



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ERIVELTON GOMES DA SILVA

**DIVERSIDADE DE GENES DE RESISTÊNCIA EM BACTÉRIAS DE AMBIENTES
EXTREMOS**

RECIFE, 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ERIVELTON GOMES DA SILVA

**DIVERSIDADE DE GENES DE RESISTÊNCIA EM BACTÉRIAS DE AMBIENTES
EXTREMOS**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da UFRPE como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Nara Suzy Aguiar de Freitas

RECIFE, 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586dd Silva, Erivelton Gomes da
Diversidade de genes de resistência em bactérias de ambientes extremos / Erivelton Gomes da Silva. - 2022.
56 f. : il.

Orientadora: Nara Suzy Aguiar de Freitas.
Inclui referências e apêndice(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

1. Bactérias. 2. Extremófilas. 3. Resistência. 4. Genes. I. Freitas, Nara Suzy Aguiar de, orient. II. Título

CDD 574

ERIVELTON GOMES DA SILVA

**DIVERSIDADE DE GENES DE RESISTÊNCIA EM BACTÉRIAS DE AMBIENTES
EXTREMOS**

Ficha de Aprovação do Trabalho de Conclusão de Curso

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da UFRPE como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Membros da Banca de Monografia defendida em sete de outubro de 2022

Dr.^a Nara Suzy Aguiar de Freitas (Orientadora - UFRPE)

Dr.^o Paulo Roberto Eleutério de Souza (Membro Titular - UFRPE)

MSc. Felipe Pessoa da Silva (Membro Titular - UFG)

Dr.^a Iêda Ferreira de Oliveira (Membro Suplente - UFRPE)

Recife, 7 de Outubro de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Nara Suzy Aguiar por todo o conhecimento transmitido ao longo de nossas reuniões, pelo apoio e paciência diante dos obstáculos que se apresentaram.

Agradeço aos meus pais Dionéia Gomes da Silva e Edson Ramos da Silva, e a todos os meus familiares pela ajuda e suporte durante meus estudos.

Agradeço à Júlio Guttemberg por estar ao meu lado e extrair o melhor de mim.

Agradeço aos meus amigos pela ajuda e suporte oferecido.

Agradeço aos demais membros da banca avaliadora por se mostrarem disponíveis e contribuírem no meu aperfeiçoamento.

RESUMO

As bactérias de ambientes extremos são pouco conhecidas e as histórias evolutivas ligadas aos padrões de genes de resistência e virulência ainda continuam escondidas. Apesar de serem, geralmente, associadas a uma única condição extrema, com frequência são descritas como multirresistentes, o que supomos ser devido ao seu rico arsenal genético. Estudar a diversidade desses genes pode nos ajudar a compreender como a vida bacteriana se adapta no cenário de mudanças ambientais decorrentes da ação humana. Esse trabalho estudou a diversidade de mecanismos de resistência em bactérias e os seus genes compartilhados entre representantes dos táxons de *Terrabacteria* e *Proteobacteria*. Foram selecionados 16 genomas de 12 gêneros, entre bactérias termófilas, psicrófilas, halofílicas, radiotolerantes, acidófilas e resistentes a metais pesados, além de 44 genes de resistência. Uma árvore filogenética foi construída com as sequências de RNAr 16S (MEGA software). As sequências dos genes de interesse foram alinhadas contra o banco de dados do NCBI/BLAST, e suas relações com Elementos Genéticos Móveis (EGMs) obtidas (IslandViewer 4). Entre os produtos de genes, destacamos as moléculas de *Quorum Sensing* para formação de biofilmes, presente entre táxons filogeneticamente distantes, de modo que seus sinalizadores e receptores homólogos poderiam ser utilizados na compreensão da multirresistência em ambientes extremos. Por sua vez, encontramos também genes que atuam em conjunto na confecção de resistência, como os genes de reparo de DNA *mutS/mutL*, ou os genes de resistência a fatores estressores *phaE/phaC*, mas que em alguns táxons apresentaram a ausência de uma de suas partes, ou variações significativas no percentual de identidade dos alinhamentos, indicando possível diferença de funcionalidade. Outros genes mostraram-se mais restritos a determinados táxons, como o *ddrD* do radiotolerante *Deinococcus radiodurans*, que atua dentro de um cenário específico de radiação e escassez nutricional, caso em que o aprimoramento de um único gene/produto levou a um mecanismo de multirresistência. Outro exemplo de restritividade é o gene *phaE* do multirresistente *Rubrobacter xylanophilus*, que coopera na robustez e resistência ao estresse nessa espécie. Também observamos três casos de correlação de EGMs com os genes de resistência: o primeiro na ocorrência do gene de radiotolerância *recA* em Ilhas Genômicas em *Thermus sp*; outro na relação de EGMs e Ilhas genômicas com os genes *ars* e *cad*, de resistência ao arsênio e cádmio, respectivamente, em *Geobacillus stearothermophilus*; e por fim a relação do gene acidófilo *kdpB* e sua associação com plasmídeos em vários dos táxons estudados. Essas evidências apontam que, ao menos para

uma pequena parte desses mecanismos, existe um potencial de compartilhamento de genes de resistência por meio de Transferência Horizontal de Genes - THG. Esse potencial para mobilidade pode ser uma excelente ferramenta biotecnológica na edição genômica de bactérias usadas na biorremediação de ambientes contaminados. Acreditamos que novos estudos de padrões e variações, análises filogenéticas e correlação desses genes com EGMs e Ilhas Genômicas, possam ser caminhos para entender mais sobre a diversidade de genes de resistência em bactérias extremófilas.

Palavras-chave: Bactérias, Extremófilas, Resistência, Genes

ABSTRACT

Bacteria from extreme environments are poorly understood and the evolutionary histories linked to resistance and virulence gene patterns are still hidden. Although they are usually associated with a single extreme condition, they are often described as multi-resistances, which we assume is due to their rich genetic arsenal. Studying the diversity of these genes can help us to understand how bacterial life adapts in the scenario of environmental changes resulting from human action. This work studied the diversity of resistance mechanisms in bacteria and their shared genes between representatives of the Terrabacteria and Proteobacteria taxa. 16 genomes from 12 genera was selected, including thermophilic, psychrophilic, halotolerant, radiotolerant, acidophilic and resistant to heavy metals bacteria, in addition to 44 resistance genes. A phylogenetic tree was constructed with the 16S rRNA sequences (MEGA *software*). The sequences of the genes of interest were aligned against the NCBI/BLAST database, and their relationships to Mobile Genetic Elements (MGEs) obtained (IslandViewer 4). Among the gene products, we highlight the Quorum Sensing molecules for biofilm formation, present among phylogenetically distant taxa, where homologous signalers and receptors can be used to understand multi-resistances in extreme environments. On the other hand, we also found genes that act together in the creation of resistance, such as the *mutS/mutL* DNA repair genes, or the resistance genes to several *phaE/phaC* stressors, but which in some taxa showed the absence of one of alleles, or significant variations in the percentage of alignment of the alignments, indicating a possible difference in functionality. Other genes were more restricted to certain taxa, such as the *ddrD* of the radiotolerant *Deinococcus radiodurans*, which acts within a specific scenario of radiation and nutritional scarcity, in which case the improvement of a single gene/product led to a multi-resistance mechanism. Another example of restrictiveness is the *phaE* gene of the multidrug-resistant *Rubrobacter xylanophilus*, which cooperates in robustness and resistance to stress in this species. We also observed three cases of correlation between MGEs and resistance genes: the first in the occurrence of the radiotolerance gene *recA* in Genomic Islands in *Thermus sp*; another in the relationship of MGEs and Genomic Islands with the *ars* and *cad* genes, for arsenic and cadmium resistance, respectively, in *Geobacillus stearothermophilus*; and finally, the relationship of the *Acidiphilium sp* gene *kdpB* with plasmids in several of the taxa studied. This evidence indicates that, at least for a small part of these mechanisms, there is a potential for sharing resistance genes through Horizontal Gene Transfer (HGT). This potential for

mobility could be an excellent biotechnological tool in the genomic editing of bacteria used in the bioremediation of contaminated environments. We believe that further studies of patterns and variations, phylogenetic analyzes and correlation of these genes with MGEs and genomic islands, may be ways to understand more about the diversity of resistance genes in extremophile bacteria.

Keywords: Bacteria, Extremophiles, Resistance, Genes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Árvore Filogenética de bactérias extremófilas a partir de RNAr 16S	28
Figura 2 - Bactérias extremófilas e seus genes ou produtos gênicos associados à sobrevivência em ambientes extremos de acordo com a literatura	29
Quadro 1 - Genomas de bactérias extremófilas selecionados para a pesquisa sobre diversidade de genes.....	27
Quadro 2 - Resultados para genes <i>recA</i> associados a GIs ou EGMs nos extremófilos do filo <i>Deinococcus-thermus</i>	31
Quadro 3 - Resultados para genes de <i>cad</i> e <i>ars</i> associados a GIs ou EGMs no extremófilo <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados para o alinhamento no tBLASTn dos produtos de genes de reparo de DNA em <i>Thermus spp.</i> e <i>Deinococcus spp.</i>	30
Tabela 2 - Resultado de alinhamentos no tBLASTn dos produtos dos genes <i>phaE</i> , <i>phaC</i> Classe I e <i>phaC</i> Classe III de <i>Rubrobacter xylanophilus</i> para táxons de bactérias extremófilas.....	36
Tabela 3 - Resultados de alinhamentos no tBLASTn para os produtos dos genes <i>ectD</i> e <i>ectE</i> com táxons de bactérias extremófilas.....	38
Tabela 4 - Contagem de ocorrência dos produtos dos genes <i>mscK</i> e <i>mscS1</i> , <i>mscS2</i> e <i>mscS3</i> de <i>Halomonas elongata</i> em táxons extremófilos baseado nos alinhamentos realizados no tBLASTn.....	40
Tabela 5 - Resultado de alinhamentos no tBLASTn para os produtos do gene <i>kdpB</i> em <i>Acidithiobacillus caldus</i> com táxons de bactérias extremófilas.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHLs - *Acylated Homoserine Lactones*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

cAMP - *cyclic AMP* (segundo mensageiro)

c-di-GMP - *Cyclic Diguanylate* (segundo mensageiro)

EGM - Elemento Genético Móvel

EPS - Exopolissacarídeos

IR - *Inverted Repeat*

IS - *Insertion Sequence*

kb - Kilobases (mil pares de bases)

LEAs - Proteínas de Embriogênese Tardia

MEGAX - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

PI - Percentual de Identidade

QC - *Query Cover*

QS - *Quorum Sensing*

ROS - *Reactive Oxygen Species*

THG - Transferência Horizontal de Genes

Tn - *Transposon*

TPAse - Enzima Transposase

SUMÁRIO

SUMÁRIO	12
1 INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 HEREDITARIEDADE	13
2.2 SELEÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA	15
2.3 ADAPTAÇÃO A AMBIENTES EXTREMOS	16
2.4 FORMAÇÃO DE BIOFILMES	17
2.5 ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS	18
2.6 BIOINFORMÁTICA	20
2.7 FERRAMENTAS BLAST E ISLANDVIEWER 4	20
2.8 GENÔMICA COMPARATIVA	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 GENES DE EXTREMÓFILOS DO FILO DEINOCOCCUS-THERMUS	29
5.2 GENES DE EXTREMÓFILOS DO FILO FIRMICUTE	33
5.3 GENES DE EXTREMÓFILOS DO FILO ACTINOBACTERIA	35
5.4 GENES DE EXTREMÓFILOS DO FILO PROTEOBACTERIA	37
5.4.1 Genes de osmorregulação no Filo Proteobacteria	37
5.4.2 Genes de resistência à acidez e metais pesados no Filo Proteobacteria	40
5.5 GENES DE BIOFILMES EM BACTÉRIAS EXTREMÓFILAS	42
5.6. DISCUSSÃO GERAL	44
6 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
APÊNDICE A - PLANILHA DE GENES DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS EXTREMÓFILAS	55

1 INTRODUÇÃO

Muitos microrganismos sobrevivem em condições ambientais extremas inalcançáveis para outras formas de vida atuais (YIN *et al.*, 2019) e a interferência humana traz consigo novos cenários para a adaptação microbiana (EMBRANDIRI *et al.*, 2016), em um ritmo cada vez mais acelerado. Diante das condições adversas, as bactérias passam pelo crivo dos processos evolutivos e destacam-se pela sua plasticidade adaptativa (DANCE, 2020), que evidenciam sua multirresistência a diversos ambientes, nos provocando a entender como esses mecanismos adaptativos se distribuem entre os táxons bacterianos. Nossa hipótese é que genomas de bactérias extremófilas compartilham entre si genes envolvidos em mecanismos de adaptação a ambientes extremos, seja por relações de ancestralidade ou por Transferência Horizontal de Genes (THG), e que dados de suas variações genéticas possam apontar caminhos para melhor entendimento sobre a evolução dos grupos. Para investigar, foram selecionadas bactérias extremófilas com genomas completamente sequenciados e seus mecanismos adaptativos associados. A ferramenta BLAST/NCBI foi aplicada na busca das sequências de interesse, de modo a identificar a ocorrência dos genes e os dados estatísticos resultantes. Assim, foi possível analisar, ao menos em parte, a diversidade de genes de resistência em bactérias extremófilas e contribuir para um diferente entendimento da evolução e manutenção da vida em ambientes extremos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HEREDITARIEDADE

A transmissão de características entre os indivíduos é o que chamamos de hereditariedade, e possivelmente é a força mais poderosa na manutenção da vida. A percepção de hereditariedade vem antes do conhecimento da Genética como Ciência, sendo já aplicada no cultivo de plantas, por exemplo, ou na percepção de como os filhos apresentam traços de ambos os pais. O organismo ancestral fornece aos seus descendentes os meios para sua sobrevivência, mas o mecanismo como se dá essa herança manteve-se um mistério por muito tempo. Foi só no século XIX que Gregor Mendel mudou o rumo das ciências naturais,

explicando como funcionaria a transmissão de características visíveis ao realizar experimentos com sementes de ervilhas. Mendel descobriu os princípios básicos da hereditariedade ao afirmar que as características são codificadas e transmitidas por “fatores”, que hoje sabemos se tratar dos genes. (MATIOLI & FERNANDES, 2012).

Chamamos de genótipo o conjunto de genes detentores das informações hereditárias. Os genes estão codificados em moléculas de DNA e RNA, distinguindo-se entre si pela presença dos açúcares desoxirribose ou ribose, respectivamente. Os nucleotídeos são formados por ácido fosfórico, um açúcar e uma base nitrogenada, sendo essas últimas a citosina (C), adenina (A), guanina (G) ou timina (T) no DNA, e tendo-se uracila (U) em substituição à adenina no RNA. No genótipo, os pares de bases nitrogenadas arranjados em sequência na molécula de DNA são transcritos em uma molécula de RNA, processo chamado de transcrição, para que do RNA transcrito seja lida a sequência de aminoácidos. O uso do código genético do RNA para produzir proteínas é chamado de tradução, pois a partir desse ponto a informação codificada ganha uma “nova forma”. Durante a tradução, moléculas de aminoácido são interligadas em uma sequência pré-definida pelos códons, que são conjuntos de três pares de bases que traduzem-se em algum aminoácido específico (MATIOLI & FERNANDES, 2012).

