água líquida (CARY *et al.*, 2010; MUJAKIĆ; PIWOSZ; KOBLÍŽEK, 2022), tornando-o um táxon bem-sucedido na Antártica. Por outro lado, pouco se sabe sobre seu metabolismo, a não ser evidências recentes de membros que realizam fotossíntese anoxigênica (ZENG *et al.*, 2016a).

Figura 14. Gráfico de barras da classificação taxonômica via GTDB-tk dos MAGs reconstruídos na abordagem co-assembly por geleira. a. Taxonomia dos 16 MAGs reconstruídos com as amostras da geleira Collins. b. Taxonomia dos 42 MAGs reconstruídos com as amostras da geleira Baranowski.



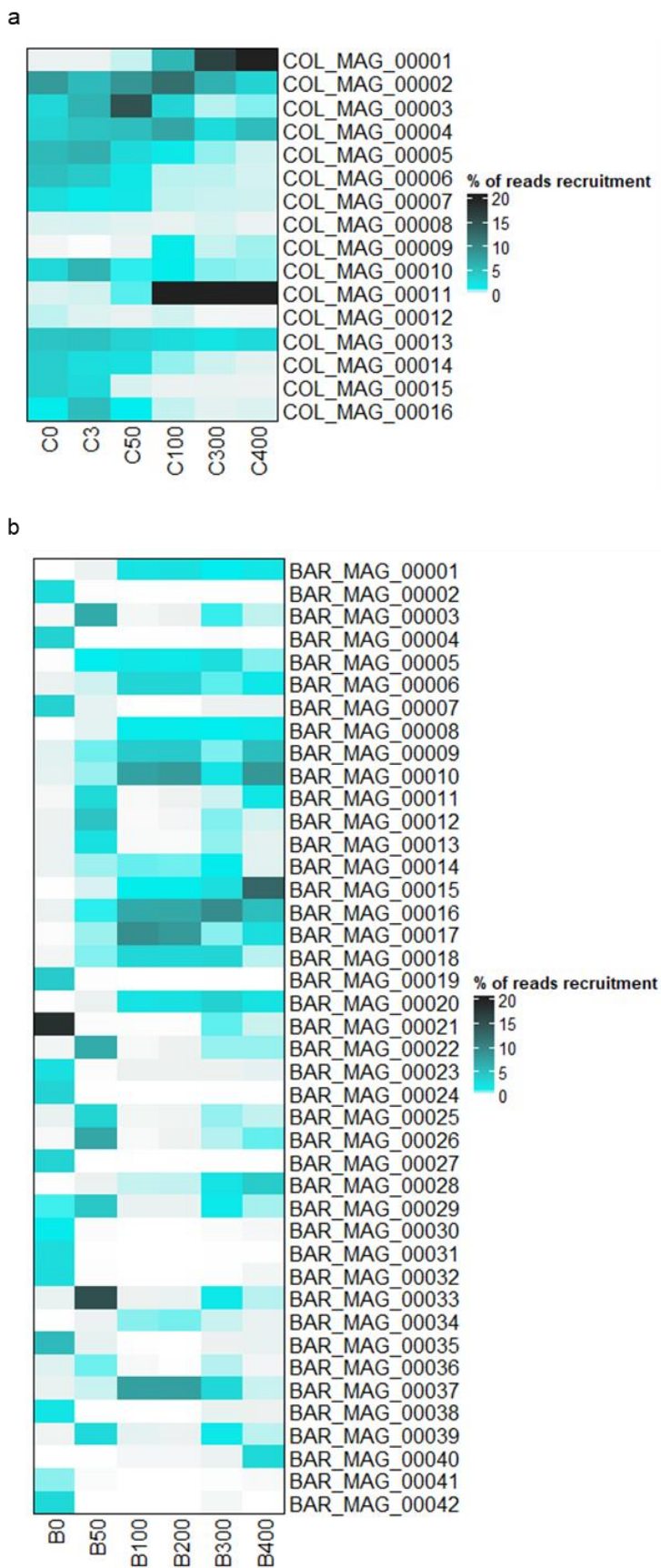
Fonte: da Autora.

O *co-assembly* por geleira permitiu a reconstrução de MAGs em grande quantidade, porém, por conta da baixa qualidade da maioria dos genomas da geleira Collins, não é possível determinar, com confiança, os potenciais metabólicos desses MAGs. Todavia, a anotação funcional foi realizada para verificar os genes presentes nos MAGs de maior qualidade das duas geleiras (COL_MAG_0001, BAR_MAG_00002, BAR_MAG_00008, BAR_MAG_00009, BAR_MAG_00010, BAR_MAG_00011, BAR_MAG_00014, BAR_MAG_00015, BAR_MAG_00028,

BAR_MAG_00031), todos com completude >80% e redundância <5%. Apesar de apenas haver montado um MAG de alta qualidade da geleira Collins, os outros nove MAGs provenientes da geleira Baranowski trouxeram um entendimento melhor sobre o papel funcional destes micro-organismos.

O recrutamento de *reads* relata a porcentagem de *reads* provenientes de cada amostra que ajudou na montagem de um determinado genoma. É um dado que pode ser visualizado na forma de “mapa de calor” para verificar a contribuição de cada amostra no *binning*, que depende tanto da quantidade de material genético sequenciado nessa amostra quanto da qualidade e taxonomia de seus *reads* (Figura 14). No geral, ao observar os MAGs da geleira Collins, as amostras C0, C3 e C50 (mais perto da geleira, ou seja, menor tempo de exposição de solo) tiveram maior contribuição do que as amostras C100, C300 e C400 (maior tempo de exposição de solo). Por outro lado, COL_MAG_00001, o único MAG de alta qualidade proveniente da geleira Collins, teve *reads* recrutados das amostras mais distantes da geleira. Na geleira Baranowski, encontra-se um comportamento diferenciado. Em geral, os MAGs reconstruídos com *reads* da amostra B0 não recrutaram *reads* de outras amostras. Já os outros MAGs possuem *reads* das etapas intermediárias e finais da sucessão ecológica, B50, B100, B200, B300 e B400.

Figura 15. Mapa de calor do recrutamento de reads dos MAGs reconstruídos na abordagem co-assembly por geleira. a. Geleira Collins. b. Geleira Baranowski.



Fonte: da Autora.

5.3.1. Anotação funcional

Para cada MAG selecionado para análise funcional (Tabela 9), realizou-se um minucioso estudo sobre os genes e vias metabólicas presentes e o papel ecológico do micro-organismo levando em consideração a sucessão ecológica microbiana em recuo de geleira. Todos os 10 genomas estudados se referem a procariotos heterotróficos aeróbios, uma vez que estavam presentes nas camadas superficiais do solo.

Tabela 9. MAGs selecionados para análise funcional e suas classificações taxonômicas de acordo com GTDB-Tk.

MAG	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
COL_MAG_00001	Archaea	Thermoproteota	Nitrososphaeria	Nitrososphaerales	Nitrososphaeraceae	
BAR_MAG_00002	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Mycobacteriales	Mycobacteriaceae	<i>Rhodococcus</i>
BAR_MAG_00008	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprosiraceae	
BAR_MAG_00009	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Aquaticitalea</i>
BAR_MAG_00010	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Ferruginibacter</i>
BAR_MAG_00011	Bacteria	Actinobacteriota	Acidimicrobia	Acidimicrobiales		
BAR_MAG_00014	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Lacibacter</i>
BAR_MAG_00015	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	JJ008
BAR_MAG_00028	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	
BAR_MAG_00031	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Actinomycetales	Microbacteriaceae	<i>Rhodoglobus</i>

Fonte: da Autora.

Os genes relacionados ao metabolismo de carbono (Figura 15) e nitrogênio (Figura 16) são indispensáveis para a produção de moléculas como aminoácidos e nucleotídeos e para produção de energia. Os genes relacionados ao ciclo do carbono (ademais das vias de lactose/galactose e amido/sacarose) estavam presentes em todas as bactérias da geleira Baranowski. Apenas os MAGs COL_MAG_00001, BAR_MAG_00002, BAR_MAG_00010 e BAR_MAG_00011 possuíam genes do ciclo do nitrogênio, evidenciando a existência táxons específicos para o fornecimento de nitrogênio para a comunidade microbiana. Por outro lado, genes de assimilação de nitrogênio para produção de aminoácidos, por exemplo, *glnA* (síntese de glutamina) estavam presentes em todos os MAGs (XUE *et al.*, 2020).

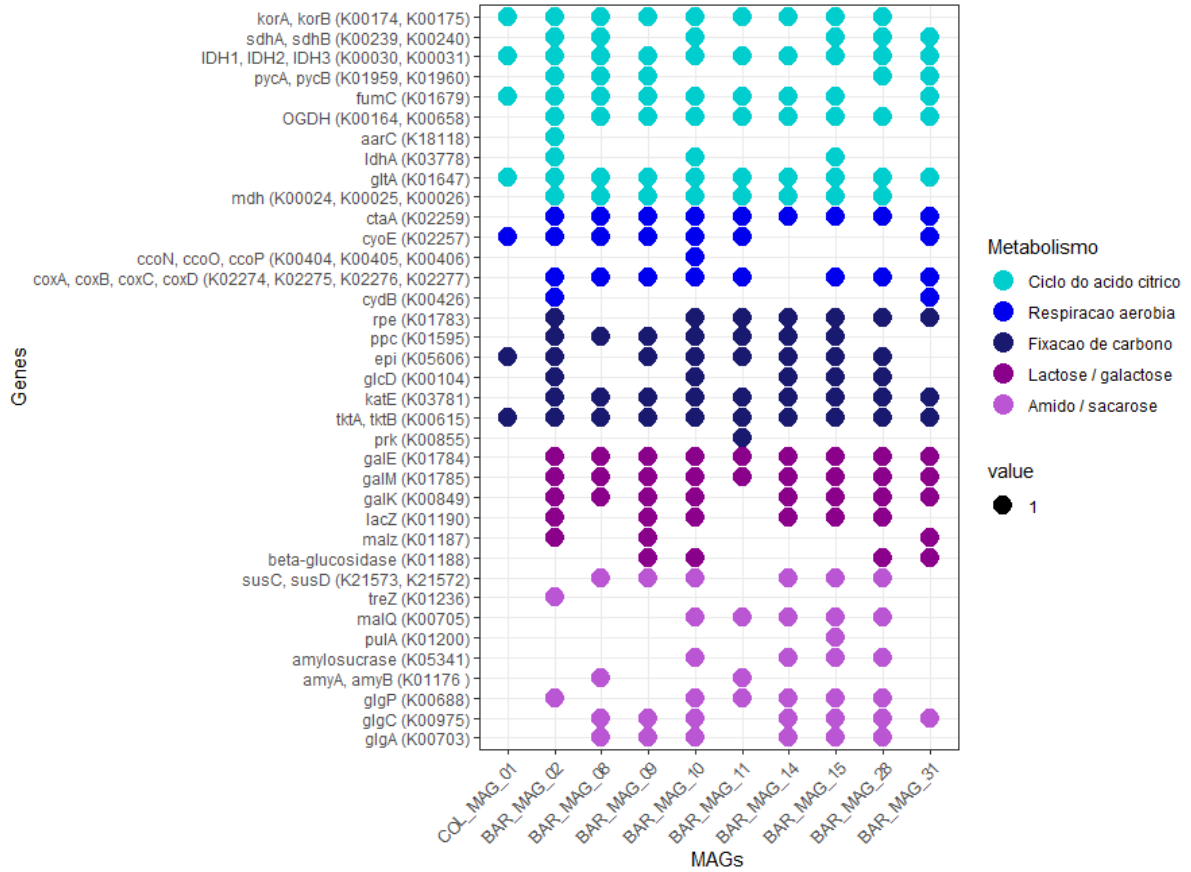
As vias do metabolismo do enxofre (Figura 17) permitem a síntese de aminoácidos sulfurosos e algumas vias de redução de sulfato, por exemplo, podem

ser substitutas para a respiração aeróbia, uma vez que a molécula pode doar elétrons para a fosforilação oxidativa quando o oxigênio não está presente (POSTGATE; JORGENSEN, 1982; PURCELL, 2014). Apenas o BAR_MAG_00031 não exibiu genes relacionados à redução de sulfato; e não foram encontrados genes de produção de cisteína em COL_MAG_00001 e BAR_MAG_00011.

Na Antártica, as condições extremas como exposição à radiação UV requer genes de proteção e reparo de DNA, a fim de evitar quebras e mutações no material genético. Além disso, genes de choque térmico mantêm a integridade da célula a altas ou baixas temperaturas. O notável conjunto de genes de produção e resistência a antibióticos na Antártica (MARCOLETA *et al.*, 2022) confere vantagens na competição intra e interespecífica (FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2016; ZAIKOVA *et al.*, 2019). No entanto, não é possível rastrear se os genes de resistência são naturais ou provenientes de bactérias em contato com antibióticos artificiais (MINDLIN; PETROVA, 2017). Esses genes podem ser translocados de um organismo para outro pela transferência horizontal de genes através de conjugação, transformação ou transdução. Assim, os genes que permitem a passagem desses genes plasmidiais são interessantes elementos para entender a dinâmica e a comunicação celular. Foram encontrados diversos genes de reparo de DNA, resposta a estresse, choque térmico em todos os MAGs analisados (Figura 18). No entanto, COL_MAG_00001 foi o genoma com menos genes dentre os estudados, expressando que provavelmente genes específicos de arqueia, que não entraram na análise, possivelmente auxiliam na resistência e sobrevivência desse organismo.

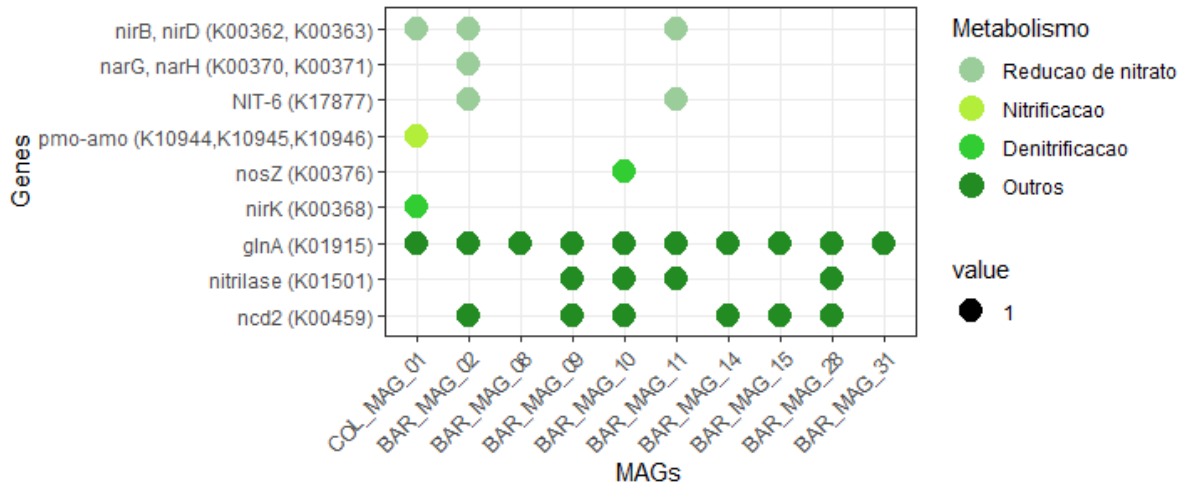
Os micro-organismos também apresentaram genes de degradação (Figura 19), seja de aminoácidos ou de polissacarídeos, que desempenham um papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos (JAIN; KRISHNAN, 2017; SANYAL *et al.*, 2018). Já os genes de degradação de compostos aromáticos (presente em todos os MAGs) têm potencial biotecnológico para controlar contaminações por hidrocarbonetos (LUZ *et al.*, 2004; MUANGCHINDA *et al.*, 2015).

Figura 16. Presença de genes das vias do ácido cítrico, respiração aeróbia, fixação de carbono, lactose/galactose e amido/sacarose nos MAGs selecionados. Presença e ausência foram contabilizados a partir dos resultados das análises dos softwares DRAM, Rast Server, Patric e GhostKoala.



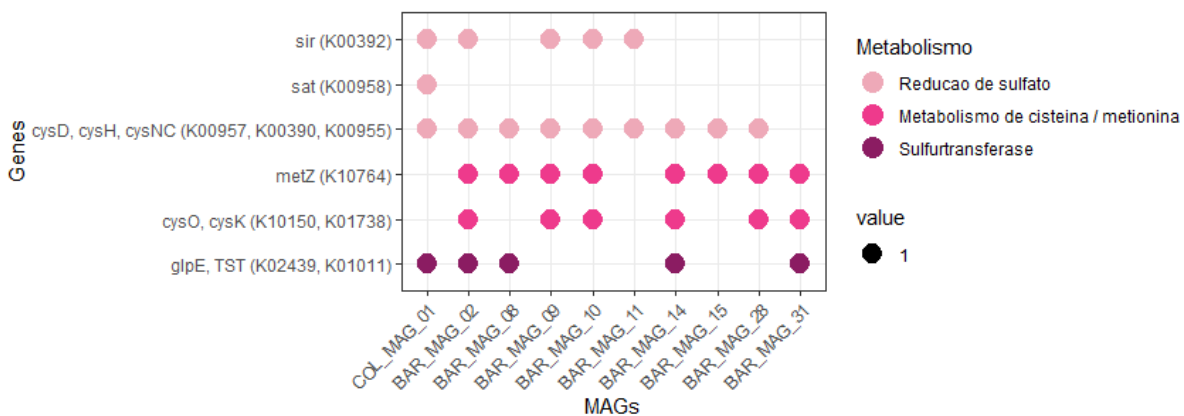
Fonte: da Autora

Figura 17. Presença de genes das vias de redução de nitrato, nitrificação, denitrificação e outros genes relacionados ao ciclo do nitrogênio nos MAGs selecionados. Presença e ausência foram contabilizados a partir dos resultados das análises dos softwares DRAM, Rast Server, Patric, FAMA e GhostKoala.



