



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDO DAS RELAÇÕES ENTRE FATORES AMBIENTAIS E DIVERSIDADE
TAXONÔMICA E FUNCIONAL DAS COMUNIDADES MICROBIANAS EM AQUÍFEROS
ATRAVÉS DA METAGENÔMICA**

FELIPE ALEXANDRE SANTANA BARBOSA

Salvador, Bahia
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDO DAS RELAÇÕES ENTRE FATORES AMBIENTAIS E DIVERSIDADE
TAXONÔMICA E FUNCIONAL DAS COMUNIDADES MICROBIANAS EM AQUÍFEROS
ATRAVÉS DA METAGENÔMICA**

Por

FELIPE ALEXANDRE SANTANA BARBOSA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biologia da
Universidade Federal Bahia como exigência
para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Pedro Milet Meirelles

Salvador, Bahia
2022

Data da defesa: 01 de julho de 2022

Banca Examinadora

Profa. Dra. Paula Carvalhal Lage von Buettner Ristow
Instituto de Biologia - Universidade Federal da Bahia

Msc. Lucas de Queiroz Salles
Instituto de Geociências - Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Pedro Milet Meirelles
Instituto de Biologia - Universidade Federal da Bahia

RESUMO

Aquíferos podem ser considerados como um meio subterrâneo que armazena e transmite água através dos poros e fraturas que existem em rochas e grãos dos solos. Eles possuem uma grande importância social e econômica, por serem responsáveis pelo fornecimento de 30% da água doce para consumo humano em todo o mundo, incluindo o uso agrícola e industrial. Além disso, os aquíferos também possuem importâncias ecológicas, pois funcionam como reservatórios de rios perenes e como fonte de água para vegetações em regiões secas. Os aquíferos podem variar conforme o tipo de solo ou rocha onde a água está armazenada, assim como em relação ao uso e condição do solo. Essas variações proporcionam a ocorrência de diversos tipos de aquíferos, que apesar de possuírem características em comum, como ausência de luz, baixa disponibilidade de matéria orgânica e oxigênio, podem apresentar características físico-químicas bastante distintas. Apesar de sua importância, o conhecimento sobre as relações entre as características físico-químicas dos aquíferos e as comunidades microbianas que os habitam ainda é restrito para alguns tipos de aquíferos. Com o avanço da metagenômica, estudos da comunidade de microrganismos em aquíferos têm sido frequentes. Recentemente, foi demonstrado diferenças na composição das comunidades microbianas causadas por pequenas variações locais dentro de um mesmo aquífero. Apesar disso, pouco se sabe sobre as diferenças da comunidade microbiana entre os diferentes tipos de aquíferos. Compreender a estrutura das comunidades microbianas de diferentes tipos de aquíferos pode fornecer informações sobre as funções ecológicas desempenhadas pelos microrganismos e ajudar a reconhecer grupos microbianos que podem funcionar como marcadores de alerta precoce para mudanças ambientais ou contaminação. Neste trabalho, investigamos através da análise de conjuntos de dados metagenômicos publicamente disponíveis, se a diversidade e a composição (taxonômica e funcional) das comunidades microbianas são diferentes entre uma ampla variedade de tipos de aquíferos em todo o mundo. Encontramos resultados que mostram que a composição, diversidade e riqueza das comunidades são diferentes entre os tipos de aquíferos. Detectamos também que grupos taxonômicos previamente descritos como dominantes em ecossistemas de solo também são dominantes em aquíferos, e funções relacionadas à parede celular e permeabilidade da membrana externa são responsáveis pelas diferenças entre as comunidades. O presente estudo traz uma visão abrangente das diferenças na estrutura e composição da comunidade

microbiana dos diferentes tipos de aquíferos ao redor do mundo, além dos grupos e funções responsáveis por essas diferenças.

ABSTRACT

Aquifers are the parcels of water that remain or circulate through the pores and fractures in rocks and soil grains. They are of great social and economic importance, as they are responsible for providing 30% of fresh water for human consumption worldwide, including agricultural and industrial use. In addition, aquifers also have ecological importance, as they function as reservoirs for perennial rivers and as a source of water for vegetation in dry regions. Aquifers can vary depending on the type of soil or rock where the water is located, as well as the use and condition of the soil. These variations provide the occurrence of different types of aquifers, which despite having characteristics in common, such as the absence of light, and low availability of organic matter, and oxygen, can present quite different physicochemical characteristics. Despite its importance, knowledge about the relationships between the physicochemical characteristics of aquifers and the microbial communities that inhabit them is still restricted to some types of aquifers. With the advance in metagenomics, studies of the community of microorganisms in aquifers have been frequent. Recently, differences in the composition of microbial communities caused by small local variations within the same aquifer have been demonstrated. Despite this, little is known about the differences in the microbial community between different types of aquifers. Understanding the structure of microbial communities in different types of aquifers can provide information about the ecological functions performed by microorganisms and help to recognize microbial groups that can act as early warning markers for environmental changes or contamination. In this work, we investigate, through analysis of publicly available metagenomic datasets, whether the diversity and composition of microbial communities (both taxonomic and functional) are different across a wide variety of aquifer types worldwide. We found results that show that the composition, diversity, and richness of communities are different between aquifer types. We also detected that taxonomic groups previously described as dominant in soil ecosystems are also dominant in aquifers, and functions related to the cell walls and permeability of the outer membrane are responsible for the differences between communities. The present study provides a comprehensive view of the differences in the structure and composition of the microbial community of different types of aquifers around the world, as well as the groups and functions responsible for these differences.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal da Bahia, ao Instituto de Biologia, ao corpo docente, administrativo e funcionários, pelo empenho e dedicação ao funcionamento da Universidade.

Aos órgãos de financiamento e apoio institucional, Pró-Reitoria de Pesquisa, Criação e Inovação, FAPESB, PIBIC-UFBA. Os anos de Iniciação Científica foram divisores de água na minha carreira.

Ao Laboratório de Bioinformática e Ecologia Microbiana e a todos e todas que nele passaram e estão. Agradeço pelas experiências e pelos momentos de descontração: os cafezinhos, as pipocas e as boas risadas que demos juntos. À minha tutora durante a primeira Iniciação Científica, Amanda Campos, que foi muito importante para o meu amadurecimento científico, e que me auxiliou na concepção das perguntas deste trabalho. Aos coautores do artigo desse trabalho, Dr. Camilo Ferreira e Dr. Felipe Coutinho, que me auxiliaram na confecção, condução e também no amadurecimento do projeto, entendendo todo o seu potencial e também limitações.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Meirelles. Pela orientação, confiança, paciência, disposição, compartilhamento de conhecimentos, companheirismo e amizade. Sou muito grato por esses quatro anos de parceria e pelas oportunidades e reconhecimento que me deu.

Aos meus amigos da graduação e do ensino médio. Foi muito importante contar com vocês durante esse percurso.

Agradeço também a Gaia, mãe natureza, nossa Terra, por todos os seres vivos que já existiram, existem e existirão, e por eu existir no mesmo período em que a ciência possibilita estudá-la em detalhes, das escalas micro até as macroscópicas.