Os genótipos e genes são herança dos antecedentes de um organismo, que ao longo das gerações, vão sofrendo alterações em suas frequências. Essas alterações ou mutações são aleatórias e provocam modificações na leitura do código genético, inserindo (inserções), deletando (deleções) ou substituindo nucleotídeos no DNA (substituições). As mutações, ao ocorrerem em genes, podem ser sinônimas ou não sinônimas: são sinônimas quando não alteram a leitura da tradução, gerando o mesmo aminoácido do código original. Enquanto que nas não sinônimas as modificações alteram a tradução de modo a gerar um ou mais aminoácidos distintos da sequência original (MATIOLI & FERNANDES, 2012). As mutações produzem variações que podem ser prejudiciais, neutras ou elevar o valor adaptativo das populações para enfrentamento de novos ambientes.

2.2 SELEÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA

A variabilidade, que tem como fonte primária a mutação na sequência de base dos genomas, e permite a seleção de indivíduos no processo evolutivo das populações. Assim a seleção natural é o processo determinístico que fixa características ao mesmo tempo que elimina outras. Pode-se então, entender o papel das mutações na variabilidade genética e nos processos evolutivos ao estudar as sequências proteicas. As proteínas são moléculas complexas e tridimensionais que atuam como os principais agentes na realização das atividades metabólicas do ser vivo. Muito da funcionalidade de uma proteína vem de sua estrutura espacial, definida pelas características de seus aminoácidos, como sua polaridade e arranjo na conformação tridimensional. Já que se tratam de moléculas complexas, pequenas alterações podem ser neutras ou causar variações na sua funcionalidade. Um aminoácido apolar pode desempenhar o papel de outro aminoácido apolar, por exemplo, caso onde essa alteração poderia ser neutra. Portanto é fácil prever que algumas mutações nos genes que sequenciam essas proteínas passariam despercebidas ou com baixo impacto no crivo evolutivo, não sendo deletérias. Mas uma modificação neutra ou de baixo impacto pode se tornar um fator seletivo se a condição do ambiente for alterada (FUTUYMA, 2009).

Partindo dessa mesma leitura de que modificações neutras nos genes podem se tornar diferenciais seletivos em novas condições, podemos constatar que o genótipo sozinho não define as características de um indivíduo. Até mesmo a expressão ou supressão de determinados genes dependem da interferência do ambiente. O fenótipo é conceituado como uma característica decorrente da interação entre o organismo e fatores ambientais e vem da ideia de que o material genético está inserido em um contexto, em um meio químico e físico e exposto à influência de muitas moléculas. As características de um organismos são, portanto, uma combinação de genótipo e fenótipo, o que significa que até indivíduos com o mesmo código genético podem expressar diferentes características em ambientes distintos (FUTUYMA, 2003).

Contribuindo ainda mais com essa variabilidade, a Transferência Horizontal de Genes (THG) demonstra que o processo de transmissão de características não é tão linear quanto se pensava. Na THG o material genético é transmitido entre organismos não relacionados. Esse

fenômeno é melhor conhecido em bactérias e outros microorganismos. Entre os meios de THG temos a transformação, processo em que uma bactéria incorpora material genético do ambiente; A transdução, em que ocorre a transferência de material genético entre bactérias e vírus bacteriófagos, que são vírus que injetam seu genoma no hospedeiro e utilizam o maquinário genético da bactéria para se reproduzir (PARTRIDGE *et al.*, 2018); E, por fim, a conjugação, processo onde a troca genética é mediada por plasmídeos entre duas células bacterianas, por meio de uma estrutura de comunicação chamada *pilum*, sendo o processo principal de THG em bactérias (ABE *et al.*, 2020). Nesse quesito, as bactérias são um excelente modelo para estudo de plasticidade fenotípica decorrente da THG, devido ao seu genoma circular relativamente pequeno e disperso no citoplasma, presença de plasmídeos e relação com bacteriófagos.

2.3 ADAPTAÇÃO A AMBIENTES EXTREMOS

As bactérias extremófilas são conhecidas pela capacidade de sobreviver em condições inóspitas para a maioria dos seres vivos. Exemplos marcantes são bactérias resistente a baixas temperaturas, encontradas em regiões glaciais ou no *permafrost* (MARGESIN & COLLINS, 2019) ou resistentes às altas temperaturas e acidez acentuada, como as de zonas com atividade vulcânica ou fontes termais (URBIETA *et al.*, 2015). Bactérias de mar profundo também se destacam, sobrevivendo a cenários adversos de pressão, temperatura, salinidade e metais (JIN *et al.*, 2019). Com a interferência humana, observa-se bactérias adaptadas a ambientes extremos artificiais, como em painéis fotovoltaicos, onde toleram alta radiação, variação térmica e dessecação (MOURA *et al.*, 2021).

Chamamos de termófilas ou termotolerantes as bactérias que se destacam pela condição ótima de crescimento em temperaturas elevadas e encontram-se em ambientes como fontes termais, vulcões, gêiseres ou corpos d'água geotérmicos. Quase como uma “contraparte”, as bactérias psicrófilas são aquelas que sobrevivem em condições de baixa temperatura, igual ou abaixo de 10°C, com muitos de seus representantes encontrados em regiões glaciais, de alta altitude ou altas profundidades (ORELLANA *et al.*, 2018). Acidófilas são aquelas que desenvolvem-se em ambientes de pH baixo e são de grande interesse na biolixiviação, mecanismo de processamento do metal em minérios ou rejeitos de mineração

(HOU *et al.*, 2021). As halofílicas apresentam crescimento ótimo em ambientes com concentrações elevadas de cloreto de sódio, enquanto que as halotolerantes crescem facultativamente em ambientes salinos ou não. Ambas ocorrem em oceanos, corpos d'água salinos, em desertos de sal (salar) ou mesmo no gelo polar. A regulação osmótica nesses organismos é vital para sua sobrevivência. Extremófilas radiotolerantes, por sua vez, resistem a variadas fontes de radiação, destacando-se pela sua capacidade de proteção ou reparação de danos causados em seu material genético. São encontrados geralmente em regiões de elevada exposição solar, como em desertos (ORELLANA *et al.*, 2018).

Embora identifiquemos as bactérias extremófilas por suas características mais marcantes, muitas delas são multirresistentes, desenvolvendo estratégias evolutivas para ambientes complexos. Também podemos chamar essas bactérias de poliextremófilas (ZGONIK *et al.*, 2021). A ocorrência de bactérias com multirresistência leva a refletir sobre como elas adquiriram esses mecanismos. A literatura recente aponta para uma tendência de co-evolução entre genes relacionados à sobrevivência de bactérias, como na associação entre exposição a pesticidas e desenvolvimento de resistência a antibióticos (MALAGÓN-ROJAS *et al.*, 2020) ou no efeito co-seletivo de resistência a antibióticos e resistentes a metais pesados (HUBENY *et al.*, 2021).

2.4 FORMAÇÃO DE BIOFILMES

As bactérias de ambientes extremos de vida livre estão constantemente associadas a biofilmes. Os biofilmes são aglomerados de bactérias aderidos a um substrato biótico ou abiótico e envolvidos por uma matriz composta principalmente de polissacarídeos chamados de exopolissacarídeos (EPS), além de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (YIN *et al.*, 2019). O *Quorum Sensing* (QS) é o sistema responsável por promover a aglomeração bacteriana e regular a expressão de EPS, e foi descoberto ao estudarem fenômenos de bioluminescência na bactéria marinha *Vibrio fischeri*. Hoje, entende-se que o QS funciona como um sinalizador que interage com um regulador transcricional, ativando-o e levando a expressão de genes de interesse. Isso ocorre ao existir uma elevada concentração de autoindutores, que são as moléculas sinalizadoras no QS, possível quando bactérias

expressam o QS próximas umas das outras, indicando uma alta densidade populacional (WHITELEY *et al.*, 2017). As moléculas segundo mensageiro, c-di-GMP e cAMP, também são importantes na adaptação dos biofilmes ao ambiente hostil. Elas funcionam como um “órgão sensitivo”, captando e transmitindo informações das condições ambientais, promovendo uma resposta celular adequada (YIN *et al.*, 2019).

2.5 ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS

Os elementos genéticos móveis (EGM) fornecem uma perspectiva distinta sobre a transmissão de características e variabilidade genética dos seres vivos. Esses elementos são sequências com capacidade de transitar entre diferentes regiões de um genoma (PARTRIDGE *et al.*, 2018). O crescente sequenciamento de organismos procariontes tem permitido a descoberta de novos elementos genéticos móveis (SIGUIER *et al.*, 2014), conferindo abrangentes possibilidades de pesquisa.

Nas bactérias, os elementos genéticos móveis mais recorrentes e simples são os *Insertion Sequences* (ISs), caracterizados por possuírem um gene que codifica uma enzima do tipo transposase (TPase). A TPase realiza a excisão (“recorte”) do ISs no genoma e também a inserção (“cola”) em outra posição do genoma. As ISs possuem repetições terminais curtas chamadas repetições invertidas ou *Inverted Repeat* (IRs) onde localizam-se os sítios ativos para a sua transposição (PARTRIDGE *et al.*, 2018). As transposases e as IRs são elementos importantes na bioinformática, ao caracterizarem regiões de um genoma com potencial mobilidade gênica. Os elementos genéticos móveis tornam-se mais complexos à medida que apresentam novos componentes em sua estrutura. Eventualmente ocorre de um IS passar a compor um elemento genético móvel chamado de *Transposon* (*Tn*) ou elemento de transposição. Os *Tns* possuem, além do gene necessário para sua transposição, genes “passageiros” ou de “carga”, que costumam ser genes de resistência ou virulência, vantajosos para o portador (SIGUIER *et al.*, 2014).

Elementos genéticos móveis podem se associar a outros genes, “emprestando” sua capacidade de mobilidade, como pode ser observado nos integrons, que, por sua vez, possuem relação com os cassetes de genes. Um cassete de genes é um elemento genético móvel

pequeno, comumente em forma circular livre, apresentando um gene, porém sem nenhum promotor ou enzima de inserção. Torna-se funcional ao compor uma matriz de cassete em um *integron* (PARTRIDGE *et al.*, 2018). Os *integrons* são genes que não possuem mobilidade própria, mas que são capazes de inserir genes externos como os cassetes em sua sequência, que comumente apresentam importância adaptativa, como resistência a antibióticos, a metais pesados ou biocidas. Uma associação entre um *integron* e um *transposon* pode permitir a transposição desse *integron*, favorecendo o compartilhamento dessas características (GILLINGS *et al.*, 2014).

A inserção e excisão descontrolada de EGMs pode trazer consequências negativas, como perda de funções de um gene ou ativação indevida de regiões regulatórias. Contudo, esses elementos sofrem a ação de adaptações defensivas das bactérias, em que os genes deletérios podem ser inativados ou abrandados para contornar a imunidade bacteriana (COSBY *et al.*, 2019). Esse mesmo mecanismo de escape pode acarretar na perda de capacidade do gene exógeno de se propagar, permanecendo inerte no genoma hospedeiro. ISs sem o gene transposase, por exemplo, são um indicativo de que existiu uma inserção ancestral, que hoje não possui mais essa capacidade de transposição (SIGUIER *et al.*, 2014). Esses genes passariam a ser silenciosos, causando pouca ou nenhuma “perturbação”, o que colabora em sua preservação no genoma de forma definitiva, pois não seria selecionado negativamente. Com o tempo, os genes transportados sofrem mutações e podem se perder. Porém, em alguns casos, eles são “domesticados” quando úteis ao hospedeiro (MATIOLI & FERNANDES, 2012).

O impacto da inserção de um EGM vai depender da história evolutiva em que ele está inserido, determinando sua exclusão, permanência ou modificação no genoma hospedeiro (COSBY *et al.*, 2019). Essas implicações dos EGMs sobre o organismo também podem variar ao longo do tempo (SKIPPER *et al.*, 2013). Os elementos genéticos móveis deixam uma “marca” no local em que são inseridos, cujas impressões podem ser conservadas ao longo da história evolutiva de seu portador. Essas regiões exógenas são chamadas de ilhas genômicas ou *Genomic Islands* - GIs (DELAVAT *et al.*, 2017), e podem funcionar como assinaturas evolutivas. Por exemplo, quando detectamos um genoma de origem viral em duas espécies próximas, poderia ser um indicativo de que uma transdução teria ocorrido em um ancestral comum entre essas espécies (PATEL *et al.*, 2011). Acredita-se que elementos genéticos

móveis “adormecidos” no genoma bacteriano, podem ser ativados diante de novas pressões seletivas (SKIPPER *et al.*, 2013) e que fornecem variabilidade e consequente potencial adaptativo.

2.6 BIOINFORMÁTICA

Podemos analisar as características de uma sequência a partir de outras sequências já conhecidas. Para tal, diversos métodos podem ser aplicados, como os alinhamentos e análises de árvores filogenéticas que podem ser realizados por ferramentas de Bioinformática. Em uma definição resumida, Bioinformática é a ciência que utiliza recursos computacionais para estudar sequências biológicas de nucleotídeos e aminoácidos, além de estruturas moleculares de proteínas (VERLI, 2014).

Um dos métodos de estudo na Bioinformática são os alinhamentos, que consistem em comparar duas sequências com alguma similaridade e baseiam-se em métodos de predição dos processos mutacionais. Como vimos, ao longo da história evolutiva, uma sequência sofre mutações, como inserção, deleção ou substituição dos pares de bases, o que evidentemente modifica seus caracteres. Durante os alinhamentos em *softwares* de bioinformática, os caracteres, sejam eles nucleotídeos ou aminoácidos, são comparados a partir de séries de caracteres compatíveis. Chamamos de identidade a similaridade apresentada entre duas sequências alinhadas, valor que pode ser representado em percentual. Percentuais de identidade altos permitem fazer inferências relacionais entre as sequências, sugerindo potenciais homologies. A homologia relaciona-se com o compartilhamento de características de origem ancestral entre dois táxons que divergiram de um ancestral comum. Essas sequências podem sofrer novos processos evolutivos a partir dessa divergência, mas continuar preservando alguma similaridade entre suas sequências (VERLI, 2014).