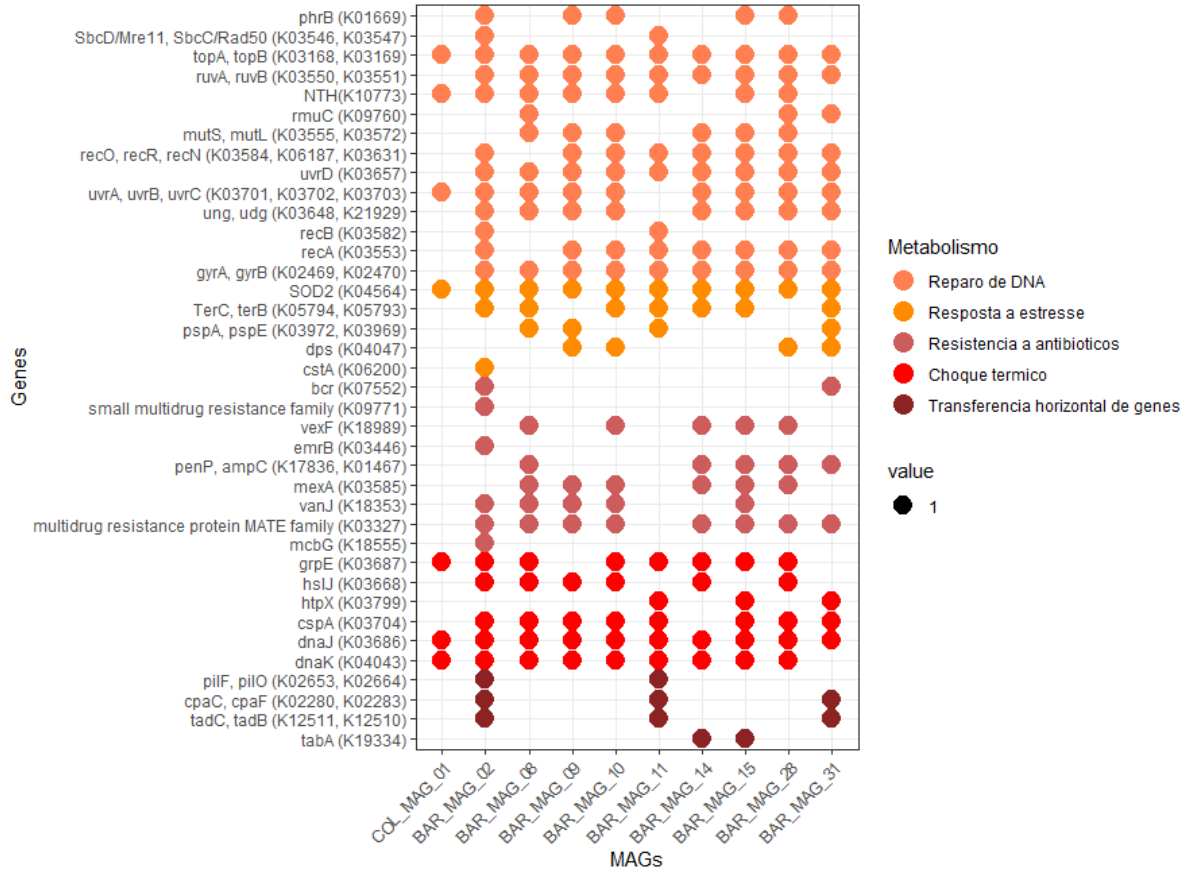
Fonte: da Autora

Figura 18. Presença de genes das vias de redução de sulfato, metabolismo de cisteína/metionina e sulfurtransferase nos MAGs selecionados. Presença e ausência foram contabilizados a partir dos resultados das análises dos softwares DRAM, Rast Server, Patric e GhostKoala.



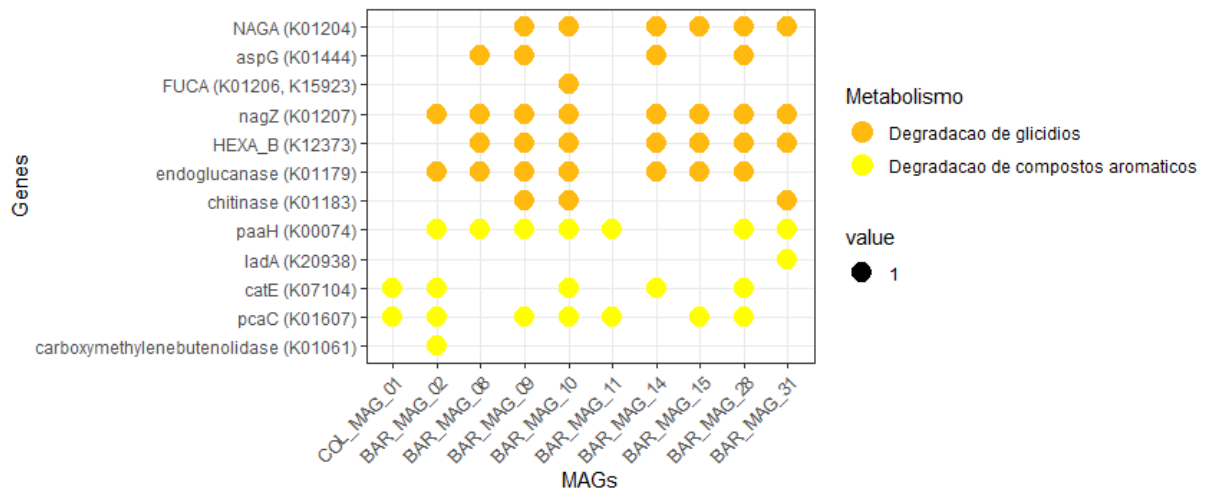
Fonte: da Autora

Figura 19. Presença de genes de reparo de DNA, resposta à estresse, resistência a antibióticos, choque térmico e transferência horizontal de genes nos MAGs selecionados. Presença e ausência foram contabilizados a partir dos resultados das análises dos softwares DRAM, Rast Server, Patric e GhostKoala.



Fonte: da Autora

Figura 20. Presença de genes de degradação de glicídeos e compostos aromáticos nos MAGs selecionados. Presença e ausência foram contabilizados a partir dos resultados das análises dos softwares DRAM, Rast Server, Patric e GhostKoala.



Fonte: da Autora

5.3.1.1. COL_MAG_00001: Nitrososphaeraceae

COL_MAG_00001, como uma arqueia oxidadora de amônia (AOA), possui o gene *amoA*, amônia monooxigenase. Além disso, *nirK*, gene da via de desnitrificação também foi encontrado no genoma, como já descrito por Jung *et al.* (2014) no filo Thaumarchaeota. Os genes são expressos durante a oxidação de amônia (JUNG *et al.*, 2011; STIEGLMEIER *et al.*, 2014), o que indica a produção de nitrato (NO₂) e óxido nitroso (N₂O), no entanto, as AOA comumente não possuem redutases de óxido nítrico (genes *nor*) (JUNG *et al.*, 2019), de forma que não realizam nitrificação completa. Por outro lado, Liu *et al.* (2017) revelou produção de N₂O a partir do intermediário da via de oxidação de amônia, hidroxilamina, de forma abiótica e na presença de oxigênio. A importância ecológica do N₂O é por ser um conhecido gás do efeito estufa, afetar a camada de ozônio e, nos solos, diminuir o pH. Além disso, o ciclo da ureia estava presente, de forma incompleta (*argF*, *argH*, *argG*), evidenciando a capacidade de alguns gêneros de Thaumarchaeota de metabolizar ureia em amônia, seguindo para nitrificação, utilizando NH₃ como fonte de energia e fixação de nitrogênio (ALONSO-SÁEZ *et al.*, 2012; ZHALNINA *et al.*, 2014; TOLAR *et al.*, 2017). Outra classe de genes relacionada é urease, que converte ureia proveniente de plantas e excretas animais (TSCHERKO *et al.*, 2003b) em NH₃ e CO₂, permitindo novamente a oxidação do NH₃ (ALONSO-SÁEZ *et al.*, 2012).

Segundo Brankatschk *et al.* (2011), a comunidade relacionada à ciclagem de nitrogênio se modifica ao longo da cronossequência de uma geleira. No início, o nitrogênio é convertido na mineralização, nas etapas intermediárias, a taxa de fixação de nitrogênio aumenta e, no solo maduro, aumentam as taxas de nitrificação e desnitrificação. O resultado está de acordo com as conclusões do presente estudo, considerando que os *reads* recrutados para reconstruir o MAG são provenientes, em sua maioria, das amostras do final da cronossequência da geleira Collins (C100, C300 e C400). Por outro lado, Sigler e Zeyer (2002) e Zeng *et al.* (2016a) encontraram uma diminuição dos níveis de *nirK* e da diversidade de AOA na progressão da cronossequência, o que pode ser explicado pela competição entre os táxons microbianos e introdução de plantas nas etapas finais da sucessão ecológica.

Uma vez que o COL_MAG_00001 é um genoma de organismo quimiolitotrófico, a fixação de CO₂ presente nas AOA ocorre via ciclo do hidroxipropionato/hidroxibutirato modificado, que economiza mais energia do que o ciclo de Calvin-Benson, por exemplo (KÖNNEKE *et al.*, 2014). No genoma, a via

tradicional foi encontrada de forma incompleta. O metabolismo do carbono também está presente pela via da pentose fosfato não-oxidativa e o ciclo do ácido tricarboxílico incompleto.

Também há evidências de biotransformação de compostos, como micropoluentes com nitrogênio em sua composição (MEN *et al.*, 2016) e de compostos aromáticos (KEROU *et al.*, 2016). Alguns genes relacionados à degradação de estireno, catechol e fluorobenzoato também foram encontrados no genoma. Nesse sentido, os genes de biofilme *wecC*, *cdpA*, *trpG* e *trpE* também contribuem para a atividade degradativa.

Alguns estudos evidenciam a falta de genes do metabolismo de enxofre (LIN *et al.*, 2015; REN *et al.*, 2019) em AOA, porém, Beam *et al.* (2014) comprovou, em linhagens termoacidófilas de Thaumarchaeota, a existência de uma nova via de redução de sulfato reversa, que utiliza *aprBA*, *sat*, *sudH*, *drsA* e *sirA*. No MAG, os genes *sat* e *sir* podem sustentar a hipótese da presença dessa via também em outras linhagens de Thaumarchaeota.

Dos genes de resistência e proteção de DNA analisados, poucos foram encontrados no genoma, como por exemplo, *uvr* (resistência a raios ultravioleta) e *top* (topoisomerase) e *SOD2* (superóxido dismutase, resistência a estresse oxidativo). Dano ao material genético é comum devido à alta incidência de raios UV na Antártica, agravado pelo buraco na camada de ozônio (FUENTES-LEÓN *et al.*, 2020). Os genes de chaperonas *dnaK*, *dnaJ* e *grpE* também auxiliam na recuperação do DNA após estresse térmico (SCHRÖDER *et al.*, 1993).

Pouco se sabe ainda sobre os biofilmes produzidos por arqueias, e a principal hipótese é que, assim como os biofilmes bacterianos, essa comunidade pode contribuir para proteção das células e transferência horizontal de genes (VAN WOLFEREN; ORELL; ALBERS, 2018). Esse biofilme também pode ser misto, formado por bactérias e arqueias em conjunto, como descrito em Pelissari *et al.* (2017) e Borsodi *et al.* (2018), em que as arqueias mais ativas na produção de biofilme eram da família Nitrososphaeraceae. No MAG, foram encontrados os genes *cpdA* e *wecC* que auxiliam no processo de formação da matriz extracelular e comunicação celular.

5.3.1.2. BAR_MAG_00002: *Rhodococcus*

O BAR_MAG_00002 é um integrante do gênero *Rhodococcus*, do filo Actinobacteriota. Novamente, as bactérias deste filo são essencialmente heterotróficos, dependem de uma fonte de carbono orgânico externa e também são conhecidos por sua capacidade de degradação de carboidratos complexos e produção de metabólitos secundários com interesse biotecnológico (COWAN *et al.*, 2014; ANANDAN; DHARUMADURAI; MANOGARAN, 2016; ELSAYED; REFAAT; ABDELMOHSEN, 2017).

O MAG exibiu as vias de respiração celular aeróbia completas, incluindo glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico e complexos respiratórios e de ATPase. No metabolismo de nitrogênio, redução dissimilatória de nitrato a amônia (com presença dos genes *narG* e *narH*) e, no metabolismo de enxofre, assimilação de sulfato extracelular e redução assimilatória de sulfato a sulfeto de hidrogênio.

O metabolismo de degradação de compostos aromáticos já foi bem caracterizada neste gênero (MARTÍNKOVÁ *et al.*, 2009; KUYUKINA; IVSHINA, 2010; ALVAREZ *et al.*, 2022). Estavam presentes as vias incompletas de degradação de benzoato, aminobenzoato, tolueno, xileno, estireno, esteroides, fenilacetato, catechol e ácido cinâmico. Considerando que algumas linhagens não possuem todas as enzimas para degradação total de certos xenobióticos (FOSTER *et al.*, 2014), não é possível ter certeza se as vias incompletas são decorrentes de sua cepa ou da (in)completude do MAG. A presença de genes codificadores de urease (*ureABC*) também é um indicativo de biorremediação, uma vez que é sensível a óleo (ZHANG; HUO; ZHU, 2012) e atua na mineralização de metais pesados (LI; CHENG; GUO, 2013).

Rhodococcus também é conhecido por utilizar fenóis como fonte de carbono e energia, por isso, é foco de estudos de biorremediação de solo e águas contaminadas por hidrocarbonetos (FINNERTY, 1992). Apesar de genes de degradação serem comumente associados à plasmídeos, a alta plasticidade do genoma de *Rhodococcus* permitiu recombinações, gerando múltiplos genes homólogos e redundantes em seu cromossomo e seus três plasmídeos (LARKIN *et al.*, 1998; LARKIN; KULAKOV; ALLEN, 2005). Outro grupo de genes que atua auxiliando a degradação de plástico e compostos aromáticos, por exemplo, são de biofilme (MOR; SIVAN, 2008; SIVAN; SZANTO; PAVLOV, 2006; SCHREIBEROVÁ *et al.*, 2012). Estavam presentes *crp*, *pslG* e *pelF*, que possuem um papel importante

na fixação e estabelecimento de micro-organismos em uma superfície, facilitando também sua degradação (GILAN; SIVAN, 2013).

Feisthauer *et al.* (2008) e Hernández *et al.* (2019) comentam sobre a fixação de CO₂ do gênero *Rhodococcus* que, apesar de ser quimioheterotrófico, também se aproveita de processos litoautotróficos. A principal via descrita nesses trabalhos sobre de fixação de carbono é o ciclo do ácido tricarboxílico, porém, o ciclo de Calvin-Benson também estava presente no genoma de forma incompleta. Genes para assimilação de nitrogênio estavam presentes, como *nirBD*, que codificam as subunidades de redutase de nitrito (IINO *et al.*, 2013), e *glnA*.

Quanto à resistência e proteção de DNA, quase todos os genes analisados estavam presentes, como *gyrAB*, *recAB*, *ung*, *udg*, *uvr*, *phrBI*, *cstA*, *SOD2*. Além disso, encontraram-se genes de resistência a antimicrobianos como vancomicina, fluoroquinolona e transportadores MFS que garantem o efluxo de algumas dessas substâncias. Interessante é notar os genes de transferência horizontal deste genoma, uma vez que *Rhodococcus* é conhecido pela flexibilidade genômica e compartilhar genes para degradação de compostos. Os genes presentes do processo são de montagem de pilus: *tad*, *cpa* e *pil*. Apesar da facilidade de troca de material genético, alguns genes dependem de condições ambientais específicas para esse processo, dependendo da comunidade microbiana local e fatores como pH (ZHANG *et al.*, 2022).

Outro grupo de genes também estava presente, compondo vias de biossíntese de metabólitos secundários como ácido lipoico, composto que possui propriedades antioxidantes (PACKER; WITT; TRITSCHLER, 1995), auxiliando na resistência a espécies reativas de oxigênio; e dTDP-L-ramnose, açúcar presente na parede celular de *Streptococcus* que contribui para sua virulência (VAN DER BEEK *et al.*, 2019). Genes para produção de vitaminas também estavam presentes, como colabamina, retinol e riboflavina. Em relação à produção de antimicrobianos, as vias de monobactam e estreptomicina se encontravam incompletas.

5.3.1.3. BAR_MAG_00008: Saprospiraceae

BAR_MAG_00008 corresponde a Saprospiraceae, uma família do filo Bacteroidota, aeróbia e heterotrófica. A família é encontrada em ambientes aquáticos, e a sua presença no recuo da geleira Baranowski pode ser explicada pela intensa influência do mar e do *spray* marinho na Península Antártica. Pouco se sabe

sobre a fisiologia da família, mas estudos indicam capacidade para utilizar carboidratos complexos (MCILROY; NIELSEN, 2014), uma vez que atua na decomposição de matéria orgânica (KOHLENER *et al.*, 2022).

A maior parte dos *reads* para esse MAG foram recrutados das amostras B100, B200, B300 e B400. Isso indica uma maturação do solo ao longo do tempo e do espaço, uma vez que Bacteroidota, como já indicado, é conhecido por habitar solos mais antigos e com oferta de matéria orgânica. A comunidade microbiana nessas etapas da cronossequência já apresenta uma complexidade que permite o estabelecimento de bactérias como BAR_MAG_00008, BAR_MAG_00009, BAR_MAG_00010, BAR_MAG_00015 e BAR_MAG_00028, que dependem de um meio heterogêneo, com carboidratos e aminoácidos disponíveis para o seu crescimento.

Para utilização de carboidratos complexos como fonte de carbono no seu metabolismo, o filo Bacteroidota possui vias metabólicas específicas, como por exemplo, o sistema de utilização de amido (SUS, do inglês “*starch utilization system*”) (FOLEY; COCKBURN; KOROPATKIN, 2016). O SUS é composto por genes de transporte, ligação e degradação de amido, cujos genes *susA*, *susB*, *susC*, *susD*, *susE_F* e *susG* estão presentes no genoma. Além desses, outros genes de degradação de glicídios encontrados foram *hexA_B* (hexosaminidase, que degrada glicosaminoglicanos e glicanos em geral) e endoglucanase (metaboliza celulose, uma vez que, nos estágios finais da cronossequência, há presença de plantas).