A Lorena, minha namorada, amiga, parceira da vida, que sempre esteve ao meu lado, sempre acompanhou toda a minha jornada, os altos e baixos, e nunca deixou de sonhar comigo. Com certeza toda essa fase foi muito melhor por que eu tinha você comigo.

A minha família. À minha mãe, Adriana Barboza, a meu pai, Robson Tertuliano. Vocês são os exemplos de pessoas quem eu almejo ser. Obrigado por apostarem todas as fichas em mim e além de confiar, incentivar meus sonhos grandes. A meu irmão, Pedro, pela amizade e companheirismo. A nossa união e força me incentiva a não desistir nunca. É muito importante saber que eu tenho um farol tão forte para me guiar, onde quer que eu vá, e também para ser o meu porto seguro.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

AGRADECIMENTOS

SUMÁRIO	(i)
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. OS AQUÍFEROS E SUAS COMUNIDADES MICROBIANAS	1
1.1.1. TIPOS DE AQUÍFEROS	2
1.2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DOS AQUÍFEROS	2
1.3. IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DOS AQUÍFEROS	3
1.4. TIPOS DE AQUÍFEROS E A RELAÇÃO COM A MICROBIOTA	4
2. OBJETIVOS	7
3. CAPÍTULO ÚNICO	8
4. CONCLUSÕES	24
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. OS AQUÍFEROS

Sabe-se que somente 3% de toda a água no planeta é água que pode ser utilizada para suprir nossas necessidades. Dessa fração, 69% está armazenado em calotas e geleiras polares, 1% formam os rios e lagos superficiais e 30% estão armazenados em aquíferos (Shiklomanov, 1998). Os aquíferos são resultado da interação entre as parcelas de água que permanecem ou circulam através dos poros e fraturas que existem em rochas e grãos dos solos, até descarregar em rios e lagos da superfície, ser interceptada por raízes de plantas, extraída por poços ou descarregar nos oceanos (Zhou et al., 2019).

Por estarem distribuídos ao redor do mundo e participarem do ciclo da água, os aquíferos podem apresentar diversas particularidades associadas a geologia do local, a temperatura, a profundidade em que a água flui, ao regime de chuvas ao qual está submetido, e a interferência antrópica. Assim, aquíferos apresentam características e comportamentos diferentes dependendo do local em que são encontrados.

Os aquíferos podem ser classificados com base em dois aspectos: porosidade das rochas que armazenam a água ou características hidráulicas. Através da vazão de água, podemos comparar a disponibilidade de água de aquíferos com diferentes porosidades. Por exemplo, no aquífero Bauru, localizado na região sudeste/centro-oeste, a produção potencial de poços varia de ≈ 10 a mais de $120 \text{ m}^3/\text{h}$ nos aquíferos de solo de rochas sedimentares e de cerca de 1 a $100 \text{ m}^3/\text{h}$ nos aquíferos localizados em rochas ígneas e metamórficas fraturadas (Soldera, 2017). Outro exemplo, dessa vez na Bahia, onde predomina o uso de aquíferos em regiões interioranas e distantes de corpos d'água, os aquíferos cársticos - uma variação dos aquíferos que ocorrem em rochas calcárias e que apresentam composição mais solúvel em água - tem a média da vazão em poços estimada em $9,12 \text{ m}^3/\text{h}$ (Oliveira et al., 2007). Essas características (vazão, porosidade e solubilidade das rochas) podem interferir direta e indiretamente na quantidade, qualidade e possibilidade de consumo da água disponível nesses ambientes.

1.1.1 TIPOS DE AQUÍFEROS

Com base nas características de porosidade, manejo e composição do solo, que influenciam em diversos fatores dos aquíferos, podemos classificar os aquíferos em diferentes categorias:

Aquíferos porosos: são águas subterrâneas localizadas entre os poros do espaço rochoso. Eles são os mais suscetíveis a contaminação por conta da facilidade do transporte das bactérias e elementos do solo para a água subterrânea (Earle, 2019).

Gêiser: quando a água subterrânea é estocada em altas profundidades, e através da pressão de um gás, irrompe, criando um buraco no solo (Alan Glennon, 2005).

Minas: Os aquíferos de minas ocorrem em rochas porosas ou fissuradas, com vários tipos de minerais associados, e são encontrados durante a mineração em minas a céu aberto (Kumar Soni, 2019).

Subsuperfície salina: aquíferos de subsuperfície salina são aquíferos localizados em zonas costeiras, e a água subterrânea é suscetível à intrusão de água salina (Barlow and Reichard, 2010).

Cárstico-Porosos: aquíferos cárstico-porosos estão em rochas cársticas, que também possuem rochas porosas em seu entorno (Fryar, 2021).

1.2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DOS AQUÍFEROS

Os aquíferos são responsáveis por abastecer rios e lagos perenes durante períodos de estiagem. Diversas populações sempre utilizaram as águas provenientes dos aquíferos para as atividades necessárias à humanidade, e esse recurso por vezes aparece como alvo de disputas políticas e econômicas. Eles são explorados para atividades econômicas como irrigação de áreas agrícolas, consumo humano, e possibilitam a sustentação das matas auxiliares (Ahmad et al., 2002; Le Maitre et al., 1999). Diversos fatores tornam a exploração dos aquíferos mais vantajosa para a população: I) baixo custo para construção de poços

de captação em relação a obras para captação de água superficial como diques e represas; II) menor custo para o tratamento e adequação da água ao consumo humano; e III) praticidade no abastecimento de pequenas cidades ou comunidades rurais distantes de grandes corpos d'água superficiais. A disponibilidade da água presente nos aquíferos afeta diretamente a qualidade de vida das pessoas. A irrigação das plantações, proporcionada pelo bombeamento de águas subterrâneas, oferece uma maior segurança alimentar da população em países com escassez hídrica (Qureshi, 2015).

1.3. IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DOS AQUÍFEROS

Além de sustentar diversos ecossistemas em períodos de seca, os aquíferos também participam do ciclo da água, e conseqüentemente possuem influência no clima e na precipitação das regiões onde estão localizados (Cuthbert et al., 2019). Outro papel importante dos aquíferos, relacionado ao ciclo do carbono, está ligado aos microrganismos. Em aquíferos, os microrganismos podem realizar a fixação de carbono na água a partir de vias quimiolitotróficas, aumentando a concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) (Taubert et al., 2022). Mudanças nas taxas de precipitação e temperaturas podem estimular a comunidade microbiana e aumentar o COD na água. Em condições naturais, o COD produzido pelas bactérias é transportado na água e utilizado pela própria comunidade microbiana na realização de outros metabolismos importantes, como a fixação e transformação de nitrogênio no solo.

Outras características como a contaminação do solo em regiões mais próximas das áreas de recarga, a evaporação, e a atividade de microrganismos presentes na água e/ou associados a rochas através de biofilmes, podem influenciar a quantidade de nutrientes, minerais, e matéria orgânica solúvel na água (Flemming and Wuertz, 2019; Li et al., 2021; Rose et al., 2005)..