2.7 FERRAMENTAS BLAST E ISLANDVIEWER 4

Para conseguir encontrar percentuais de alinhamento confiáveis precisamos de ferramentas bem estabelecidas, como o caso da *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST),

disponível no *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) que realiza testes probabilísticos ao alinhar sequências tanto de nucleotídeos quanto de aminoácidos. O BLAST permite realizar alinhamentos com um banco de dados imenso de sequências, bem como fornecer dados de significância estatística. Entre as informações estatísticas temos o *Query Cover* (QC), que indica em percentual quanto da extensão total da sequência de busca (chamada de “*query*”) foi alinhada com a sequência resultante. Essa informação nos permite avaliar, por exemplo, se a identidade de um alinhamento se deu em toda a extensão da sequência ou somente em parte dela. O Percentual de Identidade (PI), por sua vez, é o percentual de caracteres da porção alinhada da sequência *query* que apresenta o mesmo valor e posição em relação às sequências resultantes, sendo esse “valor” as bases de nucleotídeos ou aminoácidos. Pelo emprego do BLAST podemos avaliar a similaridade de sequências, bem como identificar em que táxons determinado gene apresenta ou não potenciais homólogos. Segundo Haft (2015) alguns autores apontam que PI abaixo de 60% já são um indício de que esses homólogos podem apresentar divergência funcional, porém esse tipo de análise requer muito cuidado, necessitando de outros métodos para permitir afirmações mais concretas, especialmente ao considerarmos que cada família de proteínas apresenta características próprias. As análises de alinhamento no BLAST permitem portanto que façamos suposições modestas, contribuindo no levantamento de novas hipóteses e de caminhos de análise computacional mais promissores (VERLI, 2014). As análises no BLAST, apesar de consistentes, não são exatas. É preciso ter cautela, observando por exemplo se existe uma escassez amostral, o que é comum em táxons de bactérias extremófilas.

O BLAST é um programa que pode atingir fins variados pela utilização de diferentes tipos de alinhamentos: o alinhamento pode ser a partir de sequência de nucleotídeo com outras sequências de nucleotídeos (BLASTn); de sequência de aminoácidos com outras de aminoácidos (BLASTp); de nucleotídeos para proteínas (BLASTx); ou de sequência de aminoácido com sequências de nucleotídeos (tBLASTn). Em nosso trabalho focamos no uso do tBLASTn, pois apesar de estarmos analisando os genes de resistência, as sequências de aminoácidos são evolutivamente mais conservadas, e podem conferir inferências melhores em relação à conservação funcional. Isso devido, dentre outros fatores, ao padrão de códons de nucleotídeos distintos que podem codificar um mesmo aminoácido, fazendo com que alterações mutacionais na sequência de nucleotídeos não necessariamente afetem a sequência transcrita, e conseqüentemente não prejudique sua funcionalidade (VERLI, 2014).

O IslandViewer4 (<https://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/>) é um *software* que utiliza variados métodos para predição de Ilhas genômicas. Esses métodos também se baseiam no uso de alinhamento, buscando genomas filogeneticamente semelhantes ou padrões de ilhas genômicas já estabelecidos. Nos resultados, são indicados quais os métodos aplicados na predição de cada ilha resultante. Possíveis limitações em relação ao software são descritas pelo próprio domínio do programa, incluindo dificuldade de previsão de ilhas muito antigas, que já sofreram muitas alterações dentro do DNA hospedeiro; Naturalmente, dentro da mesma linha de raciocínio, ilhas com características muito semelhantes ao do hospedeiro também são de difícil localização; A própria variação comum entre espécies bacterianas pode contribuir com erros nas previsões (BERTELLI *et al.*, 2017).

2.8 GENÔMICA COMPARATIVA

De acordo com Haft (2015), a análise genômica comparativa utiliza os dados obtidos em análises de Bioinformática para fazer inferências sobre a história evolutiva dessas sequência e sua funcionalidade, por exemplo. Sequências alinhadas podem ser homólogas, tendo origem a partir de uma sequência ancestral comum. Porém alinhamentos nem sempre representam homologia, podendo representar, por exemplo, convergência evolutiva, processo em que organismos diferentes adquirem características semelhantes. O estudo sobre a história evolutiva dos organismos chama-se Filogenética e, a partir do momento que utilizamos genes e proteínas para esse fim, estamos trabalhando com a Filogenia Molecular. Alinhamentos são amplamente empregados na Filogenia Molecular, porém, múltiplos alinhamentos são de difícil interpretação sem a ajuda de algoritmos sofisticados. Um dos recursos para entender a filogenia entre organismos é a construção de árvores filogenéticas, que são representações gráficas que interpretam os alinhamentos e elencam as sequências resultantes de acordo com as relações de ancestralidades deduzidas.

Uma árvore filogenética pode ser construída a partir de vários métodos de predição, bem como ter inúmeras topologias, ajustando-se às particularidades da pesquisa. O *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* - MEGA (<https://www.megasoftware.net/>) é um programa que

utiliza diversos métodos de inferência filogenética, sendo uma ferramenta gratuita e de ampla aplicação na construção de árvores filogenéticas. (VERLI, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a diversidade de padrões de genes de resistência associados a 16 táxons bacterianos de ambientes extremos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar uma revisão de literatura para levantamento de genomas de bactérias extremófilas e seus genes de resistência para ambientes extremos, incluindo genes associados a biofilmes, como os genes regulados pelo sinalizador *Quorum Sensing*;

Ponderar sobre os agrupamentos e a filogenia dos genomas das bactérias selecionadas e identificar padrões e variações relacionados aos genes dentro dos grupos;

Discutir sobre a mobilidade dos genes a partir de sua associação com Elementos Genéticos Móveis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se uma pesquisa bibliográfica sobre bactérias extremófilas para seleção de organismos representativos de distintas condições extremas no PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Restringiu-se a busca para artigos publicados nos últimos 5 anos, preferencialmente com conteúdo completo e gratuito disponível para leitura.

Foram analisados cerca de 200 títulos e/ou resumos de diferentes interesses científicos, focados em bactérias extremófilas e sua relação com genes de resistência a ambientes extremos e/ou com elementos genéticos móveis. Na sequência, excluimos artigos que abordavam apenas aplicações biotecnológicas e organismos sem o genoma de referência completamente sequenciado e disponível no banco de dados de genomas do NCBI. Devido a associação marcante entre biofilmes e bactérias extremófilas, incluímos no banco de dados sinalizadores e reguladores transcricionais ativados por *quorum sensing* e genes relacionados ao mesmo que estejam associados na literatura com condições extremas. Os dados dos genomas e genes selecionados foram editados no programa Excel (<https://www.microsoft.com/>), incluindo nome, descrições dos mecanismos de resistência, e os links dos artigos, genoma de referência e sequência 16S do RNAr.

As sequências FASTA de RNA ribossomal 16S dos genomas selecionados foram incorporadas ao *software* MEGAX (<https://www.megasoftware.net/>) para análise das relações filogenéticas entre os táxons. Utilizaram-se os métodos Muscle para alinhamento, e o método UPGMA para construção de árvore filogenética. Para os genes, realizou-se alinhamentos entre as sequências FASTA dos produtos e táxons na ferramenta tBLASTn do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e observação das relações estatísticas de QC e PI para os alinhamentos. Realizou-se análise genômica comparativa para os resultados, segundo métodos descritos por Haft (2015).

Como análise adicional em alguns dos resultados, obteve-se a identificação de genes de interesse em ilhas genômicas pelo *software* IslandViewer4 (<https://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/>), que permite realizar análise comparativa de sequências, localizar variações na composição de bases e identificar genes ligados aos perfis selecionados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 16 genomas de bactérias extremófilas, dentro de 12 gêneros, foram selecionados (Quadro 1), entre eles estão: termófilos, psicrófilos, halofílicos ou halotolerantes, radiotolerantes, acidófilos e resistentes a metais pesados. Para a maioria dos genomas, a literatura apontava que seu respectivos gêneros possuem uma ampla gama de representantes extremófilos para a mesma condição extrema, e desse modo optamos por analisar à nível de gênero os táxons *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Thermus*, *Rubrobacter*, *Deinococcus*, *Psychrobacter*, *Cryobacter* e *Halomonas*. Enquanto que nos restringimos a nível de espécie para *Geobacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas antarctica*, *Chromohalobacter salexigens* e *Halanaerobium hydrogeniformans*. A essa relação de genomas e gêneros que estaremos nos referindo ao mencionar sobre bactérias extremófilas ao longo dos tópicos.

Vários desses genomas apresentaram menções à multirresistência, como: resistência a altas temperaturas e ao arsênio em *Thermus thermophilus* (GALLO *et al.*, 2021); resistência a temperaturas elevadas, radiação e halotolerância em membros do gênero *Rubrobacter* (KOUŘILOVÁ *et al.*, 2021); resistência acidófila e termófila em *Acidithiobacillus caldus* (FENG *et al.*, 2021); e resistente à alta salinidade, metais pesados, dessecação e “espécies reativas de oxigênio - ROS” em *Deinococcus radiodurans* (HELALAT *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2021). Essa última é a espécie mais recorrente nos artigos e também a única que apresenta dois cromossomos. Todavia, é importante observar que os dados selecionados representam uma pequena parcela do universo de genomas e genes de extremófilos, sendo a seleção de inclusão afetada por limitações de tempo e recursos na elaboração deste trabalho.

Como os genomas/táxons foram selecionados baseados em suas características extremófilas e não pela sua taxonomia, trabalhou-se com bactérias pertencentes a dois grandes clados, de acordo com a ferramenta *Taxonomy Browser* do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>). Obteve-se representantes dos filios *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Deinococcus-thermus*, do grande clado *Terrabacteria*, além de representantes do filo gram-negativo *Proteobacteria*.

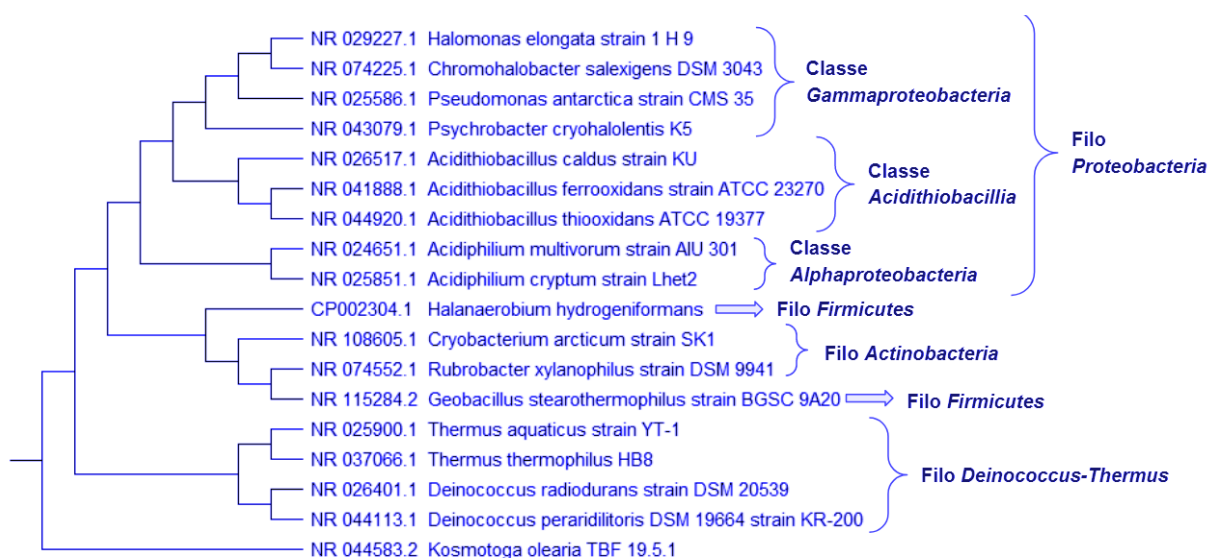
Quadro 1 - Genomas de bactérias extremófilas selecionados para a pesquisa sobre diversidade de genes.

Condição Extrema	Bactéria Extremófila (Sequência de Referência no NCBI e Autor de Referência)	Sequência de Ref. - 16S
Acidófilos e resistentes a metais pesados	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> NZ_CP040511.1 (GALVEZ <i>et al.</i> , 2022)	NR_041888.1
	<i>Acidithiobacillus caldus</i> NZ_CP043926.1 (HOU <i>et al.</i> , 2021)	NR_026517.1
	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> NZ_CP045571.1 (HOU <i>et al.</i> , 2021)	NR_044920.1
	<i>Acidiphilium cryptum</i> NC_009484.1 (LI <i>et al.</i> , 2020)	NR_025851.1
	<i>Acidiphilium multivorum</i> NC_015186.1 (LI <i>et al.</i> , 2020)	NR_024651.1
Termófilos	<i>Thermus thermophilus</i> NC_006461.1 (AVERHOFF <i>et al.</i> , 2021)	NR_037066.1
	<i>Rubrobacter xylophilus</i> NC_008148.1 (KOUŘILOVÁ <i>et al.</i> , 2021)	NR_074552.1
	<i>Thermus aquaticus</i> NZ_CP010822.1 (KAUR <i>et al.</i> , 2019)	NR_025900.1
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> NZ_CP063162.1 (KAUR <i>et al.</i> , 2019)	NR_115284.2
Radiotolerante	<i>Deinococcus radiodurans</i> NZ_CP038663.1 & NZ_CP038664.1 (HELALAT <i>et al.</i> , 2021; DAI <i>et al.</i> , 2020)	NR_026401.1
Psicrófilos	<i>Pseudomonas antarctica</i> NZ_CP015600.1 (LEE <i>et al.</i> , 2017)	NR_025586.1
	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> NZ_CP022043.2 (DI LORENZO <i>et al.</i> , 2020)	NR_043079.1
	<i>Cryobacterium arcticum</i> NZ_CP016282.1 (LIU <i>et al.</i> , 2020, PUOPOLO <i>et al.</i> , 2020)	NR_108605.1
Halofílicos	<i>Chromohalobacter salexigens</i> NC_007963.1 (ARGANDOÑA <i>et al.</i> , 2021)	NR_074225.1
	<i>Halanaerobium hydrogeniformans</i> NC_014654.1 (SADLER <i>et al.</i> , 2020)	CP002304.1
	<i>Halomonas elongata</i> NC_014532.2 (VANDRICH <i>et al.</i> , 2020)	NR_029227.1

Fonte: O autor (2022).

Avaliamos o contexto taxonômico por meio de uma árvore filogenética das sequências a partir do RNA ribossomal 16S dos genomas, tendo em vista o que foi apontado por Haft (2015) sobre uma análise genômica não se sustentar apenas pela similaridade entre os genes, necessitando de um contexto filogenético. Destacamos na árvore os filios e em alguns casos as classes dos genomas, de acordo com a informação disponível no NCBI, como forma de reforçar o resultado obtido e identificar erros. O filo *Firmicutes* foi o único a não apresentar os seus representantes associados na árvore por um mesmo nó, o que acreditamos ser devido ao fato de *Halanaerobium hydrogeniformans* ser o único entre os genomas sem uma sequência RNAr 16S de referência, com sua sequência obtida por alinhamento no BLAST. Apesar disso, optamos por estudar os genes dos representantes *Firmicutes* juntos.