Xia *et al.* (2008) estudou *Candidatus Epiflobacter spp.*, que utiliza aminoácidos como fonte de energia. O MAG, por sua vez, possui vias metabólicas para essa finalidade, como os genes iniciais da via de degradação de metionina, além de valina, leucina e isoleucina, e a via completa de degradação de histidina. Além disso, estava presente também a via de redução assimilatória de sulfato completa, que provavelmente atua também na metabolização de aminoácidos com enxofre, como a própria metionina.

A maioria das bactérias do filo Bacteroidota possui uma estratégia de movimentação sem auxílio de cílios ou flagelos, chamada motilidade por deslizamento (em inglês, “*gliding motility*”). No MAG, foram encontrados os genes *gldN* e *gldC-like*, relacionados a esse processo.

5.3.1.4. BAR_MAG_00009: *Aquaticitalea*

BAR_MAG_00009, *Aquaticitalea*, é um genoma de um gênero recente, descrito em 2016 por Xamxidín *et al.*. Por outro lado, Flavobacteraceae é uma família conhecida, encontrada no oceano ou em solos, principalmente polares. É uma família do filo Bacteroidota, importante na ciclagem de nutrientes e na decomposição de matéria orgânica, degradando carboidratos e proteínas. O SUS, para metabolização do amido também está presente, mas de forma incompleta, apenas com os genes *susA*, *susB*, *susC*, *susD*, *susE_F*. O genoma também possui todos os genes analisados para o uso da lactose e galactose como fonte de carbono e energia, como *beta-glucosidase*, *malZ*, *lacZ*, *galK*, *galM* e *galE*.

No genoma, algumas vias de degradação de proteínas estavam presentes, como de histidina e metionina (completa) e tirosina e leucina (incompleta). A via de redução assimilatória de sulfato também se encontrava completa, para atuar na metabolização de aminoácidos com enxofre, como metionina. Genes relacionados a proteínas de motilidade por deslizamento também estavam presentes, *gldN* e *gldC-like*.

5.3.1.5. BAR_MAG_00010: *Ferruginibacter*

BAR_MAG_00010 é uma bactéria do gênero *Ferruginibacter*, da família Chitinophagaceae, um dos táxons mais presentes em todas as amostras analisadas. Também é um MAG com origem nos *reads* do meio e do fim do transecto e, assim como outros MAGs reconstruídos, é capaz degradar carboidratos complexos. Rathore *et al.* (2022) caracteriza o gênero como um indicador de geleiras em retração.

Seu metabolismo de carbono compreende vias completas de glicólise, ciclo do ácido tricarbóxico e pentose fosfato, que permite produção de energia e fixação de carbono. Segundo os genes analisados, o MAG possui *hexA_B*, *nagZ*, *aspG* e *quitinase*, que degrada quitina, presente na parede celular de fungos, cuja abundância aumenta conforme a progressão da cronossequência (BARDGETT; WALKER, 2004; BRANKATSCHK *et al.*, 2010).

O MAG possui diversos genes do metabolismo de amido e, assim, como o BAR_MAG_00009, possui os genes *sus*, com exceção de *susG*. Além disso, também estão presentes os genes *glgA*, *glgC*, *glgP*, *ams* e *malQ*. Em relação ao

metabolismo de lactose e galactose, estavam presentes *beta-glucosidase*, *lacZ*, *galK*, *galM* e *galE*.

Apesar de *Ferruginibacter* ser um conhecido denitrificante (Rodriguez-Sanchez *et al.*, 2018; XIA *et al.*, 2019), apenas o gene *nosZ* estava presente. Ainda, *glnA*, *nitrilase* e *npd* promovem a assimilação de nitrogênio para produção de aminoácidos, por exemplo.

Genes de proteção ao DNA estavam em grande quantidade, como *gyr*, *rec*, *top* e *phrB*. Genes de choque térmico, como *dnaJ*, *dnaK*, *cspA* e *grpE* e também de resistência, como *ter*, *sodN*, *vanJ*, *mexA* e *vexF* (*mexA* e *vexF* fazem parte de sistemas de efluxo de substâncias nocivas). Por outro lado, nenhum gene específico de transferência horizontal de gene foi encontrado, com exceção de alguns genes de reguladores transcricionais relacionados a biofilme (*uvrY*, *crp*, *exsA*, *oxyR*) e ao metabolismo de amido, uma vez que polissacarídeos são compostos predominantes na matriz de biofilme (WATNICK; KOLTER, 2000).

5.3.1.6. BAR_MAG_00011: Acidimicrobiales

BAR_MAG_00011 é da ordem Acidimicrobiales e, como metabolismo central do carbono, utiliza as vias da glicólise, ciclo do ácido tricarbóxico, pentose fosfato e ciclo do glioxilato (MIZUNO; RODRIGUEZ-VALER; GHAI, 2015), encontradas no MAG. O MAG também conta com a via completa de redução de sulfato assimilatória, bem como alguns genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio, como na redução dessimilatória de nitrato e na produção de aminoácidos.

Também estavam presentes vias incompletas de degradação de compostos aromáticos como benzoato, estireno e tolueno. Dentre os genes analisados de degradação de carboidratos, nenhum estava presente no genoma.

Com foco nos antimicrobianos, o MAG possui genes para produção de estreptomicina (genes *rfbABCD*, *suhB*) e monobactam (*dapAB*). Além disso, estava presente também a via da biossíntese de dTDP-L-ramnose.

Actinobacteriota possui grande capacidade de transferência horizontal de genes, tanto doar quanto receber DNA (PARK; SMITH; ANDAM, 2019). Isso está refletido nos genes de produção de pilus (*tad*, *cpa*, *pil*) e biofilme (*cdpA*, *trpE*, *gcvR*, *fliA*).

5.3.1.7. BAR_MAG_00014: *Lacibacter*

BAR_MAG_00014, do gênero *Lacibacter*, também se encontra no táxon Chitinophagaceae. No genoma, estavam presentes as vias de glicólise completa, e ciclo do ácido cítrico e ciclo de Calvin-Benson quase totais. Também possuía genes do metabolismo de amido (*susACD*, *glgACP*, *malQ* e *ams*) e de lactose (*lacZ*, *galEKM*).

Assim como os MAGs que foram alocados no filo Bacteroidota, BAR_MAG_00014 possui genes de degradação de carboidratos complexos, como *aspG*, *hexA_B* e *nagZ* e genes relacionados à produção de biofilme, *crp*, *uvrY*, *oxyR*, *gfcE* e *tabA*. Porém, mas não foram encontrados genes específicos de transferência horizontal.

Genes de resistência e proteção de DNA também estão presentes, como *gyrAB*, *recA*, *ung*, *udg*, *topAB*, *uvrA*, e *terBC*, *katE* e *sodN*. Também possui genes de choque térmico: *dnaK*, *dnaJ* e *grpE* e alguns genes gerais de resistência a antimicrobianos (*mexA*, *vexF*).

O MAG ainda conta com genes das vias de redução assimilatória e dessimilatória de sulfato, porém, de forma incompleta (*glpE*, *cys*, *metZ*, *sseA*). As vias são importantes para o ciclo do enxofre, além de permitir o uso de compostos sulfonados na respiração quando o oxigênio não está presente.

5.3.1.8. BAR_MAG_00015: Chitinophagaceae

BAR_MAG_00015, novamente da família Chitinophagaceae, possui as vias da glicólise e pentose fosfato completas e ciclo do ácido cítrico incompleto. Também possui a via da redução assimilatória de sulfato de forma incompleta (com genes *cys* e *sat*). Em relação ao metabolismo de carboidratos complexos, a via do metabolismo de amido (*susACD*, *glgACP*, *pulA*, *malQ* e *ams*) e lactose (*lacZ*, *galEKM*) estão incompletos e, quanto à degradação de carboidratos complexos, estão presentes os genes *nagZ* e *hexA_B*.

Dentre os genes de resistência e proteção de DNA, estavam presentes *gyrAB*, *recA*, *ung*, *udg*, *topAB*, *uvrA*, *phrB*, e *terBC*, *katE* e *sodN*. Genes de resistência a antimicrobianos, como beta-lactam e vancomicina, e choque térmico também estavam presentes, além dos genes *uvrY*, *trpEG*, *tabA*, *oxyR*, *pgaC* de biofilme.

5.3.1.9. BAR_MAG_00028: Chitinophagaceae

BAR_MAG_00028, mais um integrante da família Chitinophagaceae, possui as vias da glicólise e ciclo do ácido cítrico (incompletas) e da pentose fosfato (completa). Possui genes *cys* e *metZ* do do ciclo do enxofre, relacionado às vias metabólicas dos aminoácidos metionina e cisteína, além da via de redução assimilatória de enxofre incompleta. Foram encontrados também genes do ciclo de nitrogênio relacionados à produção de aminoácidos.

Estavam presentes *susACD*, *glgACP*, *ams* e *malQ* do metabolismo de amido; e *beta-glucosidase*, *lacZ*, *galEKM* do metabolismo de lactose; além de *hexA_B*, *nagZ* e *aspG*, relacionados à degradação de carboidratos complexos.

Quanto aos genes de proteção de DNA, estavam presentes *gyrAB*, *recA*, *ung*, *udg*, *uvrABCD* e *phrB*; além de genes de resistência, *sodN*, *katE* e gerais de combate à antimicrobianos, relacionados a sistemas de efluxo. Além disso, genes de choque térmico *dnaK*, *dnaJ*, *cspA*, *hslJ* e *grpE* também foram encontrados, bem como genes para formação de biofilme: *gfcE*, *cdpA*, *trpEG*, *uvrY* e *wecB*.

5.3.1.10. BAR_MAG_00031: *Rhodoglobus*

Por fim, BAR_MAG_00031 é uma bactéria do gênero *Rhodoglobus*, do filo Actinobacteriota; o MAG também foi reconstruído com *reads* da amostra B0, logo à frente da geleira Baranowski. Foram encontradas completas o ciclo do ácido cítrico, a via da pentose fosfato e o ciclo do glioxilato, além da via da glicólise incompleta. Poucos genes do metabolismo do enxofre e nitrogênio estavam presentes, apenas relacionados à produção de aminoácidos. Alguns genes como *quitinase*, *hexA_B* e *nagZ* de degradação de carboidratos complexos também estavam presentes.

Quanto à biossíntese de metabólitos secundários, apenas a via completa de produção de ácido lipoico estava presente; outras vias incompletas compreenderam biossíntese de antimicrobianos como estreptomicina e monobactam.

Genes de reparo de DNA como *gyrAB*, *topAB*, *recA* e *uvrABCD*, também se destacaram no MAG, além de genes de choque térmico como *dnaJ*, *cspA* e *htpX* e de resistência a beta-lactam, vancomicina e de sistema de proteção multidrogas.

Nenhum gene específico de produção de biofilme foi encontrado, porém, os genes *tad* e *cpa*, formadores de pilus para transferência horizontal de genes, estavam presentes.

5.4. *Co-assembly* (combinação de todas as amostras)

Na abordagem *co-assembly* foram reconstruídos 57 genomas e, dentre eles, dois de alta qualidade, 16 de média qualidade e 39 de baixa qualidade. Esses genomas utilizaram 48.169 contigs (cerca de 20% de todos os contigs montados a partir das reads de metagenoma) e 258,14Mb (cerca de 49% de todos os nucleotídeos do banco de dados de contigs). A lista completa de genomas com sua qualidade e informação taxonômica pelo GTDB-tk está na Tabela 10.

No domínio Bacteria, os MAGs compreenderam integrantes do filo Bacteroidota, classes Bacteroidia (31 MAGs) e Ignavibacteria (1 MAG); filo Proteobacteria, classes Gammaproteobacteria (5 MAGs) e Alphaproteobacteria (1 MAG); filo Actinobacteriota, classes Actinomycetia (5 MAGs), Thermoleophilia (2 MAGs) e Acidimicrobiia (1 MAG); filo Gemmatimonadota, classe Gemmatimonadetes (2 MAGs); filo Cyanobacteria, classe Cyanobacteriia (3 MAGs); filo Verrucomicrobiota, classe Verrucomicrobiae (2 MAGs); filo Acidobacteriota, classe Vicinamibacteria (1 MAG); Patescibacteria, classes Saccharimonadia (1 MAG) e Dojkabacteria (1 MAG). No domínio Archaea, o único integrante foi um MAG do filo Thermoproteota, classe Nitrososphaeria (Figura 20).

No mapa de calor do recrutamento de reads (Figura 21), é possível perceber que as amostras da galeria Baranowski foram as que mais contribuíram na reconstrução dos bins B0, B50, B100, B200, B300 e B400.

Tabela 10. Classificação taxonômica (até nível de gênero) pelo GTDB-Tk e qualidade (completude e redundância) pelo CheckM dos MAGs da abordagem co-assembly.

MAGs	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Completude CheckM	Contaminação CheckM
MAG_01	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Cytophagales	Cyclobacteriaceae	<i>Algoriphagus</i>	73,81%	18,95%
MAG_02	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprospiraceae		91,50%	1,01%
MAG_03	Bacteria	Actinobacteriota	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae	CADCVQ01	84,84%	4,27%
MAG_04	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Saccharospirillaceae	<i>Reinekea</i>	85,43%	14,92%
MAG_05	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Aquaticitalea</i>	81,58%	2,78%
MAG_06	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	AKYH767-A	OLB10		72,01%	24,71%
MAG_07	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprospiraceae		86,21%	16,09%
MAG_08	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	74,17%	9,28%
MAG_09	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae		95,84%	0,25%
MAG_10	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Pseudoxanthomonas_A</i>	80,38%	36,21%
MAG_11	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia				72,11%	29,12%
MAG_12	Bacteria	Actinobacteriota	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae	CADCVQ01	68,65%	15,13%
MAG_13	Bacteria	Actinobacteriota	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales			85,39%	2,14%
MAG_14	Archaea	Thermoproteota	Nitrososphaeria	Nitrososphaerales	Nitrososphaeraceae		87,87%	0,00%
MAG_15	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	JJ008	82,26%	0,83%
MAG_16	Bacteria	Gemmatimonadota	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae		81,80%	5,59%
MAG_17	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae		65,20%	11,83%
MAG_18	Bacteria	Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Akkermansiaceae	UBA1315	71,80%	23,47%
MAG_19	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae		63,12%	25,76%
MAG_20	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae		57,55%	15,22%
MAG_21	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Mycobacteriales	Mycobacteriaceae	<i>Rhodococcus</i>	75,36%	23,2%
MAG_22	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Lacibacter</i>	72,73%	1,08%
MAG_23	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Propionibacteriales	Nocardioideaceae	<i>Aeromicrobium</i>	67,89%	14,7%

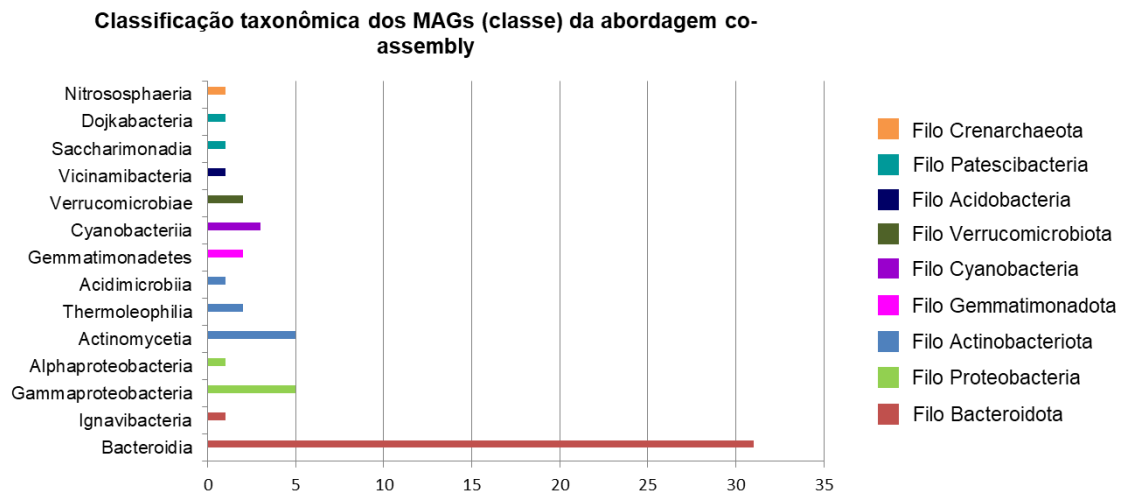
MAGs	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Completo de CheckM	Contaminação CheckM
MAG_24	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Ferruginibacter</i>	69,23%	1,90%
MAG_25	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae		84,40%	5,17%
MAG_26	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Actinomycetales	Microbacteriaceae	<i>Rhodoglobus</i>	84,90%	12,85%
MAG_27	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Palsa-955	75,80%	1,00%
MAG_28	Bacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteriia	Cyanobacteriales	Microcoleaceae	<i>Microcoleus</i>	53,84%	0,87%
MAG_29	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Ferruginibacter</i>	80,02%	0,49%
MAG_30	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomicrobium</i>	71,08%	20,57%
MAG_31	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae		85,38%	4,57%
MAG_32	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Segetibacter</i>	80,24%	12,63%
MAG_33	Bacteria	Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Akkermansiaceae	UBA1315	40,03%	0,68%
MAG_34	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter_A</i>	76,95%	19,66%
MAG_35	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	40,32%	8,03%
MAG_36	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	JJ008	62,55%	1,48%
MAG_37	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	JJ008	51,97%	0,99%
MAG_38	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Flavisolibacter</i>	79,79%	0,74%
MAG_39	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae		56,02%	15,93%
MAG_40	Bacteria	Patescibacteria	Saccharimonadia	Saccharimonadales			49,77%	14,85%
MAG_41	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	NS11-12g			51,28%	15,93%
MAG_42	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria				36,29%	0,70%
MAG_43	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae		30,21%	5,59%
MAG_44	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae		48,98%	11,73%
MAG_45	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	UBA10324		46,73%	1,51%
MAG_46	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas_E</i>	2,57%	0,04%
MAG_47	Bacteria	Bacteroidota	Ignavibacteria	SJA-28	B-1AR		45,36%	3,46%
MAG_48	Bacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteriia				11,22%	0,28%
MAG_49	Bacteria	Acidobacteriota	Vicinamibacteria	Vicinamibacterales	2-12-FULL-66-21	JACDCA01	37,88%	3,07%
MAG_50	Bacteria	Patescibacteria	Dojkabacteria				22,44%	1,48%

MAGs	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Completeness CheckM	Contaminação CheckM
MAG_51	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Palsa-955	46,34%	3,69%
MAG_52	Bacteria	Gemmatimonadota	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	UBA4720	42,03%	2,93%
MAG_53	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Palsa-955	39,48%	9,48%
MAG_54	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Flavisolibacter</i>	39,66%	1,72%
MAG_55	Bacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteriia				18,61%	1,4%
MAG_56	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Palsa-955	27,27%	1,72%
MAG_57	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	AKYH767			29,69%	0,34%

Fonte: da Autora.