Em ambientes fertilizados artificialmente, pode ocorrer um acúmulo de nitrato, o que não ocorre em ecossistemas naturais. O nitrato é facilmente solúvel em água, e seu excesso no solo pode causar contaminação de aquíferos, podendo causar problemas de

saúde em humanos que consomem água desses locais (Parvizishad et al., 2017). Naturalmente, as bactérias que realizam a desnitrificação e a redução dissimilatória do nitrato o removem do solo e devolvem à atmosfera, evitando o acúmulo dessa substância no solo e conseqüentemente a contaminação da água. A contaminação dos aquíferos por nitrato também favorece a contaminação da água por urânio (Riedel and Kübeck, 2018). A mobilização do urânio do solo para a água ocorre a partir da redução bacteriana do nitrato. A presença de urânio pode ocorrer naturalmente no solo, ou a partir da contaminação do mesmo através do despejo de rejeitos industriais e de mineração (Gavrilescu et al., 2009).

Apesar da ausência de luz, altas temperaturas e baixa disponibilidade de carbono orgânico, os aquíferos possuem comunidades microbianas diversas (Hershey et al., 2018). Essas comunidades, sustentadas pela atividade de quimiolitotróficos (Krumholz, 2000), desempenham funções importantes para a manutenção de toda a comunidade presente, que pode ter impacto na qualidade de água (Geldreich, 1990). Além disso, esses microrganismos desenvolvem atividades e serviços ecossistêmicos de relevância global, como os ciclos do nitrogênio e carbono, e através da quimiotrofia, são capazes de assimilar o carbono na água. Por conta disso, a análise da diversidade dos microrganismos presentes em aquíferos, suas funções e o seu comportamento quando expostos a diferentes fatores ambientais se mostra importante, principalmente quando levamos em conta que esses ambientes contêm cerca de 40% da biomassa das bactérias e arqueias no mundo (Griebler and Lueders, 2009). O avanço das técnicas independentes de cultivo possibilitou estudos dessas comunidades microbianas de forma mais abrangente, por conta das vantagens que oferece em relação a detecção de grupos e suas funções *in situ*. Dentre essas técnicas, a extração e sequenciamento do material genético obtido diretamente da amostra coletada - a metagenômica - possui a grande vantagem de evitar vieses causados por técnicas de amplificação de marcadores filogenéticos (Su et al., 2012).

1.4. TIPOS DE AQUÍFEROS E A RELAÇÃO COM A MICROBIOTA

Sistemas naturais como os aquíferos podem ser utilizados como “experimentos” para testar como o ambiente influencia a microbiota (Zhou et al., 2014). As diferenças nas características físico-químicas dos diferentes tipos de aquíferos podem oferecer diferentes

ecossistemas para os microrganismos que os habitam. Por exemplo, durante períodos de cheias ou alagamentos, os aquíferos porosos podem ser invadidos por bactérias do solo, como *Aeromonas* e *Bacillus* (Knobloch et al., 2021). Eles também tendem a apresentar baixa concentração de elementos químicos (REIMANN et al., 1996). Isso se deve por conta do maior fluxo de água nesse tipo de aquífero, o que impossibilita a dissolução dos elementos na água.

Já nos aquíferos de gêiseres, a comunidade microbiana está fortemente ligada as fases de erupção do gêiser, e quanto mais ativo, menor a abundância dos microrganismos, o que afeta as funções ecológicas desempenhadas nesses aquíferos, como fixação de nitrogênio e carbono, e oxidação de enxofre. Nesses aquíferos, é comum a presença dos grupos *Gallionellaceae*, *Sulfurimonas* e *Ca. "Altiarchaeum"* (Probst et al., 2018).

Em aquíferos em minas, as temperaturas elevadas desempenham um papel importante na microbiota, com apenas termófilos moderados habitando esses ecossistemas profundos. A poluição da água por rejeitos de minas afeta a estrutura microbiana, e diminui a produtividade geral, biomassa e biodiversidade microbiana. Nesses aquíferos, a poluição promove o crescimento de grupos como *Acidobacteria* e *Alphaproteobacteria*, e também o decréscimo de funções relacionadas a decomposição e humificação da matéria orgânica e a reciclagem de nutrientes (Jackson et al., 2015). Populações elevadas de bactérias são limitadas a zonas de recarga e descarga do aquífero, onde oxigênio gasoso e água rica em oxigênio entram em contato com os rejeitos. As populações bacterianas são geralmente baixas no resto do aquífero (Benner et al., 2000).

Nos aquíferos de subsuperfície salina, apesar da alta pressão e alta concentração de sais, os microrganismos possuem alta presença e atuam como sequestradores de CO₂ que eventualmente seria liberado na atmosfera. Bactérias halofílicas fermentativas (*Halanaerobiaceae*, *Halobacteroidaceae*) e bactérias redutoras de sulfato (*Desulfovibrionaceae*, *Peptococcaceae*) são microrganismos dominantes nas comunidade microbiana desses aquíferos (Morozova et al., 2011).

Em um aquífero cárstico, as bactérias vivem presas a superfícies rochosas ou partículas de sedimentos (ou seja, origem autóctone). No entanto, a alta variabilidade de velocidades de fluxo em sistemas cársticos induz uma raspagem causada pela água, levando à ressuspensão de sedimentos autóctones e bactérias associadas (Pronk et al., 2009). Em aquíferos cársticos, bactérias heterotróficas influenciam as propriedades físico-química dos aquíferos através da carstificação inicial de rochas carbonáticas, gerando CO₂ (Gabrovšek et al., 2000). Além disso, os grupos de *Gammaproteobacteria* encontrados nesses aquíferos indicam que a quebra de hidrocarbonetos e a oxidação de enxofre pode impulsionar a energia da comunidade (Hershey et al., 2018).

Devido a sua grande importância, é necessário conhecer a composição da comunidade microbiana nesses aquíferos, e também a sua contribuição para os serviços ecossistêmicos que ocorrem nesses ambientes, de acordo com as características físico-químicas de cada local. Por serem ambientes complexos e únicos, com características exclusivas devido a sua especificidade, tempo de formação e condições de isolamento, os aquíferos selecionam grupos de forma única. Por isso, para entender como esses ecossistemas funcionam, além de analisar a estrutura taxonômica e identificar quais táxons estão presentes, também é necessário analisar a estrutura e a variação das funções desses microrganismos. Pequenas diferenças nas características físico-químicas de um único aquífero induzem a mudanças na composição da microbiota (Wu et al., 2016). Porém, uma abordagem que investigue a distribuição dos táxons e das funções da comunidade de microrganismos nesses diferentes tipos de aquíferos pode elucidar padrões macro ecológicos, que ajudam a responder como esses ambientes respondem as mudanças climáticas e outros impactos antrópicos (Mascarenhas et al., 2020).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar e comparar a estrutura e composição taxonômica e funcional das comunidades microbianas em diferentes tipos de aquíferos no mundo através da metagenômica.

Objetivos específicos

- Analisar a diversidade taxonômica e funcional dos metagenomas de aquíferos disponíveis em bancos de dados públicos.
- Relacionar a diversidade taxonômica com os fatores ambientais dos aquíferos.
- Relacionar a diversidade funcional com os fatores ambientais dos aquíferos.
- Analisar as diferenças da comunidade microbiana nos diferentes tipos de aquíferos.