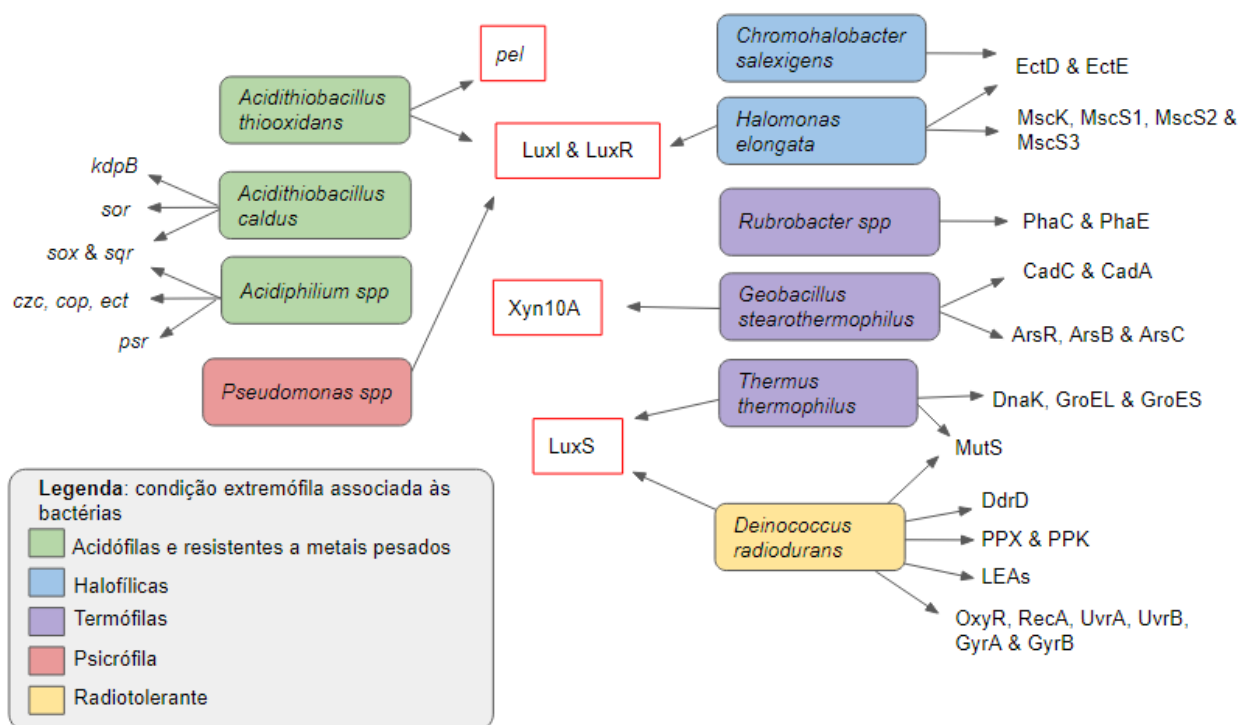
Figura 1 - Árvore Filogenética de bactérias extremófilas a partir de RNAr 16S.



Legenda - Árvore construída a partir do método de alinhamento Muscle e no método de construção de árvores filogenéticas UPGMA no *software* MEGAX. A sequência RNAr 16S de *Kosmotoga olearia TBF 19.5.1* foi utilizado como grupo externo na confecção da árvore filogenética, uma bactéria termófila do filo *Thermotogae* (LI *et al.*, 2022). O método UPGMA é uma escolha de alta probabilidade para construção de árvores de espécies distantes evolutivamente e sequências com relógio molecular bem definido, o que se aplica ao gene de RNA ribossomal 16S em bactérias filogeneticamente diversas (VERLI, 2014).

Um total de 44 genes ou produtos gênicos de mecanismos de sobrevivência em condições extremas relacionados aos genomas foram considerados (Apêndice A), e o panorama da distribuição desses genes ou produtos gênicos entre os táxons pode ser observado na Figura 2. Priorizou-se os mecanismos que apresentavam uma associação entre genes e um ou dois produtos facilmente reconhecíveis, de modo a facilitar nossas análises, e escolhemos uma amostra entre essas sequências para alinhamento na plataforma BLAST devido a limitação de tempo. As sequências de aminoácidos foram utilizadas como *query* (entrada), visto que são mais conservadas que as de nucleotídeos, e aplicamos o método tBLASTn de alinhamentos, onde uma sequência de entrada de aminoácidos resulta em alinhamentos de nucleotídeos (VERLI, 2014). Para cada táxon utilizamos a espécie ou gênero na busca no tBLASTn, tomando o cuidado de observar se uma cepa resultante foi descrita ou não como extremófila.

Figura 2 - Bactérias extremófilas e seus genes ou produtos gênicos associados à sobrevivência em ambientes extremos de acordo com a literatura.



Legenda - Destaque em caixa vermelha para as produtos gênicos LuI, LuxR,, Xyn10A e LuxS associados ao sistema *Quorum Sensing*.

Fonte: Ilustração do autor (2022). As fontes para os genes/produtos estão relacionadas no Apêndice A.

5.1 GENES DE EXTREMÓFILOS DO FILO DEINOCOCCUS-THERMUS

Os táxons *Thermus* e *Deinococcus* divergiram de um grupo ancestral comum (Figura 1), sendo ambos membros do filo *Deinococcus–Thermus* e classe *Deinococci*, com representantes reconhecidos, respectivamente, por sua tolerância às altas temperaturas e radiotolerância. *Deinococcus radiodurans* evoluiu de modo a desenvolver grande aparato de sobrevivência à alta radiação, com destaque especial para os produtos gênicos de vias de reparo de DNA, como por exemplo: DdrD (DE LA TOUR *et al.*, 2021), OxyR, RecA, UvrA, UvrB e GyrA, GyrB (MOURA *et al.*, 2021; DE LA TOUR *et al.*, 2021), como também as proteínas de resistência ao estresse oxidativo e radiação PPK e PPX (DAI *et al.*, 2021) e as proteínas de embriogênese tardia - LEAs, que desempenham um papel de estabilização de enzimas similar ao das chaperonas (LIU *et al.*, 2021). As chaperonas por sua vez são descritas em espécies termófilas como as do género *Thermus*, na preservação de proteínas em altas

temperaturas, com destaque para as chaperonas DnaK, GroEL e a co-chaperona GroES, que agem sobre o enovelamento de proteínas (ORELLANA *et al.*, 2018). *D. radiodurans* e *Thermus thermophilus* também compartilham a presença da proteína de ligação de incompatibilidade - MutS (Figura 2), igualmente relacionada ao processo de reparo ao detectar ligações incorretas entre as fitas do DNA (BANASIK *et al.*, 2017).

As proteínas OxyR, UvrA, UvrB, GyrA, GyrB, Dps2 e RecA de *D. radiodurans* foram descritos em muitos filões de bactérias presentes em painéis fotovoltaicos sujeitos à alta radiação (MOURA *et al.*, 2021), sendo genes bastante difundidos entre as espécies bacterianas. Em alinhamentos desses genes com *Thermus spp.* no tBLASTn, os produtos OxyR e GyrA apresentaram baixo Percentual de Identidade (PI), indicando que apesar das sequências se alinharem ao longo de quase toda sua extensão, como indicou o *Query Cover* (QC) alto, existem muitas diferenças entre os caracteres (Tabela 1). Isso pode ser entendido ao pensarmos que *D. radiodurans* tem uma pressão seletiva maior em relação ao dano por radiação, o que teria moldado esses genes de forma acentuada, distinguindo-se dos genes homólogos do mesmo ancestral comum.

Tabela 1 - Resultados para o alinhamento no tBLASTn dos produtos de genes de reparo de DNA em *Thermus spp.* e *Deinococcus spp.*

Percentuais de identidade máximos (PI Máx.) para produtos gênicos de reparo de DNA						
<i>Táxons alinhados</i>	PI Máx. OxyR	PI Máx. RecA	PI Máx. UvrA	PI Máx. UvrB	PI Máx. GyrA	PI Máx. Dps2
<i>Thermus spp.</i>	33,58%	63,35%	66,29%	62,89%	47,47%	-
<i>Deinococcus spp.</i>	89,91%	92,08%	93,70%	97,91%	92,73%	75,11%

Fonte: O autor (2022).

Thermus spp. também não apresentou resultados de alinhamento para o produto gênico Dps2, o que a princípio interpretávamos que, mesmo com a aproximação filogenética, ele não compartilha potenciais homólogos para todos os genes de reparo em *Deinococcus spp.* Não podemos afirmar se o gene *dps2* de fato ocorre ou não em *Thermus spp.*, mas é possível a hipótese de que o gene *dps2* seria de ocorrência exclusiva ao táxon *Deinococcus*, ou mesmo que esse gene teria ocorrido em um ancestral comum ao grupo, mas que tenha se perdido em *Thermus spp.*

Segundo Averhoff (2021) *T. thermophilus* apresenta um sofisticado sistema de captação de DNA exógeno, e podemos indagar se algum desses mecanismos adaptativos compartilhados ou com funções similares apontam indícios para a Transferência Horizontal de Genes (THG). Buscou-se a relação dos genes de reparo de DNA em *D. radiodurans* com Ilhas Genômicas ou *Genomic Islands* (GIs) e Elementos Genéticos Móveis (EGMs) no IslandViewer 4 para os táxons *Thermus* e *Deinococcus*, utilizando as sequências resultantes dos alinhamentos no tBLASTn. Somente o gene *recA* em *Thermus spp.* apresentou resultados positivos, com ao menos sete casos de cepas com ocorrência de *recA* em ilhas genômicas (Quadro 2) e percentual de identidade (PI) dos alinhamentos de até 63,35%, o que é um valor moderado para correlação funcional, segundo Haft (2015).

Quadro 2 - Resultados para genes *recA* associados a GIs ou EGMs nos extremófilos do filo *Deinococcus-thermus*.

Genoma	Resultados no IslandViewer 4 para o gene <i>recA</i>
<i>Deinococcus puniceus strain DYI</i>	<i>recA</i> inserido em uma GI prevista
<i>Deinococcus sp. 17bor-2</i>	<i>recA</i> imediatamente vizinho a IS5/IS1182 <i>family transposase</i>
<i>Thermus sp. YIM 78456</i>	<i>recA</i> inserido em uma GI prevista
<i>Thermus parvatiensis strain RL</i>	<i>recA</i> inserido em uma GI prevista
<i>Thermus thermophilus AA2-20</i>	<i>recA</i> inserido em uma GI prevista
<i>Thermus thermophilus AA2-29</i>	<i>recA</i> inserido em uma GI prevista
<i>Thermus thermophilus isolate TTHNAR1</i>	<i>recA</i> inserido em uma GI prevista
<i>Thermus thermophilus HC11</i>	<i>recA</i> inserido em uma GI prevista
<i>Thermus thermophilus</i>	<i>recA</i> inserido em uma GI prevista

Fonte: O autor (2022).

Podemos comparar esse resultado com o de alinhamento para *Deinococcus spp.*, onde encontramos apenas um genoma com *recA* inserido em GI, e outro com *recA* vizinho aos EGMs IS5/IS1182, sendo resultados menos expressivos no momento (Quadro 2). A alta frequência de *recA* em GIs de *Thermus spp.*, é um indicação de que esse gene poderia ter origem exógena para o táxon, um potencial a ser investigado. A aproximação filogenética entre *Thermus spp.* e *Deinococcus spp.*, e o fato de *Deinococcus* serem reconhecidos pela alta resistência a radiação o torna um dos muitos candidatos para fonte externa de *recA* em *Thermus spp.*, por um possível mecanismo de THG. Outra hipótese seria avaliar se um ancestral comum entre *Deinococcus spp.* e *Thermus spp.* adquiriu o gene *recA* por

transferência horizontal, e que essa origem manteve-se mais conservada em um táxon do que em outro.

Outro produto gênico de reparação de material genético, o DdrD descrito em *D. radiodurans* foi observado apenas em organismos desta espécie e sem relação com GIs, o que indica que o gene não só é restrito, como já observado por De La Tour (2021), como tem baixas chances de mobilidade por meio de EGMS. Para outras espécies do gênero *Deinococcus*, DdrD apresentou alinhamento com o gene de diferente nomenclatura “*multidrug DMT transporter*”, sinal de que existe alguma história evolutiva dentro do táxon, mas que o mesmo poderia ter divergido significativamente e apresentado uma variação na sua funcionalidade. De La Tour (2021) também indica que DdrD faz parte de uma família de proteínas de reparo de DNA que possui uma sequência específica em sua região promotora, chamada *Radiation Desiccation Response Motif* (RDRM), o que ajuda a justificar esses alinhamentos dentro do gênero, mas ainda assim não garante semelhança suficiente para que a proteína DdrD se alinhe a outros produtos gênicos da mesma família de proteínas em *Thermus*, como UvrAB, GyrAB e RecA. Ainda segundo De La Tour (2021), a proteína do DdrD atua com mais frequência sobre fitas de RNA, e em condições de exposição a radiação concomitante à escassez de nutrientes, mostrando que a diversidade de genes de reparo em *D. radiodurans*, a princípio redundantes, podem ter atuações específicas em cenários específicos. Outro gene de comparação que reforça essa observação é o gene da proteína de incompatibilidade MutS, que segundo Banasik (2017) ocorre em ambos os táxons *Thermus* e *Deinococcus*, porém em *D. radiodurans* essa proteína apresenta maior especificidade na sua ligação ao DNA danificado, indicando uma maior plasticidade de funções nessa espécie.

Os produtos gênicos das chaperona GroEL e co-chaperona GroES de *Thermus thermophilus*, ligados a adequação de proteínas ao choque térmico, mostraram alta identidade nos indivíduos do gênero *Thermus*, no intervalo de 95 e 100%, sem nenhuma relação observada com GIs ou EGMS. O radiotolerante *Deinococcus spp* apresentou resultados positivos para os genes de GroEL e GroES como esperado diante da aproximação filogenética observada (Figura 1), como também estão localizados nos demais genomas estudados de halotolerantes, psicrófilos e acidófilos, mostrando sua alta dispersão entre os táxons independente de suas características termófilas. As moléculas de chaperona são segundo

Orellana (2018) um dos mecanismos recorrentemente associados a extremófilos termófilos, porém devido a ampla distribuição e variação, esses dados não foram explorados.