Apesar dos genomas de alta qualidade, os MAGs reconstruídos via *co-assembly* não foram selecionados para análise metabólica, uma vez que, com essa abordagem, não seria possível diferenciar os perfis funcionais de cada geleira.

Figura 21. Gráfico de barras da classificação taxonômica via GTDB-tk dos MAGs reconstruídos na abordagem *co-assembly*.



Fonte: da Autora.

Figura 22. Mapa de calor do recrutamento de reads dos MAGs reconstruídos na abordagem co-assembly.



Fonte: da Autora.

5.5. Assembly

Na abordagem *assembly*, foram reconstruídos, no total, 52 MAGs, sendo cinco de alta qualidade, nove de média qualidade, e 38 de baixa qualidade. A partir

das amostras C0, C3, C50 e C400, coletados na geleira Collins, foram reconstruídos apenas 10 genomas, 1 de alta qualidade. As amostras C100 e C300, por possuírem pouco material genético sequenciado, não originaram nenhum *bin*. Já com o DNA das amostras B0, B50, B100, B200, B300 e B400, provenientes da geleira Baranowski, reconstruíram-se 42 genomas no total, sendo 4 de alta qualidade, segundo o CheckM (Tabela 11).

No domínio Bacteria, os MAGs compreenderam integrantes do filo Bacteroidota, classes Bacteroidia (29 MAGs) e Ignavibacteria (1 MAG); filo Proteobacteria, classes Gammaproteobacteria (6 MAGs) e Alphaproteobacteria (2 MAGs); filo Actinobacteriota, classes Actinomycetia (5 MAGs), Thermoleophilia (3 MAGs) e Acidimicrobiia (1 MAG); filo Gemmatimonadota, classe Gemmatimonadetes (2 MAGs); filo Cyanobacteria, classe Cyanobacteriia (2 MAGs). No domínio Archaea, o único integrante foi um MAG do filo Thermoproteota, classe Nitrososphaeria (Figura 22).

Esse tipo de abordagem, no entanto, não foi a ideal para o estudo da microbiota das geleiras, uma vez que a quantidade e a qualidade de bins por amostra não foram suficientes para sua utilização na anotação funcional.

Com a finalidade de inferir sobre a sucessão ecológica microbiana do recuo das geleiras Collins e Baranowski, seria necessário um sequenciamento com maior cobertura das amostras de solo de recuo de geleiras, a fim de obter mais material genético capaz de ser organizado em MAGs de qualidade.

Tabela 11. Classificação taxonômica (até nível de gênero) pelo GTDB-tk e qualidade (completude e redundância) pelo CheckM dos MAGs da abordagem assembly.

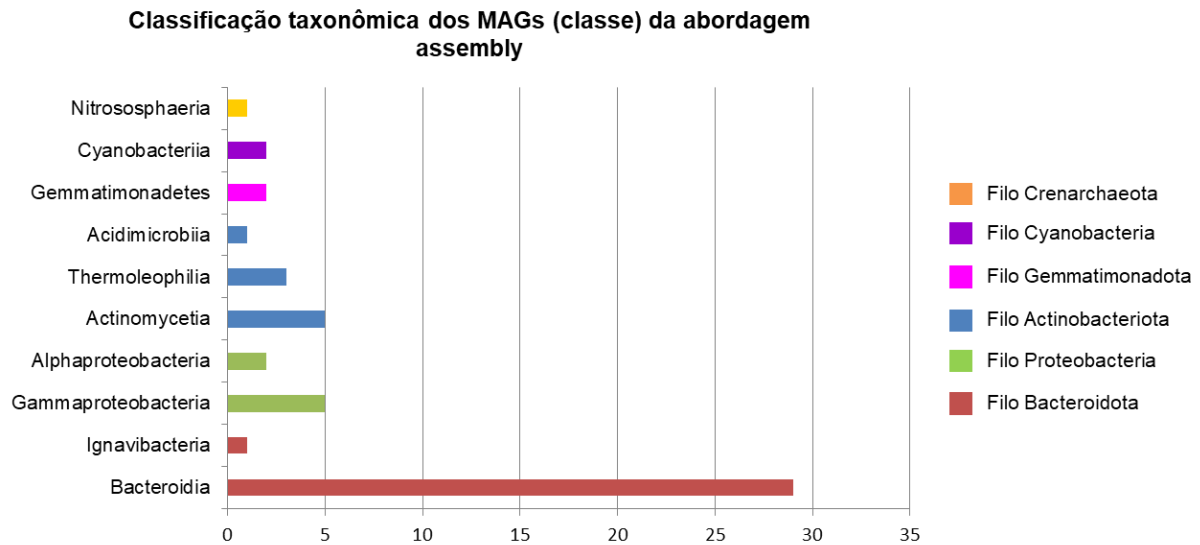
Amostra	MAG	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie	Completude CheckM (%)	Contaminação CheckM (%)
1	MAG1	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	JJ008		69,99%	7,77%
1	MAG2	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Ferruginibacter</i>		36,55%	6,08%
2	MAG3	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	JJ008		54,29%	8,62%
2	MAG4	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	AKYH767	B-17BO			53,81%	18,07%
2	MAG5	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Palsa-955		53,51%	24,47%
2	MAG6	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae			32,76%	12,07%
3	MAG7	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Palsa-955		95,81%	2,5%
3	MAG8	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Ferruginibacter</i>		82,10%	68,23%
7	MAG9	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Palsa-955		72,59%	35,02%
7	MAG10	Archaea	Thermoproteota	Nitrososphaeria	Nitrososphaerales	Nitrososphaeraceae			88,60%	3,27%
8	MAG11	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>		40,48%	1,41%
8	MAG12	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium sp001529295</i>	93,72%	13,66%
8	MAG13	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Thermomonas</i>		44,75%	9,50%
8	MAG14	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Cytophagales	Cyclobacteriaceae	<i>Algoriphagus</i>	<i>Algoriphagus ratkowskyi</i>	97,56%	5,82%
8	MAG15	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Psychrobacter</i>		64,93%	15,01%
8	MAG16	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Mycobacteriales	Mycobacteriaceae	<i>Rhodococcus</i>		99,59%	3,44%
8	MAG17	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	CAISIP01		37,32%	6,06%
8	MAG18	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas_E</i>		33,78%	3,76%
8	MAG19	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Actinomycetales	Microbacteriaceae	<i>Rhodoglobus</i>		84,81%	4,96%
8	MAG20	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Spongiibacteraceae_A	<i>Dasania</i>		36,83%	1,72%
10	MAG21	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Mycobacteriales	SCTD01	SCTD01		56,38%	30,17%
10	MAG22	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Propionibacteriales	Nocardioideaceae	<i>Aeromicrobium</i>		84,48%	12,04%
10	MAG23	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomicrobium</i>		76,21%	24,09%

Amostra	MAG	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie	Completeness CheckM (%)	Contaminação CheckM (%)
10	MAG24	Bacteria	Gemmatimonadota	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	JACDCY01		85,71%	3,50%
10	MAG25	Bacteria	Actinobacteriota	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae	SEOHO-28		43,13%	2,78%
10	MAG26	Bacteria	Actinobacteriota	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae	CADCVQ01		37,07%	10,34%
10	MAG27	Bacteria	Actinobacteriota	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae	CADCVQ01		36,69%	9,48%
10	MAG28	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomicrobium</i>		39,99%	16,90%
10	MAG29	Bacteria	Actinobacteriota	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	GCA-2861595			94,21%	87,61%
10	MAG30	Bacteria	Actinobacteriota	Actinomycetia	Mycobacteriales	Frankiaceae			59,51%	15,26%
10	MAG31	Bacteria	Gemmatimonadota	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	UBA4720		56,85%	12,29%
11	MAG32	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Palsa-955		65,46%	40,63%
11	MAG33	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Ferruginibacter</i>		52,43%	5,44%
11	MAG34	Bacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteriia	Cyanobacteriales	Microcoleaceae	<i>Microcoleus</i>		75,81%	1,00%
11	MAG35	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Aquaticitalea</i>		94,37%	1,77%
11	MAG36	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Palsa-955		38,00%	28,31%
11	MAG37	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Parafilimonas</i>		61,72%	17,67%
11	MAG38	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprospiraceae			39,79%	14,39%
12	MAG39	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae			60,34%	34,14%
12	MAG40	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Palsa-955		32,71%	18,52%
12	MAG41	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Aquaticitalea</i>		91,31%	2,75%
12	MAG42	Bacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteriia	Cyanobacteriales	Microcoleaceae	<i>Microcoleus</i>		71,64%	3,79%
12	MAG43	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae			45,04%	24,63%
12	MAG44	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae			47,08%	12,32%
12	MAG45	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Saprospiraceae			54,60%	23,01%
13	MAG46	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Palsa-955		94,75%	4,59%
13	MAG47	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae			59,43%	28,87%
14	MAG48	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	JJ008		86,21%	39,14%
14	MAG49	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Aquaticitalea</i>		79,9%	13,9%

Amostra	MAG	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie	Completeness CheckM (%)	Contaminação CheckM (%)
14	MAG50	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Ferruginibacter</i>		53,25%	27,85%
14	MAG51	Bacteria	Bacteroidota	Ignavibacteria	SJA-28	B-1AR			64,43%	8,93%

Fonte: da Autora.

Figura 23. Gráfico de barras da classificação taxonômica via GTDB-tk dos MAGs reconstruídos na abordagem *assembly*.



Fonte: da Autora.

5.6. Pangenômica e filogenômica

O pangenoma foi realizado com o objetivo de comparar dois MAGs selecionados com seus respectivos genomas de referência. Os MAGs selecionados foram: COL_MAG_00001 e BAR_MAG_00002. O valor de ANI, AAI e DDH para os MAGs e os genomas de banco de dados estão retratados na Tabela 12. Para o COL_MAG_00001, não foi possível calcular o ANI, pois não houve determinação de sua taxonomia a nível de gênero, logo, o cálculo de proximidade evolutiva do MAG em relação aos genomas de banco de dados não foi satisfatória.

Tabela 12. Valores de ANI, AAI e DDH para evidenciar as relações filogenéticas entre os MAGs e os genomas de banco de dados.

MAG	Genoma do NCBI	ANI	AAI	DDH
COL_MAG_00001	CP007536	Inconclusivo	56.00%	18.80%
COL_MAG_00001	CP012850	Inconclusivo	52.24%	31.20%
COL_MAG_00001	CP017922	Inconclusivo	52.13%	35.90%
COL_MAG_00001	CP007174	Inconclusivo	55.56%	30.00%
COL_MAG_00001	CP002408	Inconclusivo	56.34%	30.20%
BAR_MAG_00002	CP034152	81.58%	82.66%	22.60%
BAR_MAG_00002	CP010797	77.64%	64.00%	19.10%
BAR_MAG_00002	CP024890	77.30%	66.81%	18.60%
BAR_MAG_00002	CP050124	81.46%	82.68%	22.60%
BAR_MAG_00002	CP070609	78.54%	70.25%	19.40%

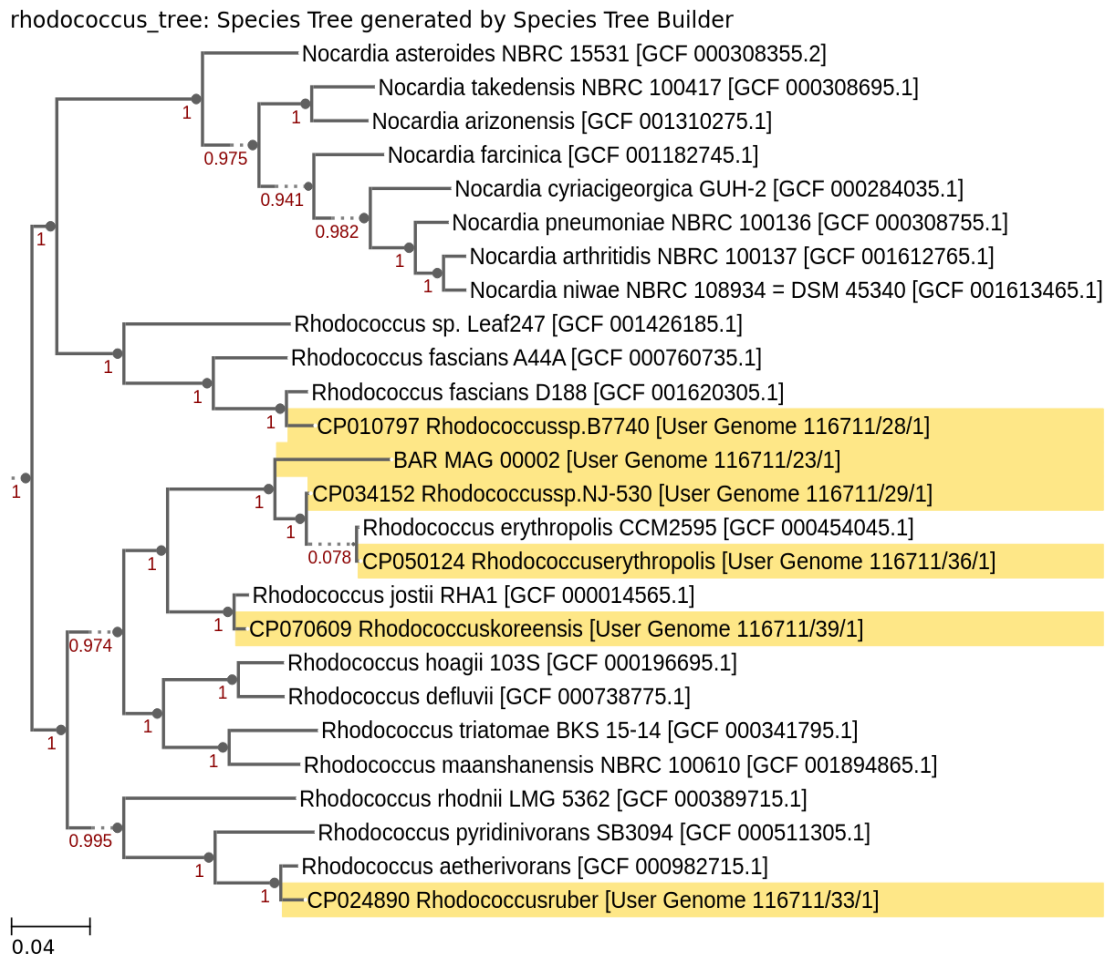
Fonte: da Autora

5.6.1. BAR_MAG_00002

Rhodococcus (BAR_MAG_00002) é uma bactéria aeróbia já isolada do oceano, sedimentos costeiros e solos alpinos, árticos e antárticos. Novamente, o que mais se destaca sobre o gênero é sua capacidade de degradação de compostos complexos naturais e tóxicos e recalcitrantes, como aromáticos, fenóis, alcanos e petróleo a partir de grandes plasmídios que abrigam genes de diversas vias catabólicas (FINNERTY, 1992; LARKIN; KULAKOV; ALLEN, 2005; KUYUKINA; IVSHINA, 2019). *Rhodococcus* também inclui os produtos da degradação em vias importantes do metabolismo do carbono, como o ciclo do ácido cítrico (MARTÍNKOVÁ *et al.*, 2008; ZAMPOLLI *et al.*, 2019). Na análise de pangenoma, foram encontrados 1747 *clusters* do *core genome*, 4402 *clusters* do *accessory genome* e 959 *clusters* do *singleton* do BAR_MAG_00002.

A árvore filogenética do BAR_MAG_00002 e os genomas de referência possui relativa consistência e estabilidade dos clados (Figura 23), com exceção do genoma CP050124, que teve seu agrupamento com um baixo valor de *bootstrap*. O MAG, por sua vez, agrupou com os genomas CP034152 (com o qual também possui o ANI mais alto) e CP050124, logo, o MAG tem alta probabilidade de ser uma espécie-irmã de *Rhodococcus erythropolis*. O valor de DDH para o MAG e esses genomas de referência obteve um valor baixo, indicando que, de fato, são espécies distintas.

Figura 24. Árvore filogenética com os gêneros *Rhodococcus* e *Nocardia*, explicitando a íntima relação do BAR_MAG_00002 e *Rhodococcus erythropolis*. Os genomas grifados em amarelo são os genomas adicionados para a análise.



Fonte: da Autora.

A espécie *Rhodococcus erythropolis* é uma bactéria psicrófila já conhecida por habitar a Antártica, mais especificamente a Ilha Rei George (GOUVÊA TAKETANI *et al.*, 2013). Assim como outras espécies do mesmo gênero, também é alvo de estudos para uso na biodegradação de compostos orgânicos (IBRAHIM *et al.*, 2020), alcanos e álcoois em condições extremas (DE CARVALHO, 2012). Do ponto de vista médico, essa espécie fornece enzimas capazes de controlar doenças como HIV e hepatite B (DE CARVALHO; DA FONSECA, 2005).

Os *clusters* e os genes *singletons* do MAG foram analisados nos programas DRAM, Patric e no BLASTp do NCBI. O BLASTp é uma ferramenta que permite a comparação de proteínas de interesse com proteínas do banco de dados, trazendo informações de porcentagem de identidade, cobertura de sequência, e o valor E

(que determina se a correspondência entre as duas proteínas pode ser encontrada ao acaso).