Capítulo único

Artigo a ser submetido como "Short Communications" no periódico Microbial Ecology

Homepage: <https://www.springer.com/journal/248>

31 results suggest that community isolation and adaptation for the specificity required for survival in
32 each aquifer type are the main structuring force of aquifers microbial community, shaping not only
33 microbial diversity but also microbial functionality.

34 **Keywords:** groundwater; aquifer types; candidate phyla; rare microbiome.

35
36
37 Only 3% of the water on the planet is freshwater, and aquifers are the second largest source of
38 freshwater, having great social, ecological, and economic importance [1]. Aquifers can present
39 several particularities associated with the soil and location. Characteristics such as flow, porosity, and
40 solubility of rocks can, directly or indirectly, interfere with the quantity [2] and quality [3] of water
41 availability. These characteristics can be represented by the types of aquifers, given by this conjunct
42 of variables, such as karst or geyser aquifer. Additionally, other features such as soil contamination
43 and microorganisms' activity can influence the concentration of nutrients [4], minerals [5], and
44 soluble organic matter availability [6] in the water. The microorganisms dwelling in aquifers are
45 essential because these environments harbor about 40% of the Bacteria and Archaea biomass in the
46 world [7]. Microorganisms inhabiting aquifers are also important for water quality, as microbial
47 communities can add or remove harmful compounds from water. Understanding the diversity,
48 function, and possible effects of environmental factors on the microbial community can give us more
49 information about their interaction with each aquifer type and a better understanding of water quality.

50 Previous studies have shown that differences in water physical-chemical characteristics can cause
51 changes in the relative abundance of aquifer microbiota and their metabolism [6, 8]. However, these
52 studies were restricted to the same types of aquifers. Studying how the different types of aquifers
53 influence the microbial communities' presence and abundance on a global scale may elucidate
54 macroecological patterns, indicating abiotic factors that best explain how these communities may
55 suffer from local and global impacts, such as climate change [9]. In the present work, we investigated

56 the microbial communities' taxonomic and functional structure and diversity in different types of
57 aquifers worldwide using publicly available shotgun metagenomic datasets.

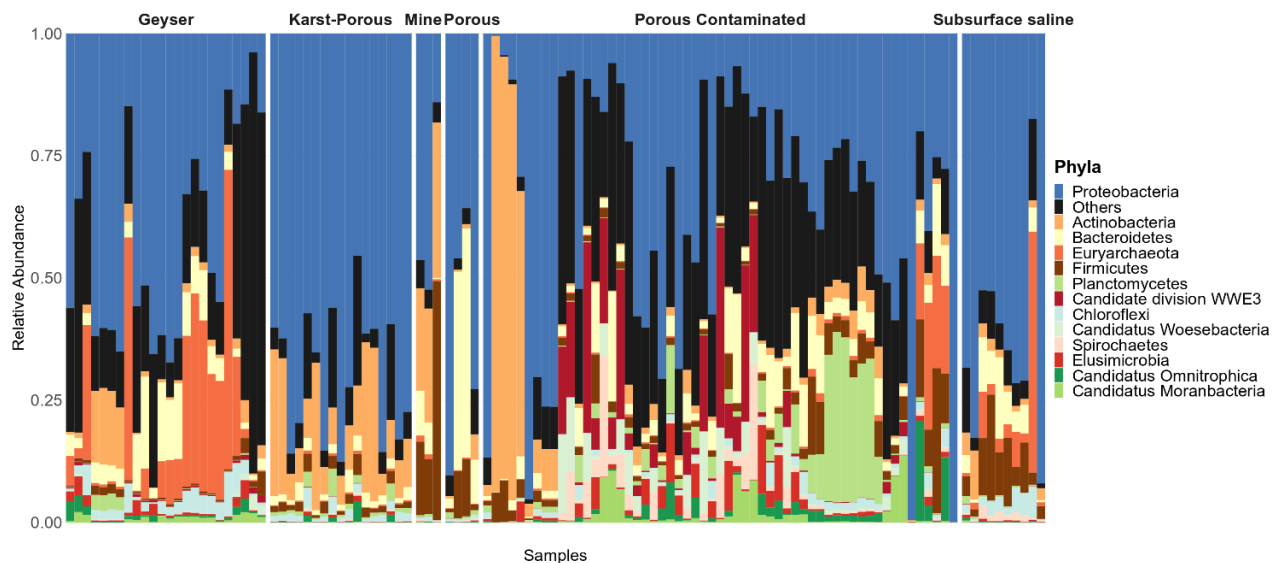
58 To assess the microbial community taxonomic and functional structure, we selected 115 publicly
59 available metagenomic samples from MG-RAST [10] and Sequence Read Archive (SRA) [11]
60 (Supplementary Fig 1 and Supplementary Table 1). To classify the samples in aquifer types, we used
61 information present in the metadata available in MG-RAST and SRA. This information includes
62 latitude, longitude, soil type (porous, karst-porous aquifers, presenting more silicate or carbonate in
63 water, respectively), soil use (mine aquifers, which can produce acid mine drainage), and
64 contamination condition (porous contaminated, subsurface saline aquifers, with different substances
65 and minerals polluting the water). We also included groundwater metagenomes from geysers,
66 characterized as CO₂-driven cold-water geysers.

67 We used the KRAKEN2 [12] for taxonomic annotation with a customized reference database that
68 includes all reference genomes from Bacteria and Archaea Domains and genomes from uncultivated
69 taxa recently described, as previously described in [13]. SUPERFOCUS was used [14] with
70 RAPsearch2 for functional annotation. The parameters of all bioinformatics analyses are described in
71 the supplementary material. All statistical analyses performed to test if the microbial taxonomic and
72 functional structure, richness, and diversity were different among the aquifer types and to evaluate
73 which taxonomic and functional features mainly contributed to dissimilarities observed are described
74 in supplementary material (Supplementary Material).

75 We found that the most abundant phyla in all aquifer types were Proteobacteria (mean of 45.24%,
76 with Betaproteobacteria: 18.64%, Gammaproteobacteria: 12.63 %, Alphaproteobacteria: 8.91 % and
77 Deltaproteobacteria: 8.86 %), Actinobacteria (7.59%), Bacteroidetes (5.7%), and Euryarchaeota
78 (4.74%) (Fig 1). We highlight that all phyla with mean relative abundance below 1% (rare biosphere)

79 were responsible for a significant fraction of the microbiome's composition (19.34%) (Fig 1). These
 80 four abundant phyla are dominant in soil ecosystems [14, 15]. Such similarity between aquifers and
 81 soil systems microbial relative abundance might directly result from aquifers' proximity with
 82 recharge location and water transport from the surface to the subsurface [15].