5.2 GENES DE EXTREMÓFILOS DO FILO FIRMICUTE

O filo *Firmicutes* foi representado por *Geobacillus stearothermophilus* e *Halanaerobium hydrogeniformans* (Figura 1). *G. stearothermophilus* é uma espécie termófila descrita em áreas vulcânicas, um ambiente que segundo Puopolo (2020), não é só quente mas também rico em metais pesados como arsênio e cádmio, dos quais essa espécie e outros representantes de seu gênero apresentam resistência. Na análise do genoma de referência de *G. stearothermophilus* no IslandViewer 4, observamos a alta ocorrência de Ilhas genômicas, o que não foi discutido no artigo de identificação da espécie de Puopolo (2020), e que poderia ser a origem de algum de seus mecanismos de resistência. Para sua resistência ao cádmio, a espécie apresenta os genes de *cadmium transporter*, *cadC* e *cadA*, e para resistência ao arsênio apresenta os genes de *arsenate reductase*, *arsR*, *arsB* e *arsC*. No IslandViewer 4 encontramos genes de *ars* e *cad* próximos de transposases ou mesmo inseridos em uma GI para a cepa *G. stearothermophilus* DG-1 (Quadro 3), reforçando a hipótese de que os genes de resistência em *G. stearothermophilus* teriam potencial para transferência horizontal. A equipe de Zhang (2019) descreveu que o arsênio em corpos d'água promoveu a disseminação de genes de resistência por EGMs como *transposons* e *integrans*, devido à pressão seletiva e resistência cruzada, o que vai em favor de nossa hipótese. Contudo, como as cepas de *G. Stearothermophilus* possuem sua ocorrência muito associada a regiões vulcânicas, a restritividade filogeográfica do gênero pode ser um empecilho na mobilidade desses genes em outros táxons.

O outro representante do filo *Firmicutes*, *H. hydrogeniformans* é um halotolerante de lago salino que, de acordo com Sadler (2020), apresenta uma ocorrência extremamente alta de sequências de inserção de variadas famílias, em proporção maior que o observado na maioria das bactérias. A forte associação dos genomas extremófilos de *Firmicutes* com EGMs e GIs foi decisiva na nossa escolha para análise dos mesmos, tendo em vista todo o potencial que a transferência horizontal de genes pode oferecer na transmissão de características de resistência.

Quadro 3 - Resultados para genes de “cad” e “ars” associados a GIs ou EGMs no extremófilo *Geobacillus stearothermophilus*.

Genoma	Resultados no IslandViewer4 para o Genes <i>cad</i> e <i>ars</i> de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 10	Gene <i>cad</i> vizinho a uma GI
	Gene <i>ars</i> a cerca de 3kb de distância de uma <i>transposase</i> família IS110
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> strain B5	Gene <i>cad</i> a menos de 1kb de distância de uma <i>transposase</i> família IS1182
	Gene <i>ars</i> a menos de 3kb de distância de uma <i>transposase</i> família IS66
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> strain DG-1	Gene <i>cad</i> a cerca de 1kb de distância de uma <i>transposase</i> família IS110
	Genes de <i>cad</i> e <i>ars</i> inseridos em uma GI prevista

Fonte: O autor (2022).

Para os genes de radiotolerância presentes em *D. radiodurans* (Figura 2), o termófilo *G. stearothermophilus* e o halotolerante *H. hydrogeniformans*, apresentaram alinhamento no tBLASTn com os produtos dos genes de *gyrAB*, *mutS*, *uvrAB* e *recA*. No visualizador de genes do IslandViewer 4 observamos que em representantes de ambos os táxons, o gene *mutS* apresentou-se vizinho ao *mutL*, o que foi possível identificar nesse caso, similar ao observado em *D. radiodurans*, enquanto que *H. hydrogeniformans* apresentou quatro cópias do gene *mutS*. Essas são evidências da conservação do padrão de genes vizinhos *mutS/mutL*, e de uma possível relação de maior expressividade de seus produtos e o número de cópias. *G. stearothermophilus* também apresentou resultado de alinhamento para o gene *oxyR*, embora o percentual de identidade tenha sido baixo para correlação funcional, de 26,49% a 28,81%. Já *H. hydrogeniformans* apresentou alinhamento para o produto gênico de *ppx*, com identidade também abaixo de 29,47%. A baixa similaridade no alinhamento dos produtos gênicos de *ppx* e *oxyR* em ambos os genomas pode apontar diferenças na funcionalidade dos seus produtos em relação ao de *D. radiodurans*, ou mesmo alteração ou perda de sua funcionalidade na tolerância à radiação. Aqui observamos que, mesmo que alguns genes de resistência sejam compartilhados, o *D. radiodurans* demonstra uma composição de genes mais ampla para resistência à alta radiação em relação aos outros extremófilos do filo *Firmicutes*.

5.3 GENES DE EXTREMÓFILOS DO FILO ACTINOBACTERIA

Podemos destacar também a aproximação filogenética do gênero predominantemente psicrófilo *Cryobacterium*, com o gênero de representantes termófilos e radiotolerantes *Rubrobacter*, ambos do filo *actinobacteria* (Figura 1). Segundo Liu (2020) existe um potencial para que a THG esteja envolvida na origem de genes dentro de *Cryobacterium spp.*, devido ao aumento de tamanho do genoma e baixa taxa de substituição de aminoácidos nos seus representantes extremófilos em relação aos representantes mesófilos. Os extremófilos de *Cryobacterium* também apresentam mecanismos de multirresistência, como sobrevivência a radiação ou escassez nutricional, mas Liu (2020) afirma haver pouco estudo sobre seus mecanismos. Já *Rubrobacter spp.*, de acordo com Kouřilová (2021), possui representantes termófilos, radiotolerantes e/ou halotolerantes, apresentando vários mecanismos de reparo de DNA, além de expressar Polihidroxicanoatos - PHA, um poliéster que potencializa a robustez e resistência a diversos fatores estressores e relaciona-se com os genes *phaC* e *phaE* (Figura 2). Assim, o mecanismo descrito para o gênero *Rubrobacter* foi investigado como possíveis componentes de multirresistência para *Cryobacterium spp.*

Localizamos os genes *phaE*, *phaC* Classe I e *phaC* Classe III ligados a expressão de Polihidroxicanoatos - PHA em *Rubrobacter xylanophilus*, e alinhamos aos táxons de extremófilos de modo a avaliar sua distribuição. Como resultado, no alinhamento do produto gênico PhaE com o táxon *Rubrobacter*, excluindo-se o genoma de origem *R. xylanophilus*, já é possível observar uma identidade entre 36,31% a 45,81%, indicando alta variação na sequência dentro do gênero (Tabela 2). Para o produto PhaC Classe I em *Rubrobacter* a identidade foi moderada para alta, entre 61,72% e 63,90% e para PhaC Classe III entre 70,62% e 76,33%. Podemos inferir que o gene *phaE* pode ser mais restrito filogeneticamente e representar um dos diferenciais do genoma de *Rubrobacter xylanophilus* em sua multirresistência, diferenciando-se de outros genomas do gênero *Rubrobacter spp.* Isso se reforça ao observamos que o produto gênico de *phaE* não apresentou outros resultados para alinhamentos com os táxons de extremófilos selecionados, com uma única exceção de *Halomonas sp. BM-2019* que alinhou com 11% da extensão da sequência, o que não consideramos significativo para o momento.

Tabela 2 - Resultado de alinhamentos no tBLASTn dos produtos dos genes *phaE*, *phaC* Classe I e *phaC* Classe III de *Rubrobacter xylanophilus* para táxons de bactérias extremófilas.

Grupos taxonômicos	Táxons alinhados	PhaE		PhaC Classe I		PhaC Classe III	
		Query Cover	Perc. Ident.	Query Cover	Perc. Ident.	Query Cover	Perc. Ident.
		Máx	Máx.	Máx.	Máx.	Máx.	Máx.
	<i>Halomonas spp.</i>	11%	52,78%	90%	44,09%	91%	29,37%
	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	-	-	78%	40,33%	83%	26,41%
Classe	<i>Pseudomonas antarctica</i>	-	-	79%	40,08%	80%	26,81%
Gammaproteobacteria	<i>Psychrobacter spp.</i>	-	-	-	-	-	-
Classe	<i>Acidithiobacilia</i>						
	<i>Acidithiobacillus spp.</i>	-	-	-	-	-	-
Classe	<i>Alphaproteobacteria</i>						
	<i>Acidiphilium spp.</i>	-	-	88%	42,81%	86%	28,83%
	<i>Halanaerobium hydrogeniformans</i>	-	-	-	-	-	-
Filo Firmicutes	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	100%	93,62%	96%	92,09%	100%	94,69%
	<i>Rubrobacter spp. (exceto R. xylanophilus)</i>	100%	45,81%	95%	63,90%	99%	76,33%
Filo Actinobacteria	<i>Cryobacterium spp.</i>	-	-	-	-	55%	22,82%
Filo	<i>Thermus spp.</i>	-	-	-	-	21%	34,25%
Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus spp.</i>	-	-	-	-	36%	52,94%

Legenda - Os valores representam o *Query Cover* Máximo e Percentual de Identidade Máximo (Perc Ident. Máx.).

Fonte: O autor (2022).

Os psicrófilo *Cryobacterium spp.* não apresentou alinhamento com resultados positivos para PhaE e PhaC Classe I, sendo o único alinhamento observado o de PhaC Classe III, com percentual de identidade baixo de 22,82%, indício de que apesar da aproximação filogenética, não existiria o compartilhamento desse mecanismo de resistência de *R. xylanophilus*. A partir dessa análise, negamos nossa hipótese de expressão da ação de PHA na multirresistência de *Cryobacterium spp.*, e sugerimos que esse táxon possui outros genes ligados à sua multirresistência.

Diferente do gene *phaE*, os produtos dos genes *phaC* Classe I e Classe III alinharam com sequências de outros genomas extremófilos (Tabela 2), porém nenhum deles apresentou evidências de alta similaridade, onde mesmo a maior identidade encontrada, de 52,94% em *Deinococcus sp*, alinhou-se com apenas 36% da sequência de busca, indicação de que possivelmente não existe similaridade funcional entre as sequências alinhadas.

5.4 GENES DE EXTREMÓFILOS DO FILO PROTEOBACTERIA

5.4.1 Genes de osmorregulação no Filo Proteobacteria

Dentro do filo proteobacteria temos representantes extremófilos da classe *gammaproteobacteria* (Figura 1), entre eles os halófilos *Halomonas elongata* e *Chromohalobacter salexigens*, da mesma família *Halomonadaceae*. *C. salexigens* se beneficia da ação de 5-hidroxiectoína, composto derivado da ectoína que junto à mesma confere halotolerância e termoproteção à célula, cuja síntese está ligada a enzima *ectoína hidroxilase* codificada pelos genes *ectD* e *ectE* (Figura 2). Esses genes foram apontados em bactérias filogeneticamente próximas ao *C. salexigens*, especialmente *H.elongata* e outras *gammaproteobacterias*, mas com baixa ocorrência dos dois genes em um mesmo organismo. As psicrófilas *Pseudomonas antarctica* e *Psychrobacter cryohalolentis*, são também da classe *gammaproteobacteria* (Figura 1), o que nos levou a avaliar a ocorrência de genes como *ectE* ou homólogos, visto que esse gene atua também com a termorregulação em *C. salexigens* (ARGANDOÑA *et al.*, 2021).

Observamos que *P. antarctica* e *Psychrobacter spp.* apresentaram alinhamentos para os dois genes *ectD* e *ectE*, com *Query Cover* entre 66 e 67% para cepas *Psychrobacter sp. PAMC27889* e *Psychrobacter alimentarius strain PAMC 27889*, e de 81% e 84% para *Pseudomonas antarctica strain PAMC 27494* (Tabela 3). No entanto, o percentual de identidade em ambos não ultrapassou os 28,68%. Podemos supor que apesar dessas três cepas alinharam com os dois genes da enzima ectoína, a identidade pouco compatível é um indicador de diferença de funcionalidade entre os táxons, e talvez a produção de 5-hidroxiectoína não ocorra nestes genomas psicrófilos. Nossa hipótese é de que esses genes se originaram em um ancestral comum entre os *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Pseudomonas*

e *Psychrobacter*, e que antes da origem ancestral do filo das *gammaproteobacterias*, teria ocorrido a duplicação do gene que originou *ectD* e *ectE*, já que segundo Argandoña (2021) esses genes seriam frutos de uma duplicação e encontram-se em localizações distantes dentro do genoma. Porém *ectD* e *ectE* teriam divergido diferentemente entre os táxons, de modo a apresentar uma vantagem evolutiva para os representantes halotolerantes. Um estudo filogenético dentro do grupo das *gammaproteobacteria*, incluindo representantes mesófilos e extremófilos poderiam ajudar a elucidar melhor essa história evolutiva.

Tabela 3 - Resultados de alinhamentos no tBLASTn para os produtos dos genes *ectD* e *ectE* com táxons de bactérias extremófilas.

<i>Grupos Taxonômicos</i>	<i>Táxon alinhado</i>	EctD		EctE	
		Query Cover Máx.	Perc. Ident. Máx.	Query Cover Máx.	Perc. Ident. Máx.
	<i>Halomonas spp.</i>	100%	77,84%	100%	87,58%
	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	100%	100%	100%	100%
<i>Classe Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas antarctica sp</i>	81%	27,04%	84%	28,68%
	<i>Psychrobacter spp.</i>	66%	27,40%	77%	24,42%
<i>Classe Acidithiobacilia</i>	<i>Acidithiobacillus spp.</i>	-	-	-	-
<i>Classe Alphaproteobacteria</i>	<i>Acidiphilium spp.</i>	90%	50,18%	99%	46,90%
	<i>Halanaerobium hydrogeniformans</i>	-	-	-	-
<i>Filo Firmicutes</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	-	-	-	-
	<i>Rubrobacter marinus SCSIO 52915</i>	20%	41,54%	-	-
<i>Filo Actinobacteria</i>	<i>Cryobacterium spp.</i>	-	-	-	-
	<i>Thermus spp.</i>	-	-	-	-
<i>Filo Deinococcus-Thermus</i>	<i>Deinococcus spp.</i>	-	-	-*	-

Legenda - No quadro é possível observar os valores máximos encontrados para o *Query Cover* e Percentual de Identidade (Perc. Ident.) entre as sequências. Os quadros com traços “-” não apresentaram resultados para os alinhamentos.

Fonte: O autor (2022).

Todavia podemos observar que a também proteobacteria *Acidiphilium spp.* apresentou alinhamentos dos produtos EctD e EctE para as cepas *Acidiphilium multivorum strain JZ-6*, *Acidiphilium multivorum AIU301* e *Acidiphilium cryptum JF-5*, todas acidófilas e resistentes a metais pesados (JIN *et al.*, 2020; ULLRICH *et al.*, 2015; MORITZ *et al.*, 2014). Em busca na literatura, descobrimos que Moritz (2014) já havia descrito a produção de hidroxietoína em

Acidiphilium cryptum JF-5, com expressão metabólica funcional e capacidade de resposta a estresse osmótico, apesar da diferença estrutural da enzima. Podemos supor que devido os resultados similares nos alinhamentos, as outras duas cepas de *A. multivorum* também possuam a capacidade de expressar ectoínas e hidroectoína e se beneficiar de seu efeito osmorregulador, sendo mais um indicativo da capacidade de multirresistência de bactérias extremófilas. No entanto, como os resultados para alinhamento contemplam somente três cepas, com percentuais de identidades significativos, convém avaliar como essas bactérias adquiriram esse mecanismo adaptativo.