No Patric, foi encontrado o gene da monooxigenase contendo flavina (*fmo*), que possui uma função antitóxica, tornando xenobióticos em compostos mais fáceis de eliminação (ESWARAMOORTHY *et al.*, 2006; RIOZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011). Outro gene de resistência a substância tóxica é *terD*, que confere proteção contra o semi-metal telúrio, conhecido por gerar estresse oxidativo (NGUYEN *et al.*, 2021).

Genes de degradação de compostos aromáticos também foram detectados, como ciclohexanona monooxigenase (*chnB*) e 3,4-dihidroxitlato decarboxilase (*phtC*). *phtC* faz parte da via de degradação do ftalato e seus isômeros mas é comumente encontrado no plasmídeo de *Rhodococcus*, como no estudo de Vamsee-Krishna e Phale (2008). Por outro lado, Sekine *et al.* (2006) analisou os três plasmídeos de *Rhodococcus erythropolis* e chegou à conclusão de que a via codificada pelo plasmídeo pREL1 não é necessária para a degradação de alguns hidrocarbonetos, função esta que também pode ser realizada pelo cromossomo.

Genes de resistência a antibióticos como bleomicina e beta-lactam também estavam presentes; além de transportadores do tipo MFS, que, dependendo de sua caracterização, podem ter um papel importante no efluxo de antibióticos.

Outra classe de genes encontrados no *singleton* do MAG codificaram para transposase (IS3/IS911/IS110) e integrase (*ritC*). Os integrons são formados por cassete de genes, como, por exemplo, de resistência a antibiótico, e por um gene que codifica para uma enzima que realizará a excisão e a inserção desse integron no DNA. O integron é considerado armazém e fonte de genes (COWAN *et al.*, 2005), e pode ser propagado para outras células em eventos de transferência horizontal (DOMINGUES *et al.*, 2012; ENGELSTÄDTER; HARMS; JOHNSEN, 2016), com auxílio de genes de montagem de pilus, como *tad*, *cpa* e *pil*, presentes no genoma e encontrados na análise metabólica.

No MAG, segundo BLASTp, foram encontrados correspondências de seus clusters com genes de transposase (transposases das famílias IS630 e IS256). As transposases permitem a mobilidade dos transposons, que são elementos genômicos móveis, levando genes (por exemplo, de degradação) de um cromossomo ou plasmídeo para outro, facilitando a transferência horizontal. Outro gene presente foi *xerD*, uma recombinase sítio-específica que aumenta variabilidade genética bacteriana (BLAKELY; DAVIDSON; SHERRATT, 1997).

Estavam presentes genes de sistemas de toxina-antitoxina *higA*, *hipA*, *hicA* e *hicB*. Esse sistema é amplamente utilizado nas bactérias (em geral patogênicas) para assegurar a herança de um determinado plasmídeo às células-filhas após a reprodução (SCHURECK *et al.*, 2014; PAGE; PETI, 2016; GUO *et al.*, 2019). Porém, ainda não se sabe com clareza a função desses operons em cromossomos bacterianos.

Além disso, também houve correspondência com genes que codificam proteínas contra estresse, como por exemplo, *hsp70*, que produz uma chaperona, auxiliando no enovelamento de outras proteínas; importante para manter a integridade das proteínas após mudanças de temperatura (MAYER; BUKAU, 2005). Alguns estudos vêm evidenciando a capacidade de proteínas de choque-térmico de proteger alguns organismos frente às mudanças climáticas, como “biomarcadores de estresse”, no entanto, ainda não há consenso sobre o assunto (CLARK; PECK, 2009; CHEN; FEDER; KANG, 2018). Também estava presente gene que codifica uma proteína de estresse universal (*usp*), que possui funções diversas de proteção do DNA e resistência a condições ambientais extremas, como baixas temperaturas, compostos tóxicos e estresse oxidativo (KVINT *et al.*, 2003; CHI *et al.*, 2019; PÁTEK; GRULICH; NEŠVERA, 2021).

Genes de reguladores transcricionais são de extrema importância e controlam a expressão de proteínas de resistência a estresses e drogas (no caso de MarR) (HÜNNEFELD *et al.*, 2019), metal (no caso de MerR) (BROWN *et al.*, 2003), detoxificação de ácidos aromáticos (no caso de PadR) (PARK *et al.*, 2017) e controle de espécies reativas de oxigênio e resistência a altas temperaturas (no caso de XRE) (HU *et al.*, 2019).

De modo geral, os genes presentes no singleton do BAR_MAG_00002 têm funções de resistência e proteção de DNA, uma vez que as pressões da Antártica selecionam os organismos que melhor se adaptam às condições adversas do local.

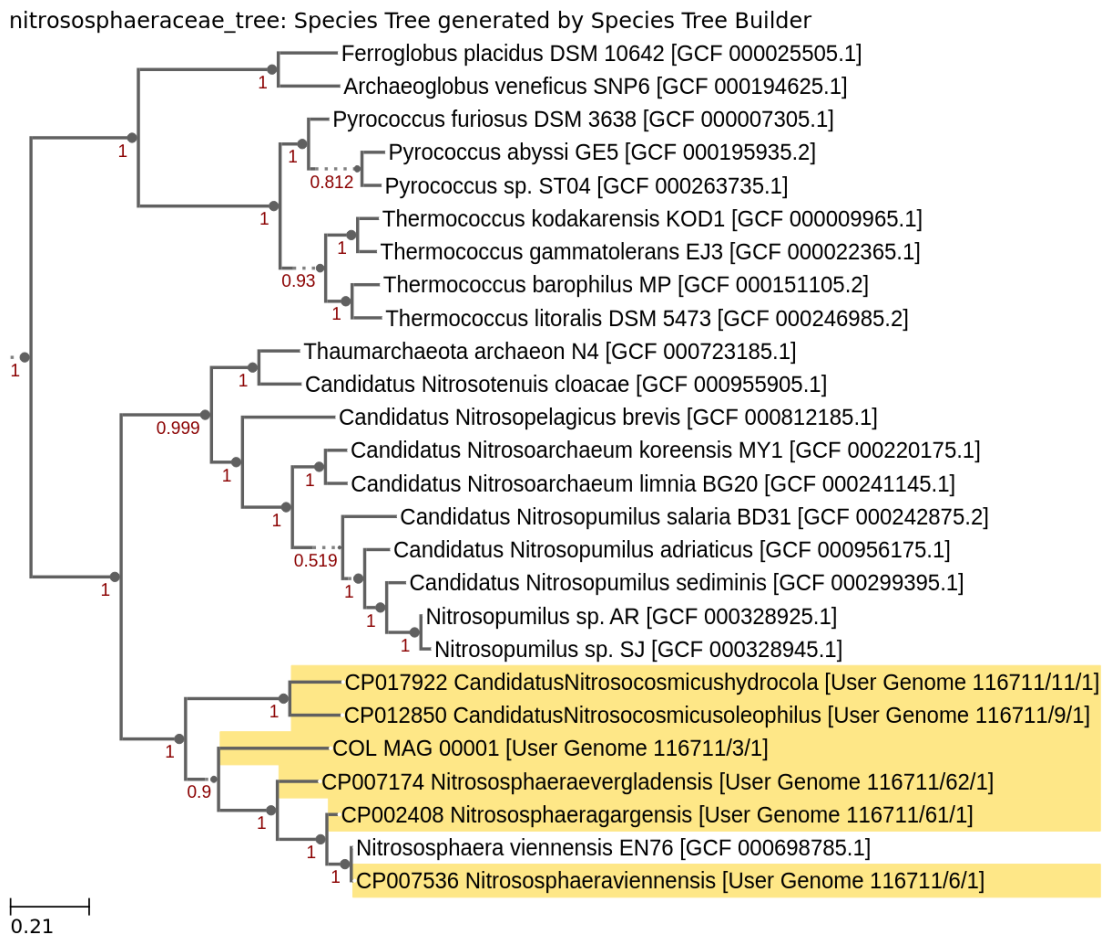
5.6.2. COL_MAG_00001

A família Nitrososphaeraceae compreende arqueias oxidadoras de amônia, convertendo amônia em nitrito via hidroxilamina. A importância desse grupo é que essas arqueias podem oferecer nitrogênio para outros organismos, uma vez que esse fator é limitante para o crescimento. Na análise de pangenoma, foram

encontrados 629 *clusters* do *core genome*, 1479 *clusters* do *accessory genome* e 1067 *clusters* do *singleton* do COL_MAG_00001.

A árvore filogenética também foi gerada para MAG_COL_00001 e seus genomas de referência (Figura 24), possuindo altos valores de *bootstrap*, trazendo confiança para a árvore como um todo. A família Nitrososphaeraceae compreende apenas dois gêneros (KEROU; SCHLEPER, 2016), *Nitrosocosmicus* e *Nitrososphaera*. Considerando a proximidade do clado do MAG dos genomas de *Nitrososphaera* e sua estabilidade, é provável que sejam do mesmo gênero. Por enquanto, não é possível confirmar se o MAG configura uma espécie nova, uma vez que o genoma não está completo e possui alguma contaminação.

Figura 25. Árvore filogenética com os gêneros de Thaumarchaeota e Euryarchaeota, confirmando a proximidade do MAG e dos genomas de *Nitrososphaera*. Os genomas grifados em amarelo são os genomas adicionados para a análise.



Fonte: da Autora.

Em geral, não foram encontrados muitos genes no *singleton* do MAG. O genoma é pequeno (cerca de 2kb) e não há uma alta variação de genes entre os genomas analisados, se comparado com o pangenoma de BAR_MAG_00002.

O gene *alkA* foi encontrado no genoma a partir da análise do software DRAM. *alkA* é gene condificante de uma enzima de reparo de DNA que atua após a exposição da bactéria a um agente alquilante. Já a análise pelo BLASTp retornou outros genes que produzem proteínas de reparo de DNA, como *top1*, grupo de DNA ligases capazes de reconstituir quebras de dupla fita, *mpg* (retira bases lesionadas da molécula de DNA (METZ; HOLLIS; EICHMAN, 2007)), *nurA*, *mutT* e *usvE* (reparo de dano causado por raios UV).

Diversos genes de resistência a substâncias tóxicas foram encontrados, como de transportadores DMT e MFS e famílias de proteínas MarR e DedA, que estão relacionados à exportação e resistência à drogas; *vgb*, *GLX1*, genes de proteína ligadora a penicilina e família de proteínas GNAT e metalohidrolase atuam na proteção contra antibióticos. *egtD* faz parte da via de biossíntese de ergotioneína, conhecido por suas propriedades antioxidantes (HARTMAN, 1990); e genes que codificam proteínas com domínios prolil-hidrolase também têm um papel na adaptação da célula à hipóxia. Também foi encontrado um gene relacionado a biofilme no singleton, *pgaC*, diferente de *cpdA* e *wecC* encontrados durante a anotação funcional.

Novamente, os genes que mais aparecem no *singleton* do COL_MAG_00001 estão relacionados a reparo de DNA e resistência, comumente associados às condições extremas encontradas nos habitats polares.

6. CONCLUSÃO

A análise taxonômica dos *reads* metagenômicos das amostras gerou resultados parecidos aos obtidos na análise de RNAr 16S realizada por Laforce (2019) com o mesmo conjunto de dados. A geleira Collins possui uma cronosequência com comunidades muito parecidas em todo o transecto, provavelmente por causa de sua lenta retração (SIMÕES *et al.*, 2015). Esse padrão não se repete para a geleira Baranowski, em que há diferenças entre a composição e abundância relativa dos táxons presentes ao longo do transecto, resultando em quatro estágios de sucessão.

Quanto às análises de alfa e beta diversidade baseadas nos dados metagenômicos, demonstrou-se que as etapas de sucessão ecológica para as cronosequências das duas geleiras seguem padrões diferentes. Na geleira Collins, a maioria das amostras apresentam grupos taxonômicos abundantes semelhantes; porém, a alfa diversidade aumenta conforme a progressão da cronosequência. Para a geleira Baranowski, as amostras do início do transecto possuem maior diversidade, que diminui nas etapas intermediárias, mas retorna a valores mais altos nas etapas finais da sucessão. Essa diferenciação entre as geleiras pode ser explicada pelas particularidades ambientais de cada local (DUARTE, 2010) e pelo seu tempo de retração.

Foi possível reconstruir MAGs através de três abordagens: *co-assembly* por geleira, *co-assembly* (ao combinar todas as amostras) e *assembly*. A melhor abordagem para esse conjunto de dados foi o *co-assembly* por geleira, que permitiu estudar as particularidades de cada geleira e reconstruir MAGs de qualidade suficiente para as anotações funcionais. Com as amostras da geleira Baranowski, foi possível reconstruir mais MAGs e com presença de diferentes táxons de Bacteria dentre os genomas, como das classes Bacteroidia, Ignavibacteria, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Actinomycetia, Thermoleophilia, Acidimicrobiia, Gemmatimonadetes, Cyanobacteriia, Verrucomicrobiae e Saccharimonadia. Por outro lado, com as amostras da geleira Collins, apenas MAGs das classes Cyanobacteriia e Bacteroidia (no domínio Bacteria) foram reconstruídos, além de um genoma de Archaea, da família Nitrososphaeraceae.

A anotação funcional permitiu esclarecer o metabolismo dos microorganismos heterotróficos e aeróbios dos solos associados às geleiras Collins e

Baranowski. Uma vez que o carbono e o nitrogênio são nutrientes limitantes, os genes do ciclo do ácido cítrico, de fixação de carbono e assimilação de nitrogênio trazem funções importantes para a manutenção do microbioma no recuo de geleiras. Genes de resistência a estresses e drogas são elementos importantes de sobrevivência na Antártica e também estavam presentes na maioria dos MAGs obtidos. Os MAGs exibiram também genes de degradação de carboidratos complexos e compostos aromáticos, revelando sua importância na reciclagem da matéria orgânica e, potencialmente, nos processos de remineralização nos solos antárticos. Além disso, os produtos desses genes possuem potencial aplicação biotecnológica, sendo, portanto, importantes recursos genéticos a serem futuramente explorados.

Nas análises de pangenoma, os genes presentes apenas nos MAGs analisados (*singletons*) revelam sua importância para a sobrevivência dos microorganismos antárticos. Esses genes exclusivos estão relacionados à formação de biofilme, transferência horizontal de genes, resistência a fármacos e resposta à estresses ambientais.

Após elucidar questões sobre o microbioma das áreas de recuo de geleiras a partir de dados metagenômicos e da reconstrução dos genomas, novas perguntas surgiram que poderiam orientar a continuidade deste estudo. Novas amostragens no solo de recuo das geleiras Collins e Baranowski poderiam ser realizadas a fim de acompanhar os efeitos da retração das geleiras ao longo do tempo. Além da metagenômica, outras técnicas, como transcriptômica e proteômica, poderão ser aplicadas nos novos estudos para desvendar a comunidade microbiana ativa nesses locais.

7. REFERÊNCIAS

ABDURAKHMONOV, I. Y. Bioinformatics: Updated Features and Applications. [s.l.] BoD – Books on Demand, 2016.

AISLABIE, J. *et al.* Bacterial diversity associated with ornithogenic soil of the Ross Sea region, Antarctica This article is one of a selection of papers in the Special Issue on Polar and Alpine Microbiology. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 21–36, jan. 2009.

AISLABIE, J. M. *et al.* Bacterial composition of soils of the Lake Wellman area, Darwin Mountains, Antarctica. **Extremophiles**, v. 17, n. 5, p. 775–786, 3 jul. 2013.

ALNEBERG, J. *et al.* Binning metagenomic contigs by coverage and composition. **Nature Methods**, v. 11, n. 11, p. 1144–1146, 14 set. 2014.

ALNEBERG, J. *et al.* Genomes from uncultivated prokaryotes: a comparison of metagenome-assembled and single-amplified genomes. **Microbiome**, v. 6, n. 1, 28 set. 2018.

ALONSO-SÁEZ, L. *et al.* Role for urea in nitrification by polar marine Archaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 44, p. 17989–17994, 30 out. 2012.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 143–169, 1995.

AMARASINGHE, S. L. *et al.* Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. **Genome Biology**, v. 21, n. 1, p. 30, 7 fev. 2020.

ANANDAN, R.; DHARUMADURAI, D.; MANOGARAN, G. P. An Introduction to Actinobacteria. [s.l.] IntechOpen, 2016.

ANESIO, A. M. *et al.* The microbiome of glaciers and ice sheets. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 3, n. 1, 19 abr. 2017.

ANISIMOV, O. A. Potential feedback of thawing permafrost to the global climate system through methane emission. **Environmental Research Letters**, v. 2, n. 4, p. 045016, out. 2007.

ARAGONY-NETO, J., **Determinação e interpretação de características glaciológicas e geográficas com sistema de informações geográficas na área Antártica Especialmente Gerenciada Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica.** 2001. 98 p. Dissertação de mestrado, Pós-Graduação em Sensoriamento Remoto, Centro Estadual de Pesquisas em Sensoriamento Remoto e Meteorologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2001

ARAHAL, D.R. Whole-genome analyses: average nucleotide identity. In **Methods in microbiology**, vol. 41, pp. 103-122. Academic Press, 2014.

ARKIN, A. P. *et al.* KBase: the United States department of energy systems biology

knowledgebase. **Nature biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 566–569, 2018.

ATTWOOD, T. K. *et al.* A global perspective on evolving bioinformatics and data science training needs. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 2, p. 398–404, 29 ago. 2017.

AZIZ, R. K. *et al.* The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 75, 2008.

BAJERSKI, F.; WAGNER, D. Bacterial succession in Antarctic soils of two glacier forefields on Larsemann Hills, East Antarctica. **FEMS microbiology ecology**, v. 85, n. 1, p. 128–142, 1 jul. 2013.

BALTAR, F. *et al.* Towards Integrating Evolution, Metabolism, and Climate Change Studies of Marine Ecosystems. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 34, n. 11, p. 1022–1033, nov. 2019.

BARBARO, E. *et al.* Aerosol and snow transfer processes: An investigation on the behavior of water-soluble organic compounds and ionic species. **Chemosphere**, v. 183, p. 132–138, 1 set. 2017.