83



84

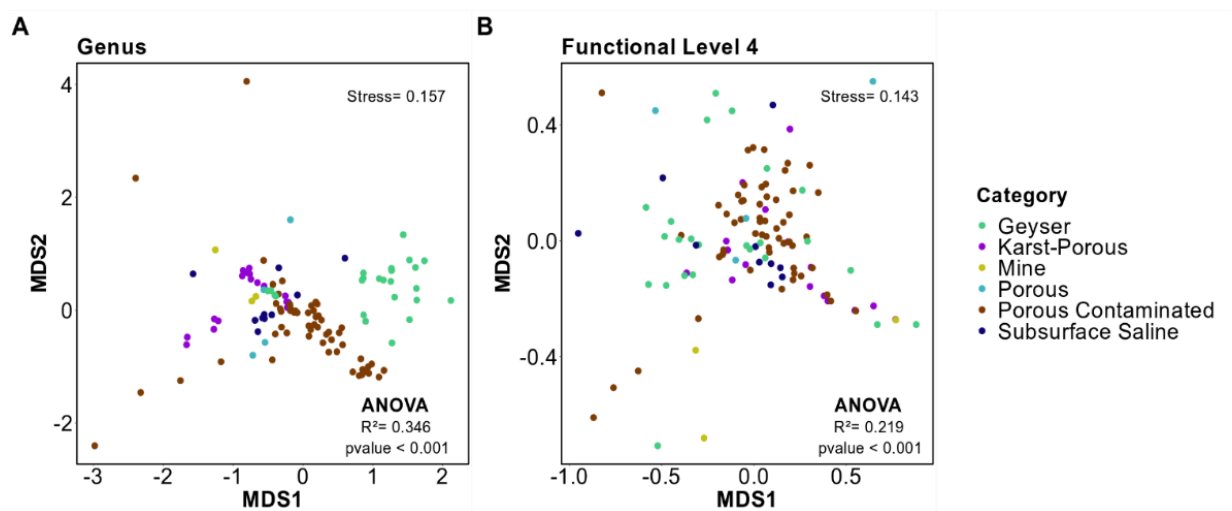
85 **Fig. 1** Taxonomic structure of the microbial community and their respective treatment. Each color
 86 represents a Phyla. We defined “others” as phyla with relative abundance mean less than 1%,
 87 considered a rare biosphere.

88

89 The microbial community structure was significantly different among the aquifer types both at the
 90 taxonomic (PERMANOVA: $F_5 = 6.67$, $p < 0.001$, Supplementary Table 2; Fig 2A) and functional
 91 levels (PERMANOVA: $F_5 = 5.18$, $p < 0.001$; Supplementary Table 3; Fig 2B). The genera
 92 *Sulfuricurvum* (SIMPER mean contribution 14.28%), *Staphylococcus* (1.51%), *Klebsiella* (1.18%),
 93 and *Pasteurella* (1.06%) drove the dissimilarities among the aquifer types microbial communities'
 94 structure (Supplementary Table 4). *Sulfuricurvum* is a chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing
 95 bacteria [16], and previous studies show that this group contributes to groundwater biogeochemical
 96 cycles [17]. One of the most important contributors to the dissimilarity between geyser and subsurface

97 saline aquifers, *Candidatus Altiarchaeum*, is known to contribute to carbon fixation in aquifers [18].
 98 Some species of free-living *Staphylococcus* genus are biosurfactant producers [19, 20], and beyond
 99 its importance in bioremediation [21], this substance can also influence the community by increasing
 100 microbial mobility and adhesion, [22] and the colonization of new environments [23]. *Klebsiella*,
 101 especially in mine aquifers, have strains described as adapted to high iron concentrations in acid mine
 102 drainage [24], suggesting that heavy-metal resistance might be a strategy to survive in this type of
 103 ecosystem.

104



105

106 **Fig. 2** Multidimensional analyses performed using Bray-Curtis's dissimilarity matrices of
 107 functional (A) and taxonomic (B) communities' structure, colored by types of aquifers. Microbial
 108 community structure was evaluated at the genus level and functions at the SEED Subsystem Level
 109 4. ANOVA results are shown in each plot.

110

111

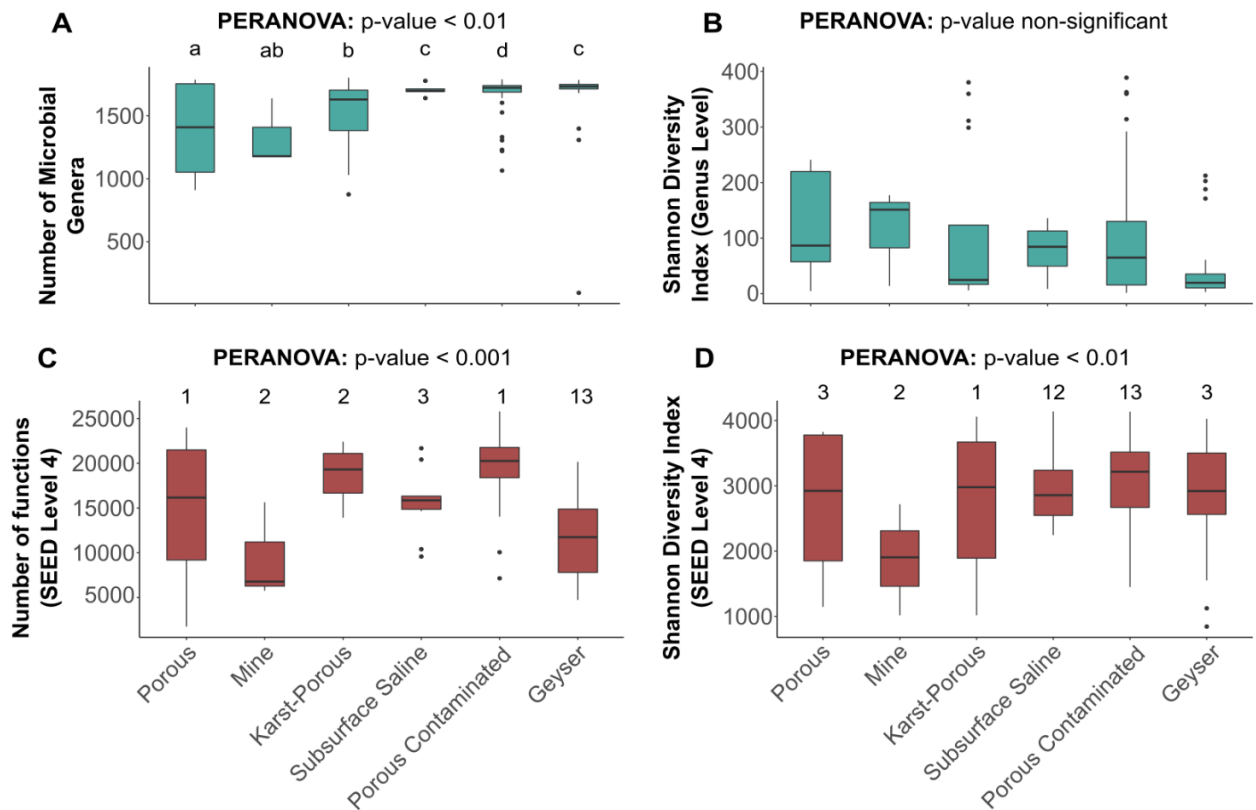
112 Functionally, the dissimilarities observed among the aquifer types were mainly driven by Outer
 113 membrane protein A precursor (1.15%), TonB-dependent receptor (0.45%), X3-oxoacyl-[acyl-
 114 carrier-protein] synthase KASIII (EC 2.3.1.180) (0.34%), NADH dehydrogenase subunit 5 (0.26%),
 115 and Alpha-1-2-mannosidase (0.13%) (Supplementary Table 5). In general, these functions are
 116 associated with the synthesis of proteins related to the cell membrane and their shape, and osmotic
 117 control mechanisms [25], providing resistance to external factors such as pollution [26], control the

118 entry and exit of substances in the cell [27], and recognize chemical signals to metabolize specific
119 compounds related to microbial resistance and reduction of immunogenicity [28]. These patterns may
120 be consequence of the different ions concentrations in each aquifer type, caused by different rock/soil
121 types and contamination status.