Uma das hipóteses seria de que essas cepas de *Acidiphilium spp.* adquiriram esse mecanismo de um grupo ancestral comum com o táxon *gammaproteobacteria*. Por outro lado, outra hipótese que preencheria essa lacuna é a de que esses genes foram transferidos horizontalmente. Porém, o estudo de Argandoña (2021) demonstra que os genes *ectD* e *ectE* não estão relacionados em sua localização dentro do genoma, o que dificultaria o transporte concomitante desses dois genes por uma transposase, por exemplo. Podemos concluir somente que, apesar de não conhecermos todos os detalhes da origem desses genes dentro das proteobacterias, existe sim um potencial no genoma de três cepas de *Acidiphilium spp* para a multirresistência em meio alcalino por osmorregulação.

Isso abre margens para avaliar se esses táxon compartilham outros genes de resistência halotolerantes, e para testar isso avaliamos a ocorrência dos genes que codificam canais mecanossensíveis em *Halomonas elongata*, *mscK*, *mscS1*, *mscS2* e *mscS3* (Figura 2), que foram estudados como candidatos na sua regulação osmótica (VANDRICH *et al.*, 2020).

Podemos observar na Tabela 4 que o psicrófilo *Pseudomonas antarctica sp* apresentou alinhamentos para os quatro genes de canais mecanossensíveis em *Halomonas elongata* descritos por Vandrich (2020). Esse resultado é compatível com o esperado de acordo com nossa árvore filogenética na Figura 1, e podemos inferir que esse grupo possui um ancestral comum que adquiriu essa composição de genes. Isso pode ser observado se considerarmos também que os filós mais distantes tiveram menores resultados para os alinhamentos, mostrando uma composição “incompleta” do conjunto de genes.

Tabela 4 - Contagem de ocorrência dos produtos dos genes *mscK*, *mscS1*, *mscS2* e *mscS3* de *Halomonas elongata* em táxons extremófilos baseado nos alinhamentos realizados no tBLASTn.

Grupo taxonômico	Táxon alinhado	MscK	MscS1	MscS2	MscS3	Score total
	<i>Halomonas spp.</i>	1	1	1	1	4
	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	1	1	1	1	4
	<i>Pseudomonas antarctica sp</i>	1	1	1	1	4
Classe Gammaproteobacteria	<i>Psychrobacter spp.</i>	1	1	1	0*	3
Classe Acidithiobacilia	<i>Acidithiobacillus spp.</i>	1	1	0	0	2
Classe Alphaproteobacteria	<i>Acidiphilium spp.</i>	0	1	1	1	3
	<i>Halanaerobium hydrogeniformans</i>	1	1	1	0	3
Filo Firmicutes	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	0	0	0	1	1
	<i>Rubrobacter xylanophilus sp</i>	0	1	1	0	2
Filo Actinobacteria	<i>Cryobacterium spp.</i>	0	0	1	0	1
	<i>Thermus spp.</i>	0	0	0	0	0
Filo Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus spp.</i>	1	0	0	0	1

Legenda - Pontuamos com o caractere “1” a ocorrência de alinhamento do gene, e com “0” a ausência de resultados de alinhamentos. *O alinhamento do gene *MscK* com o táxon *Psychrobacter sp* apresentou um único alinhamento para plasmídeo, o que foi desconsiderado em nossos resultados no momento.

Fonte: O autor (2022).

5.4.2 Genes de resistência à acidez e metais pesados no Filo Proteobacteria

Outro grupo relacionado, ainda dentro das proteobactérias, são os das acidófilas *Acidithiobacillus sp*, da classe *Acidithiobacillia*, e as também acidófilas *Acidiphilium sp*, da classe *Alphaproteobacteria* (Figura 1). Acidófilas comumente utilizam mecanismos de efluxo e de prótons (GALVEZ *et al.*, 2022), bombeando-os por meio da ação de ATPases (ORELLANA *et al.*, 2018), ou aprisionamento de íons metálicos. *Acidithiobacillus caldus* é um bactéria que apresenta genes como *kdpB* (Figura 2) relacionado com a resistência ao pH alto ao regular o fluxo de prótons. O outro gênero acidófilo *Acidiphilium* apresenta os genes *sox*, *psr* e *sqr* de utilização de compostos com enxofre, e os genes *czc*, *cop*, e o já citado *ect* ligados a resistência a metais pesados e estresse osmótico, segundo Li (2020). Os genes *sox* e *sqr*, são descritos para os dois gêneros em ambos os autores, o que, reforçado pela aproximação filogenética e similaridade de nicho, poderia ser um indício de que outros genes também são compartilhados ou possuem homólogos entre os táxons *Acidithiobacillus sp* e *Acidiphilium sp*. Como uma análise amostral, alinhamos no tBLASTn o produto gênico *KdpB* com os táxons de extremófilos estudados (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultado de alinhamentos no tBLASTn para o produto do gene *kdpB* em *Acidithiobacillus caldus* com táxons de bactérias extremófilas.

<i>Grupo Filogenético</i>	<i>Táxon alinhado</i>	KdpB	
		Query Cover Máximo	Percentual de Identidade Máximo
<i>Classe</i>			
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Halomonas spp.</i>	99%	62,98%
	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	76%	28,60%
	<i>Pseudomonas antarctica sp</i>	99%	63,66%
	<i>Psychrobacter spp.</i>	97%	62,50%
<i>Classe Acidithiobacilia</i>	<i>Acidithiobacillus spp.</i>	100%	96,95%
<i>Classe Alphaproteobacteria</i>	<i>Acidiphilium spp.</i>	97%	59,50%
<i>Filo Firmicutes</i>	<i>Halanaerobium hydrogeniformans</i>	71%	27,00%
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	97%	55,98%
<i>Filo Actinobacteria</i>	<i>Rubrobacter spp.</i>	87%	31,63%
	<i>Cryobacterium spp.</i>	97%	59,77%
<i>Filo Deinococcus-Thermus</i>	<i>Thermus spp.</i>	93%	61,15%
	<i>Deinococcus spp.</i>	99%	60,93%

Legenda - No quadro é possível observar o intervalo de valores encontrados para o Query Cover e Percentual de Identidade entre as sequências. Os quadros com traços não apresentaram resultados para os alinhamentos.

Fonte: O autor (2022).

Observamos que o gene *kdpB* é amplamente distribuído entre os genomas de extremófilos, apresentando alinhamentos em todos os casos, com identidade acima de 59% nos táxons *Halomonas spp.*, *Pseudomonas antarctica sp.*, *Psychrobacter spp.*, *Acidiphilium spp.*, *Cryobacterium spp.*, *Thermus spp.* e *Deinococcus spp.* O *Query Cover* alto para todos os alinhamentos indica que houve um alinhamento ao longo de boa parte da extensão das sequências, o que reforça a hipótese de homologia, bem como de conservação funcional. Podemos entender que o gene não só é amplamente distribuído como sua sequência é significativamente conservada entre os grupos, apontando para uma conservação funcional. Os diversos alinhamentos com percentual muito variável pode indicar genes homólogos com funções e nomenclaturas diferentes.

Localizamos alinhamentos do gene *kdpB* em plasmídeos para cepas das proteobactérias *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Psychrobacter sp.*,

Halomonas sp, como também das actinobacterias *Rubrobacter sp* e *Cryobacterium sp* e nas deinococcus-thermus *Thermus brockianus sp* e *Deinococcus sp*. Plasmídeos são sequências de DNA extracromossomal que podem ser transmitidas horizontalmente entre bactérias (ABE *et al.*, 2020), e a ampla distribuição do gene *kdpB* em plasmídeos pode então justificar sua ocorrência e conservação em tantas espécies filogeneticamente distantes.

5.5 GENES DE BIOFILMES EM BACTÉRIAS EXTREMÓFILAS

O *Quorum sensing* - QS é o sistema sinalizador responsável pela formação de biofilmes, que já foi associado com a adaptação ao frio e ao estresse oxidativo (KAUR *et al.*, 2019), tolerância a metais pesados ao solubilizar os metais pela adsorção por meio de ligação a sítios iônicos (GALVEZ *et al.*, 2022) e tolerância à radiação ultravioleta (UV), alta temperatura, alta salinidade e alta pressão. Diferente dos produtos gênicos descritos até então, o biofilme confere tolerância aos microorganismos, e não resistência. A tolerância pode ser entendida como um fenótipo transitório, dependendo de fatores externos para ser expressada (YIN *et al.*, 2019). QS possuem um papel social onde apenas a alta concentração de autoindutores de QS, gerada por várias bactérias, levaria a ativação do regulador transcricional e consequente expressão de genes ligados ao EPS. Dessa forma, a síntese de compostos caros ao metabolismo só seriam expressos se fosse vantajoso para um grupo de bactérias (WHITELEY *et al.*, 2017). As bactérias do filo *Deinococcus-thermus* apresentam o sistema QS autoinducer-2 ou apenas AI-2 (Figura 2), que envolve a enzima autoindutora LuxS, mesmo que nem sempre apresente-se completo, podendo possuir apenas proteínas sinalizadoras ou receptoras, ocorrendo em gram-positivas e gram-negativas. É o sistema QS descrito em comunicação inter-espécie, onde seu sinalizador possui vários isômeros compatíveis com diversas espécies. A enzima LuxS, porém pode apresentar inúmeros receptores diferentes associados, como as proteínas periplasmáticas LuxP, LsrB, RbsB, bem como estar presente na célula cumprindo um outro papel que não o de Quorum Sensing (KAUR *et al.*, 2019).

Segundo Kaur (2019) *Acidithiobacillus spp.* e *Acidiphilium spp.* compartilham um outro sistema de QS, o Sistema AI-1 ou apenas AI-1, onde a enzima autoindutora LuxI-1

sintase ou homólogos participa na formação da *Acylated Homoserine Lactones* (AHLs), que desempenha o papel de molécula sinalizadora, tendo como receptor a LuxR ou seus homólogos, um regulador transcricional dos genes de interesse. Ainda de acordo com Kaur (2019), o sistema AI-1 ocorre em outras proteobactérias com representantes extremófilos como *Pseudomonas spp.* e *Halomonas spp.*. A presença de biofilmes em *Acidithiobacillus ferrooxidans* afeta a solubilidade de metais e coopera na sua adaptação (GALVEZ *et al.*, 2022), e podemos pensar que o mesmo benefício se aplicaria a táxons que apresentam homólogos do mesmo sistema QS. No entanto, Kaur (2019) também observou o sistema AI-1 em *Deinococcus radiodurans*, que não pertence às proteobactérias, sendo citado também em archaea e cianobactérias, indício de que essa característica pode ser de origem muito primitiva, anterior a divergência entre os grandes clados, visto também o que Whiteley (2017) apontou sobre o sistema QS apresentar função sinalizadora entre bactérias de espécies diferentes.

Vale observar que, apesar dessas similaridades, Kaur (2019) também observou mecanismos de QS mais específicos, como em *Acidithiobacillus thiooxidans*, onde o efector segundo mensageiro c-di-GMP e o operon *pel*-like são apontados como característicos dos oxidantes de enxofre do gênero *Acidithiobacillus*. O gene *pel* seria regulado positivamente pelo AHL, gerando os exopolissacarídeos PEL do biofilme de *A. thiooxidans* (DÍAZ *et al.*, 2021). *Geobacillus stearothermophilus cepa T-6*, por sua vez, gera a proteína xilanase extracelular (Xyn10A) que origina xilo-oligossacarídeos, onde a sua produção foi relacionado com alta densidade populacional e é sugerido como um potencial sinalizador QS, mas ainda pouco esclarecido (KAUR *et al.*, 2019). Esses mecanismos mais específicos podem apontar que apesar da conservação funcional de moléculas ligadas ao QS, existem indícios de adaptações de forma mais restrita.

Parece uma hipótese razoável pensar que genes ligados a mecanismos de resistência tenham paralelos evolutivos com os genes responsáveis pela formação de biofilmes. Isso já foi discutido na relação de biofilmes com as bombas de efluxos do sistema RND, ligado à resistência a antibióticos e metais pesados em muitos grupos, onde o sistema RND seria regulado por moléculas do sistema QS (LIANG *et al.*, 2016). De acordo com Uruén (2020), os biofilmes também são apontados como um ambiente propício para a THG, devido à

aproximação das bactérias e a ocorrência de DNA extracelular, tornando-o um ambiente propício para a mobilidade de genes de resistência.

A presença de biofilmes vem sendo também associada à resistência bacteriana em ambientes extremos decorrente da interferência humana, como ambientes com ocorrência de xenobióticos, que são compostos estranhos aos organismos vivos, aos quais eles não tinham contato anteriormente (EMBRANDIRI *et al.*, 2016).

5.6. DISCUSSÃO GERAL

Os genomas e genes que elencamos são uma amostra pequena diante de tanto material disponível, mas que atendeu nosso objetivo como porta de entrada para a discussão sobre a diversidade de genes em extremófilos.

Investigamos a mobilidades dos genes e encontramos três resultados relevantes: O gene de reparo de DNA *recA* associado a GIs e EGMs em *Thermus spp.*; Os genes *ars* e *cad* em *Geobacillus stearothermophilus*, próximos à EGMs ou mesmo inseridos em uma GI; e por fim o gene *kdpB* de resistência acidófila em *Acidithiobacillus spp.* foi alinhado com identidade significativa aos plasmídeos de inúmeros genomas de extremófilos, como também dentro dos cromossomos. Essas são evidências de que a diversidade de genes de resistência em bactérias extremófilas pode, em uma pequena parte, ter relação com a THG. Esses genes teriam uma história evolutiva própria ligada a uma pressão seletiva específica, porém a hipotética THG permitiria que esses mecanismos não se limitassem aos táxons de origem. Esses genomas “hospedeiros” do gene exógeno poderiam utilizar esse produto gênico ao sofrerem uma pressão seletiva similar ao táxon de origem, mas também podem apresentar uma funcionalidade diferente para o gene, especialmente considerando que o gene transportado está inserido em novo contexto genômico. No entanto, ainda é obscuro o entendimento sobre como os EGMs atuam na mobilidade dos genes, mas eles já são associados com resistência a antibióticos (PARTRIDGE *et al.*, 2018) e resistência à metais pesados (YANG *et al.*, 2020).