BARDGETT, R. D. *et al.* Heterotrophic microbial communities use ancient carbon following glacial retreat. **Biology Letters**, v. 3, n. 5, p. 487–490, 22 out. 2007.

BARDGETT, R. D.; WALKER, L. R. Impact of coloniser plant species on the development of decomposer microbial communities following deglaciation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 555–559, 1 mar. 2004.

BARRY, R. G. The status of research on glaciers and global glacier recession: a review. **Progress in Physical Geography: Earth and Environment**, v. 30, n. 3, p. 285–306, 1 jul. 2006.

BAYAT, A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics. **BMJ**, v. 324, n. 7344, p. 1018–1022, 27 abr. 2002.

BEAM, J. P. *et al.* Niche specialization of novel Thaumarchaeota to oxic and hypoxic acidic geothermal springs of Yellowstone National Park. **The ISME Journal**, v. 8, n. 4, p. 938–951, abr. 2014.

BELLARD, C. *et al.* Impacts of climate change on the future of biodiversity. **Ecology Letters**, v. 15, n. 4, p. 365–377, 18 jan. 2012.

BENDIA, A. G. *et al.* A Mosaic of Geothermal and Marine Features Shapes Microbial Community Structure on Deception Island Volcano, Antarctica. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 7 maio 2018a.

BENDIA, A. G. *et al.* Surviving in hot and cold: psychrophiles and thermophiles from Deception Island volcano, Antarctica. **Extremophiles**, v. 22, n. 6, p. 917–929, 14 ago. 2018b.

BERNARDET, J.-F.; BOWMAN, J. P. The Genus *Flavobacterium*. **The Prokaryotes**, p. 481–531, 2006.

BLAKELY, G. W.; DAVIDSON, A. O.; SHERRATT, D. J. Binding and cleavage of nicked substrates by site-specific recombinases XerC and XerD11 Edited by M. Yaniv. **Journal of Molecular Biology**, v. 265, n. 1, p. 30–39, 10 jan. 1997.

BOFF, C.M. **Micro-organismos do permafrost como indicadores paleoclimáticos da Antártica**. 2018. 126 p. Dissertação de mestrado, Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2018.

BOKHORST, S.; CONVEY, P.; AERTS, R. Nitrogen Inputs by Marine Vertebrates Drive Abundance and Richness in Antarctic Terrestrial Ecosystems. **Current Biology**, v. 29, n. 10, p. 1721-1727.e3, maio 2019.

BORSODI, A. K. *et al.* Biofilm forming bacteria and archaea in thermal karst springs of Gellért Hill discharge area (Hungary). **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 928–937, 30 ago. 2018.

BOWERS, R. M. *et al.* Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 725–731, ago. 2017.

BOWMAN, J. P. *et al.* The microbial composition of three limnologically disparate hypersaline Antarctic lakes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, n. 1, p. 81–88, 1 fev. 2000.

BRANKATSCHK, R. *et al.* Abundances and potential activities of nitrogen cycling microbial communities along a chronosequence of a glacier forefield. **The ISME Journal**, v. 5, n. 6, p. 1025–1037, jun. 2011.

BROWN, M. S. *et al.* Enhanced oceanic CO₂ uptake along the rapidly changing West Antarctic Peninsula. **Nature Climate Change**, v. 9, n. 9, p. 678–683, 26 ago. 2019.

BROWN, N. L. *et al.* The MerR family of transcriptional regulators. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 145–163, jun. 2003.

BROWN, S. P.; JUMPPONEN, A. Contrasting primary successional trajectories of fungi and bacteria in retreating glacier soils. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 2, p. 481–497, 24 set. 2013.

BUERMANS, H. P. J.; DEN DUNNEN, J. T. Next generation sequencing technology: Advances and applications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 10, p. 1932–1941, out. 2014.

CAMERON, E. S. *et al.* Enhancing diversity analysis by repeatedly rarefying next generation sequencing data describing microbial communities. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 22302, 16 nov. 2021.

CAMERON, R. E. *et al.* Microbiology, ecology and microclimatology of soil sites in Dry Valleys of southern Victoria land, Antarctica. Disponível em: <<https://epub.ub.uni-muenchen.de/3449/>> . Acesso em: 22 jul. 2022.

CARRIÇO, J. A. *et al.* A primer on microbial bioinformatics for nonbioinformaticians. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 4, p. 342–349, 1 abr. 2018.

CARY, S. C. *et al.* On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 129–138, fev. 2010.

CAVICCHIOLI, R. *et al.* Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 9, 18 jun. 2019.

CHAPIN III, F. S. *et al.* Consequences of changing biodiversity. **Nature**, v. 405, n. 6783, p. 234–242, maio 2000.

CHAUMEIL, P.-A. *et al.* GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. **Bioinformatics**, 15 nov. 2019.

CHEN, B.; FEDER, M. E.; KANG, L. Evolution of heat-shock protein expression underlying adaptive responses to environmental stress. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 15, p. 3040–3054, 2018.

CHI, Y. H. *et al.* The Physiological Functions of Universal Stress Proteins and Their Molecular Mechanism to Protect Plants From Environmental Stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 5 jun. 2019.

CHONG, C. W. *et al.* Assessment of soil bacterial communities on Alexander Island (in the maritime and continental Antarctic transitional zone). **Polar Biology**, v. 35, n. 3, p. 387–399, 1 mar. 2012b.

CHONG, C. W. *et al.* Patterns in the distribution of soil bacterial 16S rRNA gene sequences from different regions of Antarctica. **Geoderma**, v. 181–182, p. 45–55, 1 jul. 2012a.

CHOWN, S. L. *et al.* Continent-wide risk assessment for the establishment of nonindigenous species in Antarctica. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 13, p. 4938–4943, 5 mar. 2012.

CLARK, M. S. *et al.* Antarctic genomics. **Comparative and Functional Genomics**, v. 5, n. 3, p. 230–238, 2004.

CLARK, M. S.; PECK, L. S. HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: A mini-review. **Marine Genomics**, v. 2, n. 1, p. 11–18, mar. 2009.

CLARKE, K. R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. **Austral Ecology**, v. 18, n. 1, p. 117–143, mar. 1993.

COMMINS, J.; TOFT, C.; FARES, M. A. Computational Biology Methods and Their Application to the Comparative Genomics of Endocellular Symbiotic Bacteria of Insects. **Biological Procedures Online**, v. 11, n. 1, p. 52–78, 11 mar. 2009.

CONVEY, P. Antarctic Climate Change and its Influences on Terrestrial Ecosystems. **Trends in Antarctic Terrestrial and Limnetic Ecosystems**, p. 253–272, 2006.

CONVEY, P.; PECK, L. S. Antarctic environmental change and biological responses. **Science Advances**, v. 5, n. 11, p. eaaz0888, nov. 2019.

CONVEY, P.; SMITH, R. I. L. Responses of terrestrial Antarctic ecosystems to climate change. **Plants and Climate Change**, p. 1–12, 2005.

COOK, A. J. Retreating Glacier Fronts on the Antarctic Peninsula over the Past Half-Century. **Science**, v. 308, n. 5721, p. 541–544, 22 abr. 2005.

COSTA, S. S. *et al.* First Steps in the Analysis of Prokaryotic Pan-Genomes. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 14, p. 1177932220938064, 1 jan. 2020.

COWAN, D. A. *et al.* Microbial ecology and biogeochemistry of continental Antarctic soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

COWAN, D. A. *et al.* Non-indigenous microorganisms in the Antarctic: assessing the risks. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 540–548, 1 nov. 2011.

COWAN, D. A.; TOW, L. A. Endangered Antarctic Environments. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 649–690, out. 2004.

COWAN, D. *et al.* Metagenomic gene discovery: past, present and future. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 321–329, jun. 2005.

COWTON, M. Polar Microbiology: The Ecology, Biodiversity and Bioremediation Potential of Microorganisms in Extremely Cold Environments. **Biodiversity**, v. 17, n. 1-2, p. 74–75, 2 abr. 2016.

DA ROSA, K.K. **Formas e processos do ambiente de deglaciação das Geleiras Wanda e Ecology, Ilha Rei George, Antártica**. 2008. 140 p. Dissertação de mestrado, Pós-Graduação em Geociências, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

DAVIS, J. J. *et al.* The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. **Nucleic Acids Research**, 31 out. 2019.

DE CARVALHO, C. C. C. R. Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and bioremediation under extreme conditions. **Research in Microbiology**, v. 163, n. 2, p. 125–136, 1 fev. 2012.

DE CARVALHO, C. C. C. R.; DA FONSECA, M. M. R. The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 6, p. 715–726, 1 jun. 2005.

DE LA TORRE, J. R. *et al.* Microbial Diversity of Cryptoendolithic Communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3858–3867, 1 jul. 2003.

DENG, J. *et al.* Shifts of tundra bacterial and archaeal communities along a permafrost thaw gradient in Alaska. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 1, p. 222–234, 31 dez. 2014.

DENNIS, P. G. *et al.* Soil bacterial diversity is positively associated with air temperature in the maritime Antarctic. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 25 fev. 2019.

DEPPELER, S. L.; DAVIDSON, A. T. Southern Ocean Phytoplankton in a Changing Climate. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, 16 fev. 2017.

DI BELLA, J. M. *et al.* High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, n. 3, p. 401–414, dez. 2013.

DI MENNA, M. E. Yeasts from Antarctica. **Journal of General Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 295–300, 1 out. 1960.

DICKIE, I. A. Insidious effects of sequencing errors on perceived diversity in molecular surveys. **The New Phytologist**, v. 188, n. 4, p. 916–918, 2010.

DINIZ, W. J. S.; CANDURI, F. REVIEW-ARTICLE Bioinformatics: an overview and its applications. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, 2017.

DOAK, D. F. *et al.* The Statistical Inevitability of Stability-Diversity Relationships in Community Ecology. **The American Naturalist**, v. 151, n. 3, p. 264–276, mar. 1998.

DOMINGUES, S. *et al.* Natural Transformation Facilitates Transfer of Transposons, Integrons and Gene Cassettes between Bacterial Species. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 8, p. e1002837, 2 ago. 2012.

DUARTE, R. T. D. **Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras e permafrost polares.** 2010. 200 p. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.

DYURGEROV, M. B.; MEIER, M. F. Mass Balance of Mountain and Subpolar Glaciers: A New Global Assessment for 1961-1990. **Arctic and Alpine Research**, v. 29, n. 4, p. 379, nov. 1997.

ELSAYED, Y. *et al.* The Genus *Rhodococcus* as a source of novel bioactive substances: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 3, p. 83–92, 2017.

ENGELSTÄDTER, J.; HARMS, K.; JOHNSEN, P. J. The evolutionary dynamics of integrons in changing environments. **The ISME Journal**, v. 10, n. 6, p. 1296–1307, jun. 2016.

EPSTEIN, S. The phenomenon of microbial uncultivability. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 636–642, out. 2013.

EREN, A. M. *et al.* Anvi'o: an advanced analysis and visualization platform for 'omics data. **PeerJ**, v. 3, p. e1319, 8 out. 2015.

ESWARAMOORTHY, S. *et al.* Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 26, p. 9832–9837, 27 jun. 2006.

FANIN, N. *et al.* Soil enzymes in response to climate warming: Mechanisms and feedbacks. **Functional Ecology**, v. 36, n. 6, p. 1378–1395, 9 mar. 2022.

FEISTHAUER, S. *et al.* Differences of heterotrophic $^{13}\text{CO}_2$ assimilation by *Pseudomonas knackmussii* strain B13 and *Rhodococcus opacus* 1CP and potential impact on biomarker stable isotope probing. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1641–1651, 12 mar. 2008.

FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, M. A. *et al.* Microbial succession dynamics along glacier forefield chronosequences in Tierra del Fuego (Chile). **Polar Biology**, v. 40, n. 10, p. 1939–1957, 17 abr. 2017.

FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, M. *et al.* Functional ecology of soil microbial communities along a glacier forefield in Tierra del Fuego (Chile). **International Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 161–173, 2016.

FINNERTY, W. R. The Biology and Genetics of the Genus *Rhodococcus*. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 193–218, 1992.

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

FLINT, E. A.; STOUT, J. D. Microbiology of Some Soils from Antarctica. **Nature**, v. 188, n. 4752, p. 767–768, 1 nov. 1960.

FODEN, W. B. *et al.* Climate change vulnerability assessment of species. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change**, v. 10, n. 1, p. e551, 11 out. 2018.

FOLEY, M. H.; COCKBURN, D. W.; KOROPATKIN, N. M. The *Sus* operon: a model system for starch uptake by the human gut Bacteroidetes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 14, p. 2603–2617, 2 maio 2016.

FOSTER, A. *et al.* The repertoire of nitrogen assimilation in *Rhodococcus*: catalysis, pathways and relevance in biotechnology and bioremediation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 787–802, 2014.

FRANCO, D. C. *et al.* High Prevalence of Gammaproteobacteria in the Sediments of Admiralty Bay and North Bransfield Basin, Northwestern Antarctic Peninsula. **Frontiers in Microbiology**, v. 08, 2 fev. 2017.

FRIOUX, C. *et al.* From bag-of-genes to bag-of-genomes: metabolic modelling of communities in the era of metagenome-assembled genomes. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 1722–1734, 1 jan. 2020.

FUENTES-LEÓN, F. *et al.* DNA Damage Induced by Late Spring Sunlight in Antarctica. **Photochemistry and Photobiology**, v. 96, n. 6, p. 1215–1220, nov. 2020.

GANZERT, L.; BAJERSKI, F.; WAGNER, D. Bacterial community composition and diversity of five different permafrost-affected soils of Northeast Greenland. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 89, n. 2, p. 426–441, 9 jun. 2014.

GARCÍA-LOPEZ, E. *et al.* Microbial Community Structure Driven by a Volcanic Gradient in Glaciers of the Antarctic Archipelago South Shetland. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 392, 14 fev. 2021.

GARCIA-LOPEZ, E.; CID, C. Glaciers and Ice Sheets As Analog Environments of Potentially Habitable Icy Worlds. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 28 jul. 2017.

GARRIDO-BENAVENT, I. *et al.* Differential Colonization and Succession of Microbial Communities in Rock and Soil Substrates on a Maritime Antarctic Glacier Forefield. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 7 fev. 2020.

GAUTHIER, J. *et al.* A brief history of bioinformatics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 6, p. 1981–1996, 27 nov. 2019.

GILAN, I.; SIVAN, A. Effect of proteases on biofilm formation of the plastic-degrading actinomycete *Rhodococcus ruber* C208. **FEMS Microbiology Letters**, v. 342, n. 1, p. 18–23, 18 mar. 2013.

GONZÁLEZ-ROCHA, G. *et al.* Diversity structure of culturable bacteria isolated from the Fildes Peninsula (King George Island, Antarctica): A phylogenetic analysis perspective. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179390, 20 jun. 2017.

GORIS, J. *et al.* DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. Pt 1, p. 81–91, 1 jan. 2007.

GOUVÊA TAKETANI, R. *et al.* Whole-Genome Shotgun Sequencing of *Rhodococcus erythropolis* Strain P27, a Highly Radiation-Resistant Actinomycete from Antarctica. **Genome Announcements**, v. 1, n. 5, p. e00763-13, 31 out. 2013.

GUO, Y. *et al.* Antitoxin HigA inhibits virulence gene *mvfR* expression in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 2707–2723, 2019.

GUO, Y. *et al.* Direct and Indirect Effects of Penguin Feces on Microbiomes in Antarctic Ornithogenic Soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 3 abr. 2018.

GUPTA, P. *et al.* Bacterial diversity of Drass, cold desert in Western Himalaya, and its comparison with Antarctic and Arctic. **Archives of Microbiology**, v. 197, n. 6, p. 851–860, 1 ago. 2015.

GUTT, J. *et al.* Antarctic ecosystems in transition – life between stresses and opportunities. **Biological Reviews**, v. 96, n. 3, p. 798–821, 22 dez. 2020.

HALL, B. L. Late-Holocene advance of the Collins Ice Cap, King George Island, South Shetland Islands. **The Holocene**, v. 17, n. 8, p. 1253–1258, dez. 2007.

HANDELSMAN, J. *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & biology**, v. 5, n. 10, p. R245–R249, 1998.

HANSEN, J. *et al.* GISS analysis of surface temperature change. **Journal of**

Geophysical Research: Atmospheres, v. 104, n. D24, p. 30997–31022, 1 dez. 1999.

HARTMAN, P. E. [32] Ergothioneine as antioxidant. Em: **Methods in Enzymology**. Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants. [s.l.] Academic Press, v. 186 p. 310–318. 1990

HARWANI, D. The Great Plate Count Anomaly and the Unculturable Bacteria. **International Journal of Scientific Research**, v. 2, n. 9, p. 350–351, 1 jun. 2012.

HASIN, Y.; SELDIN, M.; LUSIS, A. Multi-omics approaches to disease. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, 5 maio 2017.

HATTERMANN, T.; LEVERMANN, A. Response of Southern Ocean circulation to global warming may enhance basal ice shelf melting around Antarctica. **Climate Dynamics**, v. 35, n. 5, p. 741–756, out. 2010.

HEAD, S. R. *et al.* Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. **BioTechniques**, v. 56, n. 2, 1 fev. 2014.

HERNÁNDEZ, M. A. *et al.* Central Metabolism of Species of the Genus *Rhodococcus*. **Biology of Rhodococcus**, p. 61–85, 2019.

HILLEBRAND, H.; BENNETT, D. M.; CADOTTE, M. W. Consequences Of Dominance: A Review Of Evenness Effects On Local And Regional Ecosystem Processes. **Ecology**, v. 89, n. 6, p. 1510–1520, jun. 2008.

HODKINSON, I. D.; WEBB, N. R.; COULSON, S. J. Primary Community Assembly on Land - The Missing Stages: Why Are the Heterotrophic Organisms Always There First? **Journal of Ecology**, v. 90, n. 3, p. 569–577, 2002.

HOLMES, B. The Genera *Flavobacterium*, *Sphingobacterium*, and *Weeksella*. **The Prokaryotes**, p. 3620–3630, 1992.

HOPKINS, D. W.; SWANSON, M. M.; TALIAISKY, M. E. What Do We Know About Viruses in Terrestrial Antarctica? **Antarctic Terrestrial Microbiology**, p. 79–90, 2014.