122 In addition to the differences found in the composition and structure of the microbial communities,
123 the richness and diversity also differed among the aquifer types, both at the taxonomic and functional
124 levels (Fig. 3). Subsurface saline aquifers had the richest microbial community, presenting 12% more
125 genera than other aquifer types. In contrast, mine aquifers showed the lowest number of genera
126 compared with all other types of aquifers ($p < 0.01$; Figure 3A; Supplementary Table 6). Despite the
127 variations in genus richness, no significant differences were observed in the Shannon diversity index
128 values among the metagenomes of different aquifer types [FA2] (Figure 3B; Supplementary Table 7).
129 In terms of functional diversity, the microbial communities of porous-contaminated and karst-porous
130 aquifers exhibit the highest number of functions (19,807 and 18,945, respectively). Mine aquifers, in
131 contrast, had the lowest number of functions (9,390) (Figure 3C; Supplementary Table 8). These
132 results show that in addition to affecting the richness and diversity of the microbial community, as in
133 soils [29], mining also decreases the diversity and functional richness in aquifers. Furthermore, these
134 results show that, despite the differences found, the taxonomic diversity index isn't different between
135 aquifer types indicating a diverse microbial community with a potential to execute different
136 ecological processes [30].

137

138



139 **Fig. 3** Microbial richness differs at taxonomic and functional levels, while only functional diversity
 140 differs among aquifer types. Taxonomic richness (A), taxonomic diversity (Shannon Index) (B),
 141 functional richness (C), and functional diversity (Shannon Index) (D). We used Genus and
 142 Subsystem Level 4 to calculate Richness and Shannon Diversity Indexes. The numbers and letters
 143 above each box represent a pairwise comparison presented in supplementary Tables 10, 11, and 12.
 144 PERMANOVA results testing the diversity among each aquifer type are presented in
 145 Supplementary Tables 6, 7, and 8.
 146

147 Our study highlighted the differences in the microbial community's composition, structure, and
 148 diversity among the aquifer types. These differences are mainly caused by controlling the flux of
 149 water and other substances in cells, a group known to perform chemolithoautotrophy, and bacterial
 150 groups with essential mechanisms to interact with other microorganisms. Our results shed light on
 151 possible abiotic factors that may structure the aquifers' microbial community's composition and
 152 functioning and show that despite several common characteristics, such as the absence of light and
 153 low O₂ concentrations, aquifers have peculiarities that cause the selection of different groups and
 154 functions in the microbial community that inhabit them.

155

REFERENCES

1. Shiklomanov I a. (1998) World Water Resources. A new appraisal and assessment for the 21st century. United Nations Educ Sci Cult Organ 40
2. Heath RC (1983) Basic ground-water hydrology. US Geol Surv Water-Supply Pap 86. <https://doi.org/10.3133/wsp2220>
3. De Giglio O, Quaranta A, Barbuti G, et al (2015) Factors influencing groundwater quality: towards an integrated management approach. *Ann Ig* 27:52–57. <https://doi.org/10.7416/ai.2015.2022>
4. Bijay-Singh, Yadvinder-Singh, Sekhon GS (1995) Fertilizer-N use efficiency and nitrate pollution of groundwater in developing countries. *J Contam Hydrol* 20:167–184. [https://doi.org/10.1016/0169-7722\(95\)00067-4](https://doi.org/10.1016/0169-7722(95)00067-4)
5. Bennett PC, Rogers JR, Hiebert FK (2000) Microbial control of mineral-groundwater equilibria: Macroscale to microscale. *Hydrogeol J* 8:47–62. <https://doi.org/10.1007/s100400050007>
6. Wu X, Holmfeldt K, Hubalek V, et al (2016) Microbial metagenomes from three aquifers in the Fennoscandian shield terrestrial deep biosphere reveal metabolic partitioning among populations. *ISME J* 10:1192–1203. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.185>
7. Griebler C, Lueders T (2009) Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshw Biol* 54:649–677. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02013.x>
8. Probst AJ, Ladd B, Jarett JK, et al (2018) Differential depth distribution of microbial function and putative symbionts through sediment-hosted aquifers in the deep terrestrial subsurface. *Nat Microbiol* 3:328–336. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0098-y>
9. Mascarenhas R, Ruziska FM, Moreira EF, et al (2020) Integrating Computational Methods to Investigate the Macroecology of Microbiomes. *Front Genet* 10:1–24. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01344>
10. Keegan KP, Glass EM, Meyer F (2016) MG-RAST, a metagenomics service for analysis of microbial community structure and function. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp 207–233
11. Leinonen R, Sugawara H, Shumway M (2011) The sequence read archive. *Nucleic Acids Res* 39:. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1019>
12. Wood DE, Lu J, Langmead B (2019) Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol* 20:257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
13. Campos AB, Cavalcante LC, de Azevedo AR, et al (2021) CPR and DPANN Have an Overlooked Role in Corals' Microbial Community Structure. *Microb Ecol*. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01737-4>
14. Silva GGZ, Green KT, Dutilh BE, Edwards RA (2016) SUPER-FOCUS: a tool for agile functional analysis of shotgun metagenomic data. *Bioinformatics* 32:354–361. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv584>
15. Yan L, Hermans SM, Totsche KU, et al (2021) Groundwater bacterial communities evolve over time in response to recharge. *Water Res* 201:117290. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117290>
16. Kodama Y, Watanabe K (2004) *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:2297–2300. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63243-0>
17. Handley KM, Bartels D, O'Loughlin EJ, et al (2014) The complete genome sequence for putative H₂- and S-oxidizer *Candidatus Sulfuricurvum* sp., assembled de novo from an