Mesmo que muitos genes de reparo de DNA tenham sido alinhados em genomas distantes, podemos observar que *Deinococcus radiodurans* apresentou um arsenal mais completo desses genes em relação aos outros extremófilos, uma indicação de que a elevada radiotolerância nesse organismo tenha relação com a ação conjunta dos genes. Não é pra menos que esse é o genoma com maior número de artigos publicados entre os selecionados, e que ele sobreviva a condições artificiais como superfícies de painéis fotovoltaicos. Diante do cenário atual de mudanças climáticas e modificações ambientais, bem como disseminação do uso de substâncias mutagênicas, o estudo mais aprofundado desses genes pode servir a biotecnologia na confecção de genomas menos suscetíveis a processos mutacionais.

Observamos também que alguns genes desempenham um papel em conjunto com outros genes, e que essa interação potencializa os mecanismos de resistência. No entanto, muitos desses genes apresentaram variações no percentual de identidade dos alinhamentos para os táxons, o que pode apontar baixa conservação da sequência e diferença de funcionalidade. Outro aspecto foi as variações na composição de genes relacionados entre os genomas, como observado para os genes de reparo de DNA *mutS/mutL*, que encontramos imediatamente vizinhos em alguns genomas, mas desassociados em outros genomas, ou mesmo com o gene *mutL* ausente. Segundo Haft (2015), a vizinhança não conservada é uma pista de variações funcionais em genes homólogos. Outro exemplo são os genes de canais mecanossensíveis *mscK* e *mscS123*, que possuem sua ação conjunta descrita, mas que nos resultados somente três táxons apresentaram alinhamento para os quatro genes simultaneamente. A composição de genes associados a um mecanismo de resistência reforça a ideia de que o contexto em que um gene está inserido pode afetar sua funcionalidade, não sendo o gene e seu produto agentes isolados. Portanto, a comparação da diversidade de genes entre bactérias não pode ser satisfeita unicamente ao se comparar a ocorrência de genes. Por outro lado, um contexto compartilhado pode ativar mecanismos a princípios secundários no genomas, como os genes de resistência *ectD* e *ectE* em *Acidiphilium sp*, que são funcionais em ambientes salinos, apesar desse grupo ser predominantemente acidófilo. *Acidiphilium sp* poderia portanto dispor desse recurso se a pressão seletiva for alterada.

Em alguns casos, os genes mostraram-se mais restritos a determinados táxons, como o *ddrD* de *D. radiodurans* e o gene *phaE* de *Rubrobacter xylanophilus*. Ao analisar esses mecanismos ficou claro que o maior entendimento sobre esses genes exige um estudo das

interações de todo o repertório de resistência dentro do genoma, que pode potencializar a capacidade de sobrevivência de um grupo. A pressão seletiva a que esses organismos extremófilos estão sujeitos é uma forte alavanca na aquisição de mecanismos adaptativos mais sofisticados por meio de seleção natural. Novos mecanismos capazes de interagir e potencializar processos adaptativos já consolidados seriam mais bem aceitos pelo crivo da evolução, como vemos no produto DdrD que atua no reparo do material genético especialmente em situações de escassez nutricional, um caso onde um único gene/proteína próprio de *D. radiodurans* adequa-se a não somente uma, mas duas condições extremófilas. Para *ddrD*, o aprimoramento de um único gene, e não propriamente a combinação de novos genes, levou a um mecanismo de “dupla resistência”.

Entre os genes mais amplamente compartilhados entre os táxons, temos os sinalizadores e receptores do sistema QS de biofilmes, que podem apontar caminhos para compreender o poliextremismo. Kaur (2019) destacou-se dos outros autores por já relacionar diferentes táxons extremófilos com genes de resistência à biofilmes, portanto limitamos nossa discussão sobre biofilmes à análise de literatura. Esse autor demonstrou que apesar da pluralidade de mecanismos sinalizadores de QS, muitos táxons extremófilos compartilham o mesmo sistema AI-1, enquanto que o sistema AI-2 foi restrito ao filo *Deinococcus-thermus* entre os extremófilos estudados, mas ainda assim sendo amplamente descrito em outras bactérias. Contudo, existiram variações entre sinalizadores para o mesmo sistema, ou a presença de particularidades desses sistemas em *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Geobacillus stearothermophilus cepa T-6*, o que nos permite pensar sobre quanto do sistema QS de fato é conservado e como essa dinâmica complexa pode se ajustar em diferentes cenários.

O entendimento sobre a diversidade de mecanismos de resistência em bactérias nos ajuda a compreender como esses organismos conseguem sobreviver em situações insalubres decorrente da ação humana. Utilizando-se de recursos genéticos preexistentes, bactérias extremófilas sobrevivem em painéis fotovoltaicos, rejeitos de mineração, câmaras frigoríficas, superfície de equipamentos que atingem superaquecimento, dentre outros cenários artificiais. Entender como esses mecanismos de resistência se distribuem entre as bactérias pode abrir caminhos para lidar com essas extremófilas que hoje estão cada vez mais próximas de nós, indo além de regiões inóspitas. Isso se torna ainda mais relevante ao pensarmos que bactérias extremófilas são pouco estudadas visto a dificuldade de coleta inerente aos ambientes em que

elas originalmente vivem. Acreditamos que futuras análises filogenéticas ajudariam a elucidar com mais clareza a história filogenética desses genes e como se deu a sua adaptação.

6 CONCLUSÃO

Descrevemos, parcialmente, a distribuição de genes em bactérias extremófilas e discutimos como esses genes colaboram com sua multirresistência. Esse trabalho justificou-se por levantar novas hipóteses e caminhos de trabalho para aprofundar nosso conhecimento sobre a história evolutiva desses organismos tão pouco estudados, mas com grande potencial a se desbravar. A análise dos alinhamentos realizados no BLAST para os produtos gênicos requer muita cautela, e portanto só nos permite fazer suposições modestas e indicar caminhos para novas análises. Observamos uma diversidade de genes, que superaram em número nossa capacidade de análise, mas que já apontam pontos interessantes para a discussão. A literatura descreve a multirresistência em muitos táxons extremófilos, assim como em genes que podem atuar de forma conjunta, aumentando o potencial de resistência de uma espécie. Consequentemente, o repertório de genes de resistência mostrou-se mais promissor quando esses genes ocorreram simultaneamente no genoma, o que vimos não acontecer em alguns casos. No entanto, apesar de apontarmos similaridades entre as sequências, a conservação da funcionalidade requer estudos filogenéticos mais aprofundados para cada gene, e análise do contexto seletivo. Acreditamos que uma possível etapa futura seja concluir os alinhamentos para todos os genes localizados, bem como investigar evidências de THG para os casos em que essa hipótese possa ser levantada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K.; NOMURA, N.; & SUZUKI, S. Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. **FEMS Microbiol Ecol.** v. 96(5):f1aa031, 28 fev. 2020. DOI:10.1093/femsec/f1aa031 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7189800/>> Acesso em: 15 set. 2022.
- ARGANDOÑA, M. et al. New insights into hydroxyectoine synthesis and its transcriptional regulation in the broad-salt growing halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. **Microb Biotechnol.** v. 14(4), p. 1472-1493. DOI:10.1111/1751-7915.13799. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33955667/>> Acesso em: 15 set. 2022.
- AVERHOFF, B. *et al.* Natural transformation in Gram-negative bacteria thriving in extreme environments: from genes and genomes to proteins, structures and regulation. **Extremophiles.** v. 25(5-6), p. 425-436, 20 set. 2021. DOI:10.1007/s00792-021-01242-z. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8578077/>> Acesso em: 15 set 2022.
- BANASIK, M. et al. In vitro affinity of *Deinococcus radiodurans* MutS towards mismatched DNA exceeds that of its orthologues from *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus*. **J Biotechnol.** v. 252, p. 55-64, 20 jun. 2017. DOI:10.1016/j.jbiotec.2017.05.010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28506931/>> Acesso em: 15 set. 2022.
- BERTELLI, C. *et al.* 2017. IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. **Nucleic Acids Research.** 2 mai. 2017. DOI: 10.1093/nar/gkx343. Disponível em: <<https://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/>> Acesso em 15 set. 2022.
- CARVALHO, G. *et al.* Bacterial Transformation Buffers Environmental Fluctuations through the Reversible Integration of Mobile Genetic Elements. **mBio**, v. 11(2):e02443-19, 3 Mar. 2020. DOI:10.1128/mBio.02443-19. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7064763/>> Acesso em: 15 set. 2022.
- COSBY, R. L.; CHANG, N.; FESCHOTTE, C. Host-transposon interactions: conflict, cooperation, and cooption. **Genes & development**, v. 33(17-18), p. 1098-1116, 1 set. 2019. DOI:10.1101/gad.327312.119. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31481535/>> Acesso em: 15 set. 2022.
- DAI, S. *et al.* Dynamic Polyphosphate Metabolism Coordinating with Manganese Ions Defends against Oxidative Stress in the Extreme Bacterium *Deinococcus radiodurans*. **Appl Environ Microbiol.** v. 87(7):e02785-20, 11 mar. 2021. DOI:10.1128/AEM.02785-20. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33452031/>> Acesso em: 15 set. 2022.
- DANCE A. Studying life at the extremes. **Nature**, v. 587(7832), p. 165 - 166, nov. 2020. DOI: 10.1038/d41586-020-03055-0. PMID: 33139946. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/d41586-020-03055-0>> Acesso em: 15 set. 2022.
- DE LA TOUR, C. B. *et al.* Characterization of the DdrD protein from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. **Extremophiles.** v. 25(4), p. 343-355, 25

jul. 2021. DOI:10.1007/s00792-021-01233-0. Disponível em:
<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34052926/>> Acesso em: 15 set. 2022.

DELAVAT, F. *et al.* The hidden life of integrative and conjugative elements. **FEMS Microbiol Rev.** v. 41(4), p. 512-537, 25 Mar. 2017. DOI:10.1093/femsre/fux008 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5812530/>> Acesso em: 15 set. 2022.

DI LORENZO, *et al.* The Structure of the Lipid A of Gram-Negative Cold-Adapted Bacteria Isolated from Antarctic Environments. **Mar Drugs.** v. 18(12):592, 26 nov. 2020. DOI:10.3390/md18120592. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33255932/>> Acesso em: 15 set. 2022.

EMBRANDIRI, A. *et al.* Environmental Xenobiotics and Its Effects on Natural Ecosystem. Springer Nature Singapore. **Plant Responses to Xenobiotics**, 1. ed. p. 1-18, 2016. DOI:10.1007/978-981-10-2860-1_1 Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/311978744_Environmental_Xenobiotics_and_Its_Effects_on_Natural_Ecosystem> Acesso em: 30 nov. 2021.

FENG, S. *et al.* The adaptation mechanisms of *Acidithiobacillus caldus* CCTCC M 2018054 to extreme acid stress: Bioleaching performance, physiology, and transcriptomics. **Environ Res.** v. 199:111341, ago. 2021. DOI:10.1016/j.envres.2021.111341. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34015291/>> Acesso em: 15 set. 2022.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Título original: Evolutionary biology. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética 2009

GALLO, G. *et al.* A Hyperthermoactive-Cas9 Editing Tool Reveals the Role of a Unique Arsenite Methyltransferase in the Arsenic Resistance System of *Thermus thermophilus* HB27. **mBio.** v. 12(6):e0281321, 7 dez. 2021. DOI:10.1128/mBio.02813-21. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34872358/>> Acesso em 15 set. 2022.

GALVEZ, G. *et al.* Co-occurrence Interaction Networks of Extremophile Species Living in a Copper Mining Tailing. **Front Microbiol**, v. 12:791127, 5 jan. 2022. DOI:10.3389/fmicb.2021.791127. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8773694/>> Acesso em 15 set. 2022.

GILLINGS, M. R. *et al.* Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. **ISME J.** v. 9(6), p. 1269-1279, 12 dez. 2014. DOI:10.1038/ismej.2014.226 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4438328/>> Acesso em: 15 set. 2022.

HAFT, D. H. Using comparative genomics to drive new discoveries in microbiology. **Curr Opin Microbiol.** v. 23, p. 189-196, 21 jan. 2015. DOI:10.1016/j.mib.2014.11.017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4325363/>> Acesso em: 15 set. 2022.

HELALAT, S. H. *et al.* Metabolic engineering of *Deinococcus radiodurans* for pinene production from glycerol. **Microb Cell Fact.** v. 20(1):187, 26 set. 2021. DOI:10.1186/s12934-021-01674-4. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34565367/>> Acesso em: 15 set. 2022.

HOU, S. et al. Molecular Insights into the Copper-Sensitive Operon Repressor in *Acidithiobacillus caldus*. **Appl Environ Microbiol.** v. 87(16):e0066021, 27 jul. 2021. DOI:10.1128/AEM.00660-21. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34085855/>> Acesso em: 15 set. 2022.

HUBENY, J. et al. Industrialization as a source of heavy metals and antibiotics which can enhance the antibiotic resistance in wastewater, sewage sludge and river water. **PLoS One.** v. 16(6):e0252691, 4 jul. 2021. DOI:10.1371/journal.pone.0252691. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34086804/>> Acesso em: 15 set. 2022.

JIN, M. *et al.* Properties and Applications of Extremozymes from Deep-Sea Extremophilic Microorganisms: A Mini Review. **Mar Drugs.** v. 17(12):656, 21 nov. 2019 DOI:10.3390/md17120656 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6950199/>> Acesso em: 15 set. 2022.

JIN, D. *et al.* A novel approach for treating acid mine drainage through forming schwertmannite driven by a mixed culture of *Acidiphilium multivorum* and *Acidithiobacillus ferrooxidans* prior to lime neutralization. **J Hazard Mater.** v. 400:123108, 10 jun. 2020. DOI:10.1016/j.jhazmat.2020.123108. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32593016/>> Acesso em: 15 set. 2022.

KAUR, A.; CAPALASH, N.; SHARMA, P. Communication mechanisms in extremophiles: Exploring their existence and industrial applications. **Microbiol Res.** v. 221, p. 15-27, abr. 2019. DOI:10.1016/j.micres.2019.01.003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501318311376?via%3Dihub>> Acesso em: 15 set. 2022.

KOUŘILOVÁ, X. *et al.* The First Insight into Polyhydroxyalkanoates Accumulation in Multi-Extremophilic *Rubrobacter xylanophilus* and *Rubrobacter spartanus*. **Microorganisms.** v. 9(5):909, 24 abr. 2021. DOI:10.3390/microorganisms9050909. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33923216/>> Acesso em: 15 set. 2022.

LEE, J. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas antarctica* PAMC 27494, a bacteriocin-producing psychrophile isolated from Antarctica. **J Biotechnol.** v. 259, p. 15-18, 10 out. 2017. DOI:10.1016/j.jbiotec.2017.08.013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28818601/>> Acesso em: 15 set. 2022.