HOSSAIN, Z. Recent Advances and Future Directions of Bioinformatics in Biomedical Engineering Perspective. **International Journal of Innovative Research in Computer Science & Technology**, v. 6, n. 4, jul. 2018.

HU, Y. *et al.* The XRE Family Transcriptional Regulator SrtR in *Streptococcus suis* Is Involved in Oxidant Tolerance and Virulence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 452, 2019.

HÜNNEFELD, M. *et al.* The MarR-Type Regulator MalR Is Involved in Stress-Responsive Cell Envelope Remodeling in *Corynebacterium glutamicum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1039, 21 maio 2019.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465–2466, 1988.

IBRAHIM, S. *et al.* Biosurfactant Production and Growth Kinetics Studies of the Waste Canola Oil-Degrading Bacterium *Rhodococcus erythropolis* AQ5-07 from Antarctica. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3878, 26 ago. 2020.

IINO, T. *et al.* Characterization of nitrate and nitrite utilization system in *Rhodococcus jostii* RHA1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 600–606, 1 jun. 2013.

IPCC, 2007: Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden and C.E. Hanson, Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 976pp.

IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.

IPCC, 2019: Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems [P.R. Shukla, J. Skea, E. Calvo Buendia, V. Masson-Delmotte, H.-O. Pörtner, D. C. Roberts, P. Zhai, R. Slade, S. Connors, R. van Diemen, M. Ferrat, E. Haughey, S. Luz, S. Neogi, M. Pathak, J. Petzold, J. Portugal Pereira, P. Vyas, E. Huntley, K. Kissick, M. Belkacemi, J. Malley, (eds.)]. In press. JAIN, A.; KRISHNAN, K. P. Differences in free-living and particle-associated bacterial communities and their spatial variation in Kongsfjorden, Arctic. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 827–838, 2017.

JIANG, Y. *et al.* Optimal sequencing depth design for whole genome re-sequencing in pigs. **BMC Bioinformatics**, v. 20, n. 1, 8 nov. 2019.

JUNG, M.-Y. *et al.* Enrichment and Characterization of an Autotrophic Ammonia-Oxidizing Archaeon of Mesophilic Crenarchaeal Group I.1a from an Agricultural Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 24, p. 8635–8647, 15 dez. 2011.

JUNG, M.-Y. *et al.* Indications for enzymatic denitrification to N₂O at low pH in an ammonia-oxidizing archaeon. **The ISME Journal**, v. 13, n. 10, p. 2633–2638, out. 2019.

JUNG, M.-Y. *et al.* Isotopic signatures of N₂O produced by ammonia-oxidizing archaea from soils. **The ISME Journal**, v. 8, n. 5, p. 1115–1125, maio 2014.

KANEHISA, M.; BORK, P. Bioinformatics in the post-sequence era. **Nature Genetics**, v. 33, n. S3, p. 305–310, mar. 2003.

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.

KASPARI, S. *et al.* Sources and transport pathways of marine aerosol species into West Antarctica. **Annals of Glaciology**, v. 41, p. 1–9, 2005.

KAŠTOVSKÁ, K. *et al.* Microbial Assemblages in Soil Microbial Succession After Glacial Retreat in Svalbard (High Arctic). **Microbial Ecology**, v. 50, n. 3, p. 396–407, out. 2005.

KAYANI, M. UR R. *et al.* Metagenomic analysis of basal ice from an Alaskan glacier. **Microbiome**, v. 6, n. 1, 5 jul. 2018.

Kazakov A, Novichkov P. Fama: a computational tool for comparative analysis of shotgun metagenomic data. **Great Lakes Bioinformatics conference (poster presentation)**. 2019.

KEROU, M. *et al.* Proteomics and comparative genomics of *Nitrososphaera viennensis* reveal the core genome and adaptations of archaeal ammonia oxidizers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 49, p. E7937–E7946, 18 nov. 2016.

KEROU, M.; SCHLEPER, C. Nitrososphaeraceae. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1–2, 23 dez. 2016.

KIM, M. *et al.* Analytical Tools and Databases for Metagenomics in the Next-Generation Sequencing Era. **Genomics & Informatics**, v. 11, n. 3, p. 102, 2013.

KIM, M. *et al.* Shifts in bacterial community structure during succession in a glacier foreland of the High Arctic. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 1, p. fiw213, 1 jan. 2017.

KIM, O.-S. *et al.* Bacterial diversity in ornithogenic soils compared to mineral soils on King George Island, Antarctica. **Journal of Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1081–1085, dez. 2012.

KNIGHT, P. G. Glaciers: art and history, science and uncertainty. **Interdisciplinary Science Reviews**, v. 29, n. 4, p. 385–393, dez. 2004.

KNIGHT, R. *et al.* Best practices for analysing microbiomes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 410–422, 23 maio 2018.

KOH, E. Y. *et al.* Recent Advances and Future Perspectives in Microbial Phototrophy in Antarctic Sea Ice. **Biology**, v. 1, n. 3, p. 542–556, 22 out. 2012.

KOHLER, T. J. *et al.* Glacier shrinkage will accelerate downstream decomposition of organic matter and alters microbiome structure and function. **Global Change Biology**, v. 28, n. 12, p. 3846–3859, 2022.

KÖNNEKE, M. *et al.* Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO₂ fixation. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences, v. 111, n. 22, p. 8239–8244, 3 jun. 2014.

KOONIN, E. V.; WOLF, Y. I. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 21, p. 6688–6719, 23 out. 2008.

KRAUZE, P. *et al.* Influence of prokaryotic microorganisms on initial soil formation along a glacier forefield on King George Island, maritime Antarctica. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 13135, 23 jun. 2021.

KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B. Application of *Rhodococcus* in Bioremediation of Contaminated Environments. **Biology of Rhodococcus**, p. 231–262, 2010.

KVINT, K. *et al.* The bacterial universal stress protein: function and regulation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 140–145, abr. 2003.

KWON, H. Y. *et al.* Soil development and bacterial community shifts along the chronosequence of the Midtre Lovénbreen glacier foreland in Svalbard. *Journal of Ecology and Environment*, v. 38, n. 4, p. 461–476, 2015.

LAEHNEMANN, D.; BORKHARDT, A.; MCHARDY, A. C. Denoising DNA deep sequencing data—high-throughput sequencing errors and their correction. **Briefings in Bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 154–179, jan. 2016.

LAFORCE D. F. **Efeito das mudanças climáticas na sucessão ecológica microbiana dos solos expostos por recuo das geleiras Baranowski e Collins, Antártica**. 2019. 94 p. Trabalho de conclusão de curso, Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2018.

LAMBRECHTS, S.; WILLEMS, A.; TAHON, G. Uncovering the Uncultivated Majority in Antarctic Soils: Toward a Synergistic Approach. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 15 fev. 2019.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, 4 mar. 2012.

LARKIN, M. J. *et al.* Applied aspects of *Rhodococcus* genetics. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 74, n. 1, p. 133–153, 1 out. 1998.

LARKIN, M. J.; KULAKOV, L. A.; ALLEN, C. C. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility. **Current Opinion in Biotechnology**, Environmental biotechnology/Systems biology. v. 16, n. 3, p. 282–290, 1 jun. 2005.

LEDLEY, T. S. *et al.* Climate change and greenhouse gases. **Eos, Transactions American Geophysical Union**, v. 80, n. 39, p. 453–458, 28 set. 1999.

LEE, J. R. *et al.* Climate change drives expansion of Antarctic ice-free habitat. **Nature**, v. 547, n. 7661, p. 49–54, 28 jun. 2017.

LEE, Y. M. *et al.* Succession of bacterial community structure during the early stage of biofilm development in the Antarctic marine environment. **The Korean Journal of**

Microbiology, v. 52, n. 1, p. 49–58, 31 mar. 2016.

LI, D. *et al.* MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. **Bioinformatics**, v. 31, n. 10, p. 1674–1676, 20 jan. 2015.

LI, M.; CHENG, X.; GUO, H. Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Geomicrobial Ecotoxicology. v. 76, p. 81–85, 1 jan. 2013.

LIN, X. *et al.* Metabolic potential of fatty acid oxidation and anaerobic respiration by abundant members of Thaumarchaeota and Thermoplasmata in deep anoxic peat. **The ISME Journal**, v. 9, n. 12, p. 2740–2744, dez. 2015.

LIU, G.-X. *et al.* Variations in soil culturable bacteria communities and biochemical characteristics in the Dongkemadi glacier forefield along a chronosequence. **Folia Microbiologica**, v. 57, n. 6, p. 485–494, 1 nov. 2012.

LIU, J. *et al.* Diversity and succession of autotrophic microbial community in high-elevation soils along deglaciation chronosequence. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 10, p. fiw160, 1 out. 2016.

LIU, S. *et al.* Abiotic Conversion of Extracellular NH₂OH Contributes to N₂O Emission during Ammonia Oxidation. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 22, p. 13122–13132, 31 out. 2017.

LO GIUDICE, A.; FANI, R. Cold-adapted bacteria from a coastal area of the Ross Sea (Terra Nova Bay, Antarctica): linking microbial ecology to biotechnology. **Hydrobiologia**, v. 761, n. 1, p. 417–441, 6 out. 2015.

LUGLI, G. A. *et al.* Comparative genomic and phylogenomic analyses of the Bifidobacteriaceae family. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 568, 1 ago. 2017.

LUZ, A. P. *et al.* A survey of indigenous microbial hydrocarbon degradation genes in soils from Antarctica and Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 323–333, maio 2004.

MAGURRAN, A. E. Biological diversity. **Current Biology**, v. 15, n. 4, p. R116–R118, fev. 2005.

Magurran, A.E. **Measuring Biological Diversity**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004.

MALHI, Y. *et al.* Climate change and ecosystems: threats, opportunities and solutions. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 375, n. 1794, p. 20190104, 27 jan. 2020.

MÄNNISTÖ, M. K.; TIROLA, M.; HÄGGBLÖM, M. M. Bacterial communities in Arctic fjelds of Finnish Lapland are stable but highly pH-dependent. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, n. 2, p. 452–465, 1 fev. 2007.

MARCOLETA, A. E. *et al.* The highly diverse Antarctic Peninsula soil microbiota as a source of novel resistance genes. **Science of The Total Environment**, v. 810, p.

152003, 1 mar. 2022.

MARTINEZ ALVAREZ, L. *et al.* Identification of key bacterial players during successful full-scale soil field bioremediation in Antarctica. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 168, p. 105354, mar. 2022.

MARTÍNKOVÁ, L. *et al.* Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. **Environment International**, v. 35, n. 1, p. 162–177, 1 jan. 2009.

MASSON-DELMOTTE, V. *et al.* Past and future polar amplification of climate change: climate model intercomparisons and ice-core constraints. **Climate Dynamics**, v. 26, n. 5, p. 513–529, 20 dez. 2005.

MATEOS-RIVERA, A. *et al.* The effect of temperature change on the microbial diversity and community structure along the chronosequence of the sub-arctic glacier forefield of Styggedalsbreen (Norway). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 4, p. fnw038, 1 abr. 2016.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 6, p. 670, 1 mar. 2005.

MAYEWSKI, P. A. *et al.* State of the Antarctic and Southern Ocean climate system. **Reviews of Geophysics**, v. 47, n. 1, 30 jan. 2009.

MAYEWSKI, P. A.; MAASCH, K. A. Recent warming inconsistent with natural association between temperature and atmospheric circulation over the last 2000 years. **Climate of the Past Discussions**, v. 2, n. 3, p. 327–355, 30 jun. 2006.

MCILROY, S. J.; NIELSEN, P. H. The Family Saprospiraceae. **The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea**, p. 863–889, 2014.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 4, p. e1003531, 3 abr. 2014.

MEDINI, D. *et al.* The microbial pan-genome. **Current Opinion in Genetics & Development**, Genomes and evolution. v. 15, n. 6, p. 589–594, 1 dez. 2005.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; KLENK, H.-P.; GÖKER, M. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA–DNA hybridization in the genomic age. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt_2, p. 352–356, 1 fev. 2014.

MEN, Y. *et al.* Biotransformation of Two Pharmaceuticals by the Ammonia-Oxidizing Archaeon *Nitrososphaera gargensis*. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 9, p. 4682–4692, 3 maio 2016.

MENZEL, P.; NG, K. L.; KROGH, A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, 13 abr. 2016.

MEREDITH, M. P.; HOGG, A. M. Circumpolar response of Southern Ocean eddy activity to a change in the Southern Annular Mode. **Geophysical Research Letters**,

v. 33, n. 16, 2006.

MEREDITH, M. P.; KING, J. C. Rapid climate change in the ocean west of the Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century. **Geophysical Research Letters**, v. 32, n. 19, out. 2005.

METZ, A. H.; HOLLIS, T.; EICHMAN, B. F. DNA damage recognition and repair by 3-methyladenine DNA glycosylase I (TAG). **The EMBO Journal**, v. 26, n. 9, p. 2411–2420, 2 maio 2007.

MINDLIN, S. Z.; PETROVA, M. A. On the Origin and Distribution of Antibiotic Resistance: Permafrost Bacteria Studies. **Molecular Genetics, Microbiology and Virology**, v. 32, n. 4, p. 169–179, out. 2017.

MIZUNO, C. M.; RODRIGUEZ-VALERA, F.; GHAI, R. Genomes of Planktonic Acidimicrobiales : Widening Horizons for Marine Actinobacteria by Metagenomics. **mBio**, v. 6, n. 1, 27 fev. 2015.

MOLINA-MONTENEGRO, M. A. *et al.* Adaptive phenotypic plasticity and competitive ability deployed under a climate change scenario may promote the invasion of *Poa annua* in Antarctica. **Biological Invasions**, v. 18, n. 3, p. 603–618, 6 dez. 2015.

MONAGHAN, A. J.; BROMWICH, D. H. ADVANCES IN DESCRIBING RECENT ANTARCTIC CLIMATE VARIABILITY. **Bulletin of the American Meteorological Society**, v. 89, n. 9, p. 1295–1306, 1 set. 2008.

MOR, R.; SIVAN, A. Biofilm formation and partial biodegradation of polystyrene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. **Biodegradation**, v. 19, n. 6, p. 851–858, 1 nov. 2008.

MUANGCHINDA, C. *et al.* Abundance and diversity of functional genes involved in the degradation of aromatic hydrocarbons in Antarctic soils and sediments around Syowa Station. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4725–4735, 22 out. 2014.

MUJAKIĆ, I.; PIWOSZ, K.; KOBLÍŽEK, M. Phylum Gemmatimonadota and Its Role in the Environment. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 151, jan. 2022.

MULLER, R. A.; MACDONALD, G. J. Glacial cycles and orbital inclination. **Nature**, v. 377, n. 6545, p. 107–108, set. 1995.

NAGENDRA, H. Opposite trends in response for the Shannon and Simpson indices of landscape diversity. **Applied Geography**, v. 22, n. 2, p. 175–186, abr. 2002.

NASH, M. V. *et al.* Metagenomic insights into diazotrophic communities across Arctic glacier forefields. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 9, 1 set. 2018.

NEMERGUT, D. R. *et al.* Microbial Community Succession in an Unvegetated, Recently Deglaciaded Soil. **Microbial Ecology**, v. 53, n. 1, p. 110–122, 22 dez. 2006.

NGUYEN, T. T. H. *et al.* Diversity of the Tellurite Resistance Gene Operon in *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 28 maio 2021.

NOBLE, P. A.; CITEK, R. W.; OGUNSEITAN, O. A. Tetranucleotide frequencies in microbial genomes. **Electrophoresis**, v. 19, n. 4, p. 528–535, abr. 1998.

NURK, S. *et al.* metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome Research**, v. 27, n. 5, p. 824–834, 15 mar. 2017.

OREN, A.; GARRITY, G. M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 10, out. 2021.

ORTIZ, M. *et al.* Microbial Nitrogen Cycling in Antarctic Soils. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1442, 21 set. 2020.

ORTIZ, M. *et al.* Multiple energy sources and metabolic strategies sustain microbial diversity in Antarctic desert soils. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 45, 3 nov. 2021.

PACKER, L.; WITT, E. H.; TRITSCHLER, H. J. Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, n. 2, p. 227–250, 1 ago. 1995.

PAGE, R.; PETI, W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 4, p. 208–214, abr. 2016.

PANDEY, K. D. *et al.* Cyanobacteria in Antarctica: ecology, physiology and cold adaptation. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)**, v. 50, n. 5, p. 575–584, 1 jul. 2004.

PAPUDESHI, B. *et al.* Optimizing and evaluating the reconstruction of Metagenome-assembled microbial genomes. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, 28 nov. 2017.

PARK, C. J.; SMITH, J. T.; ANDAM, C. P. Horizontal Gene Transfer and Genome Evolution in the Phylum Actinobacteria. **Horizontal Gene Transfer**, p. 155–174, 2019.

PARK, S. C. *et al.* Structural basis of effector and operator recognition by the phenolic acid-responsive transcriptional regulator PadR. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 22, p. 13080–13093, 15 dez. 2017.

PARKS, D. H. *et al.* CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Research**, v. 25, n. 7, p. 1043–1055, 14 maio 2015.

PÁTEK, M.; GRULICH, M.; NEŠVERA, J. Stress response in *Rhodococcus* strains. **Biotechnology Advances**, v. 53, p. 107698, 1 dez. 2021.

PEARCE, D. A. *et al.* Metagenomic Analysis of a Southern Maritime Antarctic Soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.

PEARCE, D. A. *et al.* Microorganisms in the atmosphere over Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 69, n. 2, p. 143–157, 1 ago. 2009.

PEARCE, D. A.; WILSON, W. H. Viruses in Antarctic ecosystems. **Antarctic**

Science, v. 15, n. 3, p. 319–331, set. 2003.

PELISSARI, C. *et al.* Unraveling the active microbial populations involved in nitrogen utilization in a vertical subsurface flow constructed wetland treating urban wastewater. **Science of The Total Environment**, v. 584-585, p. 642–650, 15 abr. 2017.