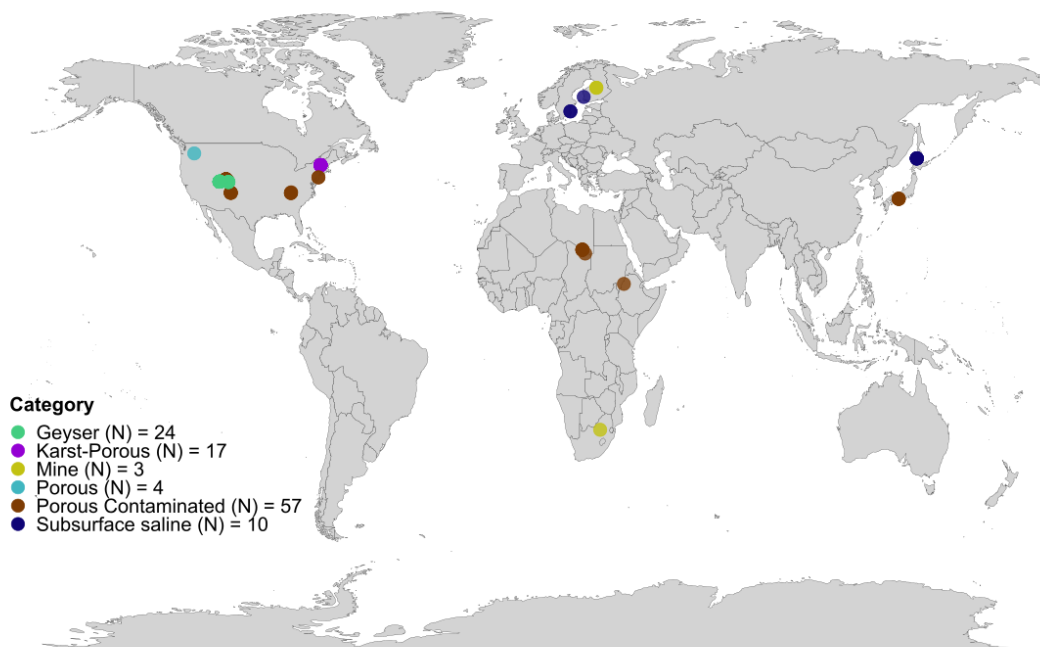
- aquifer-derived metagenome. *Environ Microbiol* 16:3443–3462.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12453>
18. Probst AJ, Weinmaier T, Raymann K, et al (2014) Biology of a widespread uncultivated archaeon that contributes to carbon fixation in the subsurface. *Nat Commun* 5:1–13.
<https://doi.org/10.1038/ncomms6497>
 19. Eddouaouda K, Mnif S, Badis A, et al (2012) Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. *J Basic Microbiol* 52:408–418. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100268>
 20. Mani P, Dineshkumar G, Jayaseelan T, et al (2016) Antimicrobial activities of a promising glycolipid biosurfactant from a novel marine *Staphylococcus saprophyticus* SBPS 15. *3 Biotech* 6:1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0478-7>
 21. Pacwa-Płociniczak M, Płaza GA, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS (2011) Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *Int J Mol Sci* 12:633–654.
<https://doi.org/10.3390/ijms12010633>
 22. Okoliegbe IN, Agarry OO (2012) Application of microbial surfactant (a review). *Sch Journals Biotechnol* 1:15–23
 23. Sánchez ADJC, Ramirez MD, Barrientos RG, Sharma A (2017) The genus *Staphylococcus* : Harmful and Beneficial Microorganisms. *Pakistan J Life Soc Sci* 15:72–83
 24. Baldi F, Marchetto D, Battistel D, et al (2009) Iron-binding characterization and polysaccharide production by *Klebsiella oxytoca* strain isolated from mine acid drainage. *J Appl Microbiol* 107:1241–1250. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04302.x>
 25. Csonka LN (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* 53:121–147. <https://doi.org/10.1128/mr.53.1.121-147.1989>
 26. Russell AD (2003) Bacterial outer membrane and cell wall penetration and cell destruction by polluting chemical agents and physical conditions. *Sci Prog* 86:283–311.
<https://doi.org/10.3184/003685003783238608>
 27. Fujita M, Mori K, Hara H, et al (2019) A TonB-dependent receptor constitutes the outer membrane transport system for a lignin-derived aromatic compound. *Commun Biol* 2:1–10.
<https://doi.org/10.1038/s42003-019-0676-z>
 28. Upreti RK, Kumar M, Shankar V (2003) Bacterial glycoproteins: Functions, biosynthesis and applications. *Proteomics* 3:363–379. <https://doi.org/10.1002/pmic.200390052>
 29. Munyai R, Ogola HJO, Modise DM (2021) Microbial Community Diversity Dynamics in Acid Mine Drainage and Acid Mine Drainage-Polluted Soils: Implication on Mining Water Irrigation Agricultural Sustainability. *Front Sustain Food Syst* 5:1–14.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.701870>
 30. Delgado-Baquerizo M, Giaramida L, Reich PB, et al (2016) Lack of functional redundancy in the relationship between microbial diversity and ecosystem functioning. *J Ecol* 104:936–946. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12585>

Supplementary Material

Supplementary Methods: We used the PRINSEQ software [1], to establish minimum quality parameters in the subsequent bioinformatics analyzes, the minimum number of base pairs (50 bp), and quality of DNA sequences (quality index 13; unidentified base pairs 2). We used the KRAKEN2 software [2] with standard parameters (k=35, $\ell=31$, s=7, and f=100%) for taxonomic annotation. To be able to detect recently described candidates phyla, we used a customized reference database, combining nearly all Bacteria and Archaea genomes from RefSeq database (February, 2019) together with almost 3,000 genomes from taxa recently described as phylum candidates, as presented in [3]. We performed the functional annotation using the SUPERFOCUS software [4] with the RAPsearch2 searching algorithm [5] with minimum identity values of 60%, e-value equal to 10^{-4} and minimum alignment of 45 base pairs, using the SEED as reference database [6].

To assess the dissimilarities in the taxonomic and functional microbial communities' structure among the aquifer types, we apply one-way permutational multivariate analysis (PERMANOVA) and visually represented the results in a non-metric multidimensional scaling (nMDS) plot. To evaluate which genus and functional groups mostly contributed to dissimilarities among aquifer types, we performed Similarity Percentage Analysis (SIMPER). To test if the genus richness, number of functions and microbial diversity are different among the aquifer types (as fixed factors), we used One-way univariate permutational analysis (PERANOVA). All permutational analyses were performed using the Bray-Curtis resemblance matrices with 9999 permutations. We performed pairwise comparison of the mean tests, corrected by the false discovery rate (FDR) [7], when significant effects were observed in PERMANOVA. We used R version 3.0.1 [8], with the packages vegan [9], lmpPerm [10] and EcolUtils [11] for statistical analysis. For data treatment and visualization, we used the packages ggplot2 [12], tidyverse [13], dplyr [14], and RcolorBrewer [15].

Supplementary Fig 1 Geographic distribution of the 115 samples from SRA and MG-RAST database in groundwater samples from around the world. Samples were classified into 6 categories: Geyser (sample size = 24), Karst-Porous (sample size =16), Mine (sample size =3), Porous (sample size = 4), Porous Contaminated (sample size = 57), Subsurface Saline (sample size = 16)



Supplementary Table 1: Metadata, environmental information, metagenomic data and aquifer type of 115 metagenomic samples retrieved from MG-RAST and NCBI database.

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1ZicnBrViWOrteVLhpt_piq5tPIFsA-QL/edit?usp=sharing&ouid=108478587293608047454&rtpof=true&sd=true

Supplementary Table 2: Permutational analysis of variance (PERMANOVA) performed to the structure of microbial community at genus level. Number of permutations: 4999. Significant results are indicated in **bold**.

	<i>Degrees of Freedom</i>	<i>Sums Of Squares</i>	<i>Mean Squares</i>	<i>F Model</i>	<i>R²</i>	<i>p-value</i>
Category	5	34.578	6.915	6.671	0.234	0.0002
Residuals	109	112.992	1.036	0.765		
Total	114	147.570	1.000			

Supplementary Table 3: Permutational analysis of variance (PERMANOVA) performed to the structure of microbial communities' functions (at the subsystem level 4). Number of permutations: 4999. Significant results are indicated in **bold**.