LI, L. *et al.* Insights into the Metabolism and Evolution of the Genus *Acidiphilium*, a Typical Acidophile in Acid Mine Drainage. **mSystems.** v. 5(6):e00867-20, 17 nov. 2020. doi:10.1128/mSystems.00867-20. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33203689/>> Acesso em: 15 set. 2022.

LI, X. *et al.* Integration of transcriptomic and proteomic analyses of cold shock response in *Kosmotoga olearia*, a typical thermophile with an incredible minimum growth temperature at 20 °C. **Braz J Microbiol.** v. 53(1), p. 71-88, 7 jan. 2022. DOI:10.1007/s42770-021-00662-5. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34997565/>> Acesso em 20 set. 2022.

LIANG, Z.B. *et al.* RND efflux pump and its interrelationship with quorum sensing system. **Yi Chuan**. v. 38(10), p. 894-901, 20 ou. 2016. DOI:10.16288/j.ycz.16-139. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27806930/>> Acesso em: 17 set. 2022.

LIU, Y. *et al.* Genomic Insights of Cryobacterium Isolated From Ice Core Reveal Genome Dynamics for Adaptation in Glacier. **Front Microbiol**. v. 11:1530. 14 jul. 2020. DOI:10.3389/fmicb.2020.01530. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32765445/>> Acesso em: 15 jul. 2022.

LIU, Y. *et al.* Pleiotropic roles of late embryogenesis abundant proteins of *Deinococcus radiodurans* against oxidation and desiccation. **Comput Struct Biotechnol J**. v. 19, p. 3407-3415, 4 jun. 2021. DOI:10.1016/j.csbj.2021.05.051. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34188783/>> Acesso em: 15 set. 2022.

MALAGÓN-ROJAS, J. N.; BARRERA, E. L. P.; LAGOS, L. From environment to clinic: the role of pesticides in antimicrobial resistance. **Revista panamericana de salud publica**. Pan American journal of public health. v. 44:e44, 23 set. 2020. DOI:<https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.44>. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32973897/>> Acesso em 15 set. 2022.

MARGESIN, R.; COLLINS, T. ecology of the cryosphere (glacial and permafrost habitats): current knowledge. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 103(6), p. 2537-2549. 2019. DOI:10.1007/s00253-019-09631-3 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6443599/>> Acesso em: 15 set. 2022.

MATIOLI, S. R., FERNANDES, F. M. C (ed). *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: 2. ed. Sociedade Brasileira de Genética, 2012, 256 p.

MORITZ, K. D. *et al.* Amendt B, Witt EM, Galinski EA. The hydroxyectoine gene cluster of the non-halophilic acidophile *Acidiphilium cryptum*. **Extremophiles**. v. 19(1), p. 87-99, 21 ago. 2014. DOI:10.1007/s00792-014-0687-0. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25142158/>> Acesso em: 15 set. 2022.

MOURA, Juliane B. *et al.* táxons extremofílicos predominam em uma comunidade microbiana de painéis fotovoltaicos em uma região tropical. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 16, ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab105> Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article/368/16/fnab105/6350555>> Acesso em: 15 set. 2022.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 20 set. 2022.

NAVARRO, C. A.; BERNATH, D. V.; JEREZ, C. A. Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: importance for biomining and bioremediation. **Biological research**, v. 46, n. 4, p. 363–371, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000400008>. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24510139/>> Acesso em 15 set. 2022.

ORELLANA, R. *et al.* Living at the Frontiers of Life: Extremophiles in Chile and Their Potential for Bioremediation. **Frontiers in microbiology**, V. 9, n. 2309, 30 out. 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02309>. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6218600/>> Acesso em: 15 set. 2022.

PATEL, M. R.; EMERMAN, M.; MALIK, H. S. Paleovirology - ghosts and gifts of viruses past. **Current opinion in virology**, v. 1(4), p. 304–309. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.007> Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3190193/>> Acesso em: 15 set. 2022.

PARTRIDGE, S. R. *et al.* Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. **Clin Microbiol Rev.** v: 31(4):e00088-17, 1 ago. 2018. DOI:10.1128/CMR.00088-17 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6148190/>> Acesso em: 15 set. 2022.

PUOPOLO, R. *et al.* Identification of a New Heavy-Metal-Resistant Strain of *Geobacillus stearothermophilus* Isolated from a Hydrothermally Active Volcanic Area in Southern Italy. **Int J Environ Res Public Health.** v. 17(8):2678, 14 abr. 2020. DOI:10.3390/ijerph17082678. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32295125/>> Acesso em: 15 set. 2022.

RANGASAMY, K. *et al.* Cloning and Expression of the Organophosphate Pesticide-Degrading α - β Hydrolase Gene in Plasmid pMK-07 to Confer Cross-Resistance to Antibiotics. **BioMed research international**, v. 2018, 1535209. 16 mai. 2018. DOI:10.1155/2018/1535209. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29862253/>> Acesso em: 15 set. 2022.

SADLER M.; MORMILE, M. R.; FRANK, R.. Characterization of the IS200/IS605 Insertion Sequence Family in *Halanaerobium Hydrogeniformans*. **Genes (Basel)**. v. 11(5):484, 29 abr. 2020. DOI:10.3390/genes11050484. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7290912/>> Acesso em 15 set. 2022.

SIGUIER, P.; GOURBEYRE, E.; CHANDLER, M. insertion sequences: their genomic impact and diversity. **FEMS Microbiol Rev.** v. 38(5), p. 865-891, 26 fev. 2014. DOI:10.1111/1574-6976.12067 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7190074/>> Acesso em: 15 set. 2022.

SKIPPER, K. A. *et al.* DNA transposon-based gene vehicles - scenes from an evolutionary drive. **Journal of biomedical science.** v. 20(1):92, 9 dez. 2013. DOI:10.1186/1423-0127-20-92. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3878927/>> Acesso em: 15 set. 2022.

ULLRICH, S.R. *et al.* Permanent draft genome sequence of *Acidiphilium* sp. JA12-A1. **Stand Genomic Sci.** v. 10:56, 19 ago. 2015. DOI:10.1186/s40793-015-0040-y. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26380040/>> Acesso em: 15 set. 2022.

URBIETA, M. S. *et al.* Copahue Geothermal System: A Volcanic Environment with Rich Extreme Prokaryotic Biodiversity. **Microorganisms.** v. 3(3), p. 344-363. 8 jul. 2015. DOI:10.3390/microorganisms3030344. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5023244/>> Acesso em: 15 set. 2022.

URUÉN, C. *et al.* Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. **Antibiotics (Basel)**. v. 10(1):3, 23 dez. 2020. DOI:10.3390/antibiotics10010003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7822488/>> Acesso em 17 set. 2022.

VANDRICH, J. *et al.* Contribution of mechanosensitive channels to osmoadaptation and ectoine excretion in *Halomonas elongata*. **Extremophiles**. v. 24(3), p. 421-432, Mai. 2020. DOI:10.1007/s00792-020-01168-y. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32266565/>> Acesso em: 15 set. 2022.

VANDRICH, J. *et al.* Contribution of mechanosensitive channels to osmoadaptation and ectoine excretion in *Halomonas elongata*. **Extremophiles**. v. 24(3). p. 421-432. DOI:10.1007/s00792-020-01168-y. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7174268/>> Acesso em: 15 set. 2022.

VERLI, H. (Org.). **Bioinformática: Da Biologia à Flexibilidade Molecular**. São Paulo: 1 ed. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2014, 282 p.

WHITELEY, M.; DIGGLE, S. P.; GREENBERG, E. P. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research [published correction appears in Nature. 2018 Feb 28;555(7694):126]. **Nature**. v. 551(7680), p. 313-320, 15 nov. 2017. DOI:10.1038/nature24624. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5870893/>> Acesso em: 15 set. 2022.

YANG, H. *et al.* Antibiotic and Metal Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Pig Slaughterhouses in the United Kingdom. **Antibiotics (Basel)**. v. 9(11):746, 28 out. 2020. DOI:10.3390/antibiotics9110746. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7692696/>> Acesso em: 15 set. 2022.

YIN, W., *et al.* J Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. **Int J Mol Sci**, v. 20(14):3423, 12 de jul. 2019. DOI: 10.3390/ijms20143423. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6679078/>> Acesso em: 10 set. 2022.

ZGONIK, V. *et al.* Extremophilic Microorganisms in Central Europe. **Microorganisms**. v. 9(11):2326. 10 nov. 2021. DOI:10.3390/microorganisms9112326. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8620676/>> Acesso em: 10 set 2022.

ZHANG, M. *et al.* Co-selection and stability of bacterial antibiotic resistance by arsenic pollution accidents in source water. **Environ Int**. v. 135:10535, 30 nov. 2019. DOI:10.1016/j.envint.2019.105351. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31794937/>> Acesso em: 15 set. 2022.

**APÊNDICE A - PLANILHA DE GENES DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS
EXTREMÓFILAS**

Proteínas ou genes		Mecanismo de resistência a condição extrema	Bactéria extremófila associada na literatura
1	OxyR (NCBI ref. seq: WP_010887260.1)	Proteínas ligadas a resposta ao estresse por danos no DNA (MOURA et al., 2021)	<i>Deinococcus spp.</i>
2	RecA (NCBI ref. seq: WP_227086034.1)		
3	UvrA (NCBI ref. seq: WP_010888406.1)		
4	UvrB (NCBI ref. seq: WP_017870876.1)		
5	GyrA (NCBI ref. seq: WP_010888548.1)		
6	GyrB (NCBI ref. seq: WP_010887551.1)		
7	DdrD (NCBI ref. seq: WP_010886971.1)	Proteína de Reconstituição do DNA após radiação (DE LA TOUR et al., 2021)	<i>Deinococcus radiodurans</i>
8	PPK (NCBI ref. seq: WP_027479817.1)	Proteínas de resistência ao estresse oxidativo e radiação (DAI et al., 2021)	
9	PPX (NCBI ref. seq: WP_010889445.1)		
10	Proteínas Abundantes em Embriogênese Tardia - LEAs (NCBI ref. seq: WP_010888013.1)	Proteínas que atuam na estabilização de enzimas (LIU et al., 2021)	
11	MutS (NCBI ref. seq: WP_028328011.1)	Proteína de reparo de ligação de incompatibilidade no DNA (BANASIK et al., 2017)	<i>Thermus thermophilus</i> ; <i>Thermus aquaticus</i> ; <i>Deinococcus radiodurans</i>
12	DnaK (NCBI ref. seq: NP_414555.1)	Proteínas chaperonas de adequação da conformação das proteínas em alta temperatura (ORELLANA et al., 2018)	<i>Thermus spp.</i>
13	GroEL (NCBI ref. seq: YP_500736.1)		
14	GroES (NCBI ref. seq: WP_011174076.1)		
15	CadC (GenBank: KZE97918.1)	Proteínas de resistência ao cádmio (PUOPOLO et al., 2020)	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
16	CadA (GenBank: QOR84785.1)		
17	ArsR (Ref. seq: WP_095860037.1)	Proteínas de resistência ao Arsênio (PUOPOLO et al., 2020)	
18	ArsB (Ref. seq: WP_095860271.1)		
19	ArsC (Ref. seq: WP_044745043.1)		
20	EctD (NCBI ref. seq: WP_035414491.1)	Enzimas de produção de 5-hidroxiectoína, ligada a halotolerância e termotolerância (ARGANDOÑA et al., 2021)	<i>Chromohalobacter salexigens</i> ; <i>Halomonas elongata</i> ; <i>Acidiphilium spp.</i>
21	EctE (NCBI ref. seq: WP_043558653.1)		
22	MscK (NCBI ref. seq: WP_013331801.1)	Ligadas a canais mecanossensíveis de osmorregulação (VANDRICH et	<i>Halomonas elongata</i>
23	MscS1 (NCBI ref. seq: WP_112049925.1)		

24	MscS2 (NCBI ref. seq. WP_013334002.1)	<i>al.</i> , 2020)	
25	Msc3 (NCBI ref. seq. WP_013332927.1)		
26	PhaC Classe I (NCBI ref seq. WP_143527770.1)	Relacionados a polihidroxicanoatos (PHA), que aumenta robustez e resistência a diversos fatores estressores (KOURILOVÁ et al., 2021)	<i>Rubrobacter spp.</i>
27	PhaC Classe III (NCBI ref seq. WP_011565326.1)		
28	PhaE (NCBI ref. seq. WP_011565325.1)		
29	<i>kdpB</i> (Gene ID: 69613519)	Proteína de resistência acidófila ao regular fluxo de prótons (FENG et al., 2021)	<i>Acidithiobacillus caldus</i>
30	<i>sor</i> (Gene ID: 69614024)	Genes de fornecimento energético em resposta ao estresse em meio ácido (FENG et al., 2021)	<i>Acidithiobacillus caldus</i>
31	<i>sqr</i> (Gene ID: 7135954)		<i>Acidithiobacillus caldus</i> ; <i>Acidiphilium spp.</i>
32	<i>sox</i> (Gene ID: 65278394)		
33	<i>psrA</i> (Gene ID: 10321129)	Genes de utilização compostos com enxofre (LI et al., 2020)	<i>Acidiphilium spp.</i>
34	<i>psrB</i> (Gene ID: 10321130)		
35	<i>psrC</i> (Gene ID: 10318209)		
36	<i>czcA</i> (Gene ID: 880332)	Genes ligados à resistência ao estresse osmótico e estresse por metais pesados (LI et al., 2020)	<i>Acidiphilium spp.</i>
37	<i>czcB</i> (Gene ID: 880333)		
38	<i>czcC</i> (Gene ID: 882894)		
39	<i>cop</i>		
40	LuxI - Enzima autoindutora	Molécula sinalizadora no sistema Quorum Sensing Autoinducer-1(AI-1) (KAUR et al., 2019)	<i>Halomonas spp.</i> <i>Acidithiobacillus sp.</i> ; <i>Deinococcus radiodurans</i> ; <i>Pseudomonas spp.</i>
41	LuxR - Molécula Receptora	Molécula receptora no sistema Quorum Sensing Autoinducer-1(AI-1) (KAUR et al., 2019)	<i>Halomonas spp.</i> , <i>Acidithiobacillus sp.</i> ; <i>Deinococcus radiodurans</i> ; <i>Pseudomonas spp.</i>
42	LuxS - Enzima autoindutora	Molécula sinalizadora no sistema Quorum sensing autoinducer-2 (AI-2) (KAUR et al., 2019)	<i>Thermus thermophilus</i> ; <i>Deinococcus radiodurans</i>
43	<i>pel</i> (Gene ID: 69614721)	O gene <i>pel</i> seria regulado positivamente pelo AHL, gerando os exopolissacarídeos PEL do biofilme (DÍAZ et al., 2021)	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
44	Xyn10A (Gene ID: ABI_49951.1)	Ligado ao sistema Quorum sensing (KAUR et al., 2019)	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>