PERONDI, C. **Análise da evolução do ambiente proglacial das geleiras Ecology, Sphinks, Baranowski, Tower e Windy, Ilha Rei George, Antártica**. 2018. 123 p. Dissertação de mestrado, Pós-Graduação em Geografia, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2018

PERSHINA, E. V. *et al.* The impacts of deglaciation and human activity on the taxonomic structure of prokaryotic communities in Antarctic soils on King George Island. **Antarctic Science**, v. 30, n. 5, p. 278–288, out. 2018.

PESSI, I. S. *et al.* Distinct composition signatures of archaeal and bacterial phylotypes in the Wanda Glacier forefield, Antarctic Peninsula. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 1, p. 1–10, 1 jan. 2015.

PESSI, I. S. *et al.* Marked Succession of Cyanobacterial Communities Following Glacier Retreat in the High Arctic. **Microbial Ecology**, v. 77, n. 1, p. 136–147, jan. 2019.

PETSCH, C. *et al.* The effects of climatic change on glacial, proglacial and paraglacial systems at Collins Glacier, King George Island, Antarctica, from the end of the Little Ice Age to the 21st century. **Investigaciones geográficas**, n. 103, 2020.

PHILIPPOT, L. *et al.* Distribution of High Bacterial Taxa Across the Chronosequence of Two Alpine Glacier Forelands. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 2, p. 303–312, 9 out. 2010.

PIELOU, E. C. The measurement of diversity in different types of biological collections. **Journal of Theoretical Biology**, v. 13, p. 131–144, dez. 1966.

POINTING, S. B. *et al.* Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 47, p. 19964–19969, 22 out. 2009.

POSTGATE, J. R.; JORGENSEN, B. B. Ecology of the Bacteria of the Sulphur Cycle with Special Reference to Anoxic-Oxic Interface Environments: Discussion. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B**, v. 298, p. 561, 1 set. 1982.

PRITCHARD, H. D. *et al.* Antarctic ice-sheet loss driven by basal melting of ice shelves. **Nature**, v. 484, n. 7395, p. 502–505, abr. 2012.

PURCELL, A. **Diversity and function of sulfur cycling microorganisms in sediments from Subglacial Lake Whillans, Antarctica**. 2014. 91 p. Dissertação de mestrado, University of Tennessee, Knoxville, TN.

QIN, Q.-L. *et al.* A Proposed Genus Boundary for the Prokaryotes Based on

- Genomic Insights. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 12, p. 2210–2215, jun. 2014.
- RAMÍREZ-FERNÁNDEZ, L. *et al.* Diversity of microbial communities and genes involved in nitrous oxide emissions in Antarctic soils impacted by marine animals as revealed by metagenomics and 100 metagenome-assembled genomes. **Science of The Total Environment**, v. 788, p. 147693, set. 2021.
- RAMÍREZ-FERNÁNDEZ, L. *et al.* Diversity of microbial communities and genes involved in nitrous oxide emissions in Antarctic soils impacted by marine animals as revealed by metagenomics and 100 metagenome-assembled genomes. **Science of The Total Environment**, v. 788, p. 147693, set. 2021.
- RAMOS, L. R. *et al.* Firmicutes in different soils of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Polar Biology**, v. 42, n. 12, p. 2219–2226, 1 dez. 2019.
- RATHORE, M. *et al.* Microbial diversity and associated metabolic potential in the supraglacial habitat of a fast-retreating glacier: a case study of Patsio glacier, North-western Himalaya. **Environmental Microbiology Reports**, v. 14, n. 3, p. 443–452, 2022.
- REN, B.; HU, Y.; BU, R. Vertical distribution patterns and drivers of soil bacterial communities across the continuous permafrost region of northeastern China. **Ecological Processes**, v. 11, n. 1, p. 6, 11 jan. 2022.
- REN, M. *et al.* Phylogenomics suggests oxygen availability as a driving force in Thaumarchaeota evolution. **The ISME Journal**, v. 13, n. 9, p. 2150–2161, set. 2019.
- RIJZAANI, H. *et al.* The pangenome of banana highlights differences between genera and genomes. **The Plant Genome**, v. 15, n. 1, 5 jul. 2021.
- RIME, T. *et al.* Vertical distribution of the soil microbiota along a successional gradient in a glacier forefield. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 5, p. 1091–1108, 21 jan. 2015.
- RIOZ-MARTÍNEZ, A. *et al.* Exploring the biocatalytic scope of a bacterial flavin-containing monooxygenase. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 1337, 2011.
- RODRIGUEZ-R, L. M.; KONSTANTINIDIS, K. T. Bypassing Cultivation To Identify Bacterial Species: Culture-independent genomic approaches identify credibly distinct clusters, avoid cultivation bias, and provide true insights into microbial species. **Microbe Magazine**, v. 9, n. 3, p. 111–118, 1 mar. 2014.
- RODRIGUEZ-SANCHEZ, A. *et al.* Membrane bioreactor and hybrid moving bed biofilm reactor-membrane bioreactor for the treatment of variable salinity wastewater: Influence of biomass concentration and hydraulic retention time. **Chemical Engineering Journal**, v. 336, p. 102–111, 15 mar. 2018.
- ROHR, R. P. *et al.* Persist or Produce: A Community Trade-Off Tuned by Species Evenness. **The American Naturalist**, v. 188, n. 4, p. 411–422, out. 2016.
- ROUMPEKA, D. D. *et al.* A Review of Bioinformatics Tools for Bio-Prospecting from

Metagenomic Sequence Data. **Frontiers in Genetics**, v. 8, 6 mar. 2017.

RÜCKAMP, M. *et al.* Observed glacial changes on the King George Island ice cap, Antarctica, in the last decade. **Global and Planetary Change**, v. 79, n. 1, p. 99–109, 1 out. 2011.

RUESS, L. *et al.* Simulated climate change affecting microorganisms, nematode density and biodiversity in subarctic soils. **Plant and Soil**, v. 212, n. 1, p. 63–73, 1 maio 1999.

RUSCHEWEYH, H. *et al.* mOTUs: Profiling Taxonomic Composition, Transcriptional Activity and Strain Populations of Microbial Communities. **Current Protocols**, v. 1, n. 8, ago. 2021.

RUSSELL, N. J. Membrane Components and Cold Sensing. **Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology**, p. 177–190, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1 dez. 1977.

SANYAL, A. *et al.* Microbial communities and their potential for degradation of dissolved organic carbon in cryoconite hole environments of Himalaya and Antarctica. **Microbiological Research**, v. 208, p. 32–42, 1 mar. 2018.

SATHYANARAYANA REDDY, G.; CHATTOPADHYAY, M. K.; SHIVAJI, S. Biodiversity, Adaptation and Biotechnological Importance of Bacteria Occurring in Cold Climates. **Biotechnology of Extremophiles**, p. 47–81, 2016.

SCHOLZ, M. B.; LO, C.-C.; CHAIN, P. S. Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 9–15, fev. 2012.

SCHREIBEROVÁ, O. *et al.* Effect of surfactants on the biofilm of *Rhodococcus erythropolis*, a potent degrader of aromatic pollutants. *New Biotechnology*, **Frontiers and Challenges in the Bioremediation of Contaminated Sites**, v. 30, n. 1, p. 62–68, 15 nov. 2012.

SCHRÖDER, H. *et al.* DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 11, p. 4137–4144, nov. 1993.

SCHULZ, S. *et al.* The role of microorganisms at different stages of ecosystem development for soil formation. **Biogeosciences**, v. 10, n. 6, p. 3983–3996, 18 jun. 2013.

SCHURECK, M. A. *et al.* Structure of the *Proteus vulgaris* HigB-(HigA)₂-HigB Toxin-Antitoxin Complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 2, p. 1060–1070, 10 jan. 2014.

SCHÜTTE, U. M. E. *et al.* Bacterial succession in a glacier foreland of the High Arctic. **The ISME Journal**, v. 3, n. 11, p. 1258–1268, 1 nov. 2009.

SEDLAR, K.; KUPKOVA, K.; PROVAZNIK, I. Bioinformatics strategies for taxonomy independent binning and visualization of sequences in shotgun metagenomics. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 48–55, 1 jan. 2017.

SEKINE, M. *et al.* Sequence analysis of three plasmids harboured in *Rhodococcus erythropolis* strain PR4. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 334–346, fev. 2006.

SHAFFER, M. *et al.* DRAM for distilling microbial metabolism to automate the curation of microbiome function. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. 16, p. 8883–8900, 18 set. 2020.

SHIVAJI, S.; REDDY, G. S. N.; CHATTOPADHYAY, M. K. Bacterial Biodiversity, Cold Adaption and Biotechnological Importance of Bacteria Occurring in Antarctica. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 90, n. 0, 1 mar. 2017.

SIEBER, C. M. K. *et al.* Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 836–843, jul. 2018.

SIGLER, W. V.; ZEYER, J. Colony-Forming Analysis of Bacterial Community Succession in Deglaciated Soils Indicates Pioneer Stress-Tolerant Opportunists. **Microbial Ecology**, v. 48, n. 3, p. 316–323, 24 ago. 2004.

SIMOES, C. L. *et al.* Collins Glacier Retreat Process and Regional Climatic Variations, King George Island, Antarctica. **Geographical Review**, v. 105, n. 4, p. 462–471, 1 out. 2015.

SIMÕES, J. C. *et al.* Morphology and variations of glacial drainage basins in the King George Island ice field, Antarctica. **Annals of Glaciology**, v. 29, p. 220–224, 1999.

SIPES, K. *et al.* Permafrost Active Layer Microbes From Ny Ålesund, Svalbard (79°N) Show Autotrophic and Heterotrophic Metabolisms With Diverse Carbon-Degrading Enzymes. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 3 fev. 2022.

SIVAN, A.; SZANTO, M.; PAVLOV, V. Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 346–352, 1 set. 2006.

SMITH, B. *et al.* Pervasive ice sheet mass loss reflects competing ocean and atmosphere processes. **Science**, v. 368, n. 6496, p. 1239–1242, 12 jun. 2020.

SNIPEN, L.; USSERY, D. W. Standard operating procedure for computing pangenome trees. **Standards in Genomic Sciences**, v. 2, n. 1, p. 135–141, 28 jan. 2010.

STALEY, J. T.; KONOPKA, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, p. 321–346, 1985.

STIEGLMEIER, M. *et al.* *Nitrososphaera viennensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic

and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum Thaumarchaeota. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt 8, p. 2738–2752, ago. 2014.

STRAKA, R. P.; STOKES, J. L. PSYCHROPHILIC BACTERIA FROM ANTARCTICA. **Journal of Bacteriology**, v. 80, n. 5, p. 622–625, nov. 1960.

STRAUSS, S. L.; RUHLAND, C. T.; DAY, T. A. Trends in soil characteristics along a recently deglaciated foreland on Anvers Island, Antarctic Peninsula. **Polar Biology**, v. 32, n. 12, p. 1779–1788, 1 dez. 2009.

STROUS, M. *et al.* The Binning of Metagenomic Contigs for Microbial Physiology of Mixed Cultures. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.

SZIŁO, J.; BIALIK, R. Recession and Ice Surface Elevation Changes of Baranowski Glacier and Its Impact on Proglacial Relief (King George Island, West Antarctica). **Geosciences**, v. 8, n. 10, p. 355, 20 set. 2018.

Team, R.C. R: **A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.** 2013. <http://www.R-project.org/>.

TEELING, H. *et al.* Application of tetranucleotide frequencies for the assignment of genomic fragments. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 938–947, set. 2004.

TETTELIN, H. *et al.* Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial “pan-genome”. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 39, p. 13950–13955, 19 set. 2005.

TOLAR, B. B. *et al.* Oxidation of urea-derived nitrogen by thaumarchaeota-dominated marine nitrifying communities. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 12, p. 4838–4850, 2017.

TSCHERKO, D. *et al.* Biomass and Enzyme Activity of Two Soil Transects at King George Island, Maritime Antarctica. **Arctic, Antarctic, and Alpine Research**, v. 35, n. 1, p. 34–47, 1 fev. 2003b.

TSCHERKO, D. *et al.* Functional diversity of the soil microflora in primary succession across two glacier forelands in the Central Alps. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 4, p. 685–696, 17 out. 2003a.

VAMSEE-KRISHNA, C.; PHALE, P. S. Bacterial degradation of phthalate isomers and their esters. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 19–34, mar. 2008.

VAN DER BEEK, S. L. *et al.* Streptococcal dTDP-L-rhamnose biosynthesis enzymes: functional characterization and lead compound identification. **Molecular Microbiology**, v. 111, n. 4, p. 951–964, abr. 2019.

VAN DIJK, E. L. *et al.* The Third Revolution in Sequencing Technology. **Trends in Genetics**, v. 34, n. 9, p. 666–681, set. 2018.

VAN WOLFEREN, M.; ORELL, A.; ALBERS, S.-V. Archaeal biofilm formation.

Nature Reviews Microbiology, v. 16, n. 11, p. 699–713, nov. 2018.

VANDER SCHAAF, N. *et al.* Cold-Active, Heterotrophic Bacteria from the Highly Oligotrophic Waters of Lake Vanda, Antarctica. **Microorganisms**, v. 3, n. 3, p. 391–406, 24 jul. 2015.

VAUGHAN, D. G. *et al.* Recent rapid regional climate warming on the Antarctic Peninsula. **Climatic Change**, v. 60, n. 3, p. 243–274, 2003.

VAUGHAN, D. G. OCEANS: How Does the Antarctic Ice Sheet Affect Sea Level Rise? **Science**, v. 308, n. 5730, p. 1877–1878, 24 jun. 2005.

VELICHKO, N. *et al.* A survey of Antarctic cyanobacteria. **Hydrobiologia**, v. 848, n. 11, p. 2627–2652, 1 jun. 2021.

VENTER, J. C. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v. 304, n. 5667, p. 66–74, 2 abr. 2004.

VERDE, C. *et al.* Polar Marine Microorganisms and Climate Change. **Advances in Microbial Physiology**, p. 187–215, 2016.

VICINI, L. **Análise multivariada: da teoria à prática**. 2005. 156 p. Trabalho de conclusão de curso, Pós-Graduação em Estatística e Modelagem Quantitativa, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2005.

VINCENT, W. F. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. **Antarctic Science**, v. 12, n. 3, p. 374–385, 1 set. 2000.

WALL, D. H. Biodiversity and ecosystem functioning in terrestrial habitats of Antarctica. **Antarctic Science**, v. 17, n. 4, p. 523–531, 18 nov. 2005.

WALTER, K. M. *et al.* Methane bubbling from Siberian thaw lakes as a positive feedback to climate warming. **Nature**, v. 443, n. 7107, p. 71–75, set. 2006.

WANG, S.-J.; ZHOU, L.-Y. Integrated impacts of climate change on glacier tourism. **Advances in Climate Change Research**, v. 10, n. 2, p. 71–79, jun. 2019.

WANG, Y. *et al.* Potential feedback mediated by soil microbiome response to warming in a glacier forefield. **Global Change Biology**, v. 26, n. 2, p. 697–708, 2020.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, City of Microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675–2679, 15 maio 2000.

WHITMAN, W. B. *et al.* Proposal of the suffix –ota to denote phyla. Addendum to “Proposal to include the rank of phylum in the International Code of Nomenclature of Prokaryotes”. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 967–969, 1 mar. 2018.

WITTEBOLLE, L. *et al.* Initial community evenness favours functionality under selective stress. **Nature**, v. 458, n. 7238, p. 623–626, 8 mar. 2009.

WONG, S. Y. *et al.* Communication within East Antarctic Soil Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 1, 13 dez. 2019.

WU, Y.-W.; SIMMONS, B. A.; SINGER, S. W. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 32, n. 4, p. 605–607, 29 out. 2015.

WYNN-WILLIAMS, D. D. Response of pioneer soil microalgal colonists to environmental change in Antarctica. **Microbial Ecology**, v. 31, n. 2, 1996.

XIA, Y. *et al.* Identification and Ecophysiological Characterization of Epiphytic Protein-Hydrolyzing Saprospiraceae (“Candidatus Epiflobacter” spp.) in Activated Sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 7, p. 2229–2238, abr. 2008.

XIA, Z. *et al.* Nitrogen removal pathway and dynamics of microbial community with the increase of salinity in simultaneous nitrification and denitrification process. **Science of The Total Environment**, v. 697, p. 134047, 20 dez. 2019.

XUE, Y. *et al.* Metagenome-assembled genome distribution and key functionality highlight importance of aerobic metabolism in Svalbard permafrost. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 5, p. fiae057, 1 maio 2020.

YERGEAU, E. *et al.* Shifts in soil microorganisms in response to warming are consistent across a range of Antarctic environments. **The ISME Journal**, v. 6, n. 3, p. 692–702, 1 mar. 2012.

ZAIKOVA, E. *et al.* Antarctic Relic Microbial Mat Community Revealed by Metagenomics and Metatranscriptomics. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, 23 jan. 2019.

ZAMPOLLI, J. *et al.* Genome analysis and -omics approaches provide new insights into the biodegradation potential of *Rhodococcus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 1069–1080, 1 fev. 2019.

ZHALNINA, K. V. *et al.* Genome Sequence of Candidatus Nitrososphaera evergladensis from Group I.1b Enriched from Everglades Soil Reveals Novel Genomic Features of the Ammonia-Oxidizing Archaea. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e101648, 7 jul. 2014.

ZHANG, B. *et al.* Diversity and Succession of Actinobacteria in the Forelands of the Tianshan Glacier, China. **Geomicrobiology Journal**, v. 33, n. 8, p. 716–723, 12 abr. 2016.

ZHANG, L. *et al.* Spatiotemporal dynamic changes of antibiotic resistance genes in constructed wetlands and associated influencing factors. **Environmental Pollution**, v. 303, p. 119176, 15 jun. 2022.

ZHANG, L.; HUO, M.; ZHU, S. Enzymatic remediation of the polluted crude oil by *Rhodococcus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 7, p. 1540–1547, 2012.

ZHANG, W.; LI, F.; NIE, L. Integrating multiple “omics” analysis for microbial biology: application and methodologies. **Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 287–301, 1 feb. 2010.

ZIMOV, S. A.; SCHUUR, E. A.; CHAPIN III, F. S. CLIMATE CHANGE: Permafrost and the Global Carbon Budget. **Science**, v. 312, n. 5780, p. 1612–1613, 16 jun. 2006.