	<i>Degrees of Freedom</i>	<i>Sums Of Squares</i>	<i>Mean Squares</i>	<i>F Model</i>	<i>R²</i>	<i>p-value</i>
Category	5	2.053	0.410	5.180	0.192	0.0002
Residuals	109	8.642	0.079	0.807		

Total	114	10.695	1.000			
-------	-----	--------	-------	--	--	--

Supplementary Table 4: Percent Similarity (SIMPER) comparing the structure of microbial communities (at the genera level) among each of the six aquifer types. Results are shown pair-wisely based on the similarity coefficient of Bray Curtis. The table shows the average contribution to overall dissimilarity and the abundance in each of the compared treatments of bacterial genus responsible for dissimilarity calculated between aquifer types, as well as the cumulative contribution of each of these genera added to this calculated dissimilarity percentage. In the data sheet, the different tabs show only those significant comparisons between treatments.

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1qPNT61gd8JhPXslw0mybLQazKosgRQZ6/edit?usp=sharing&ouid=108478587293608047454&rtpof=true&sd=true>

Supplementary Table 5: Percent Similarity (SIMPER) comparing the structure of microbial communities' functions (at the subsystem level 4) among each of the six aquifer types. Results are shown pair-wisely based on the similarity coefficient of Bray Curtis. The table shows the average contribution to overall dissimilarity and the abundance in each of the compared treatments functions responsible for dissimilarity calculated between aquifer types, as well as the cumulative contribution of each of these functions added to this calculated dissimilarity percentage. In the data sheet, the different tabs show only those significant comparisons between treatments.

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1dNKxni2MDHK0DX7N_i_TADw8azSKQFi-/edit?usp=sharing&ouid=108478587293608047454&rtpof=true&sd=true

Supplementary Table 6: One-way univariate permutational analysis of variance (PERANOVA) performed for taxonomic richness mean by aquifer type at genus level. Significant results are indicated in **bold**.

	<i>Degrees of Freedom</i>	<i>R Sum of Squares</i>	<i>R Mean of Squares</i>	<i>Iterations</i>	<i>p-value</i>
Category	5	1397286	279457	5000	0.0014
Residuals	109	5944882	54540		

Supplementary Table 7: One-way univariate permutational analysis of variance (PERANOVA) performed for Shannon diversity index for microbial community abundance mean by aquifer type at genus level. Significant results are indicated in **bold**.

	<i>Degrees of Freedom</i>	<i>R Sum of Squares</i>	<i>R Mean of Squares</i>	<i>Iterations</i>	<i>p-value</i>
Category	5	59835	11967	194	0.732
Residuals	109	1049017	9624		

Supplementary Table 8: One-way univariate permutational analysis of variance (PERANOVA) performed for Shannon diversity index for microbial community functions mean by aquifer type at subsystem level 4. Significant results are indicated in **bold**.

	<i>Degrees of Freedom</i>	<i>R Sum of Squares</i>	<i>R Mean of Squares</i>	<i>Iterations</i>	<i>p-value</i>
Category	5	11436543	2287309	5000	0.0066
Residuals	109	56868121	521726		

Supplementary Table 9: One-way univariate permutational analysis of variance (PERANOVA) performed for microbial functions richness mean by aquifer type at subsystem level 4. Significant results are indicated in **bold**.

	<i>Degrees of Freedom</i>	<i>R Sum of Squares</i>	<i>R Mean of Squares</i>	<i>Iterations</i>	<i>p-value</i>
Category	5	895118295	179023659	5000	2.2×10^{-16}
Residuals	109	2155724398	19777288		

Supplementary Table 10: Pairwise comparison of the microbial functions Shannon diversity index mean by aquifer type corrected by the false discovery rate (FDR) method. Significant results are indicated in **bold**.

<i>Combination</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Mean of Squares</i>	<i>F Model</i>	<i>R²</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value corrected</i>
Geyser - Karst-Porous	4241504.267	4241504.267	7.851	0.168	0.007	0.027
Geyser - Mine	247426.331	247426.331	0.331	0.013	0.599	0.746
Geyser - Porous	34875.726	34875.726	0.047	0.002	0.842	0.902
Geyser - Porous Contaminated	162862.094	162862.094	0.258	0.003	0.602	0.746
Geyser - Subsurface saline	3186539.866	3186539.866	5.014	0.135	0.026	0.067
Karst-Porous - Mine	2337703.158	2337703.158	11.541	0.391	0.006	0.027
Karst-Porous - Porous	986681.492	986681.492	4.556	0.193	0.045	0.096
Karst-Porous - Porous Contaminated	7386587.051	7386587.051	15.278	0.175	0.0004	0.006
Karst-Porous - Subsurface saline	2277.792	2277.792	0.011	0.000	0.923	0.923
Mine - Porous	281828.797	281828.797	0.819	0.141	0.571	0.746
Mine - Porous Contaminated	121420.446	121420.446	0.217	0.004	0.646	0.746
Mine - Subsurface saline	2200455.099	2200455.099	8.308	0.430	0.019	0.058
Porous - Porous Contaminated	148100.627	148100.627	0.266	0.004	0.609	0.746
Porous - Subsurface saline	931630.629	931630.629	3.305	0.216	0.095	0.178
Porous Contaminated - Subsurface saline	5045153.349	5045153.349	9.623	0.129	0.002	0.018

Supplementary Table 11: Pairwise comparison of the taxonomic richness means by aquifer type corrected by the false discovery rate (FDR) method. Significant results are indicated in **bold**.

<i>Combination</i>	<i>Sums Of Squares</i>	<i>Mean of Squares</i>	<i>F Model</i>	<i>R²</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value corrected</i>
Geyser - Karst-Porous	136353.543	136353.543	1.316	0.032	0.273	0.410
Geyser - Mine	249084.375	249084.375	2.142	0.078	0.121	0.202
Geyser - Porous	680596.720	680596.720	5.525	0.175	0.045	0.099
Geyser - Porous Contaminated	23063.369	23063.369	0.446	0.005	0.544	0.625
Geyser - Subsurface saline	31223.706	31223.706	0.360	0.011	0.637	0.637
Karst-Porous - Mine	90673.224	90673.224	1.153	0.060	0.322	0.439
Karst-Porous - Porous	349398.857	349398.857	3.880	0.169	0.066	0.124
Karst-Porous - Porous Contaminated	310593.028	310593.028	8.632	0.107	0.00	0.019
Karst-Porous - Subsurface saline	212160.007	212160.007	4.130	0.141	0.046	0.099
Mine - Porous	33560.011	33560.011	0.290	0.054	0.542	0.625
Mine - Porous Contaminated	334476.955	334476.955	13.300	0.186	0.004	0.019
Mine - Subsurface saline	319576.656	319576.656	23.133	0.677	0.005	0.019
Porous - Porous Contaminated	870145.246	870145.246	29.273	0.331	0.000	0.009
Porous - Subsurface saline	749129.150	749129.150	20.102	0.626	0.007	0.023

Porous Contaminated - Subsurface saline	7430.943	7430.943	0.364	0.005	0.584	0.625
--	----------	----------	-------	-------	-------	-------

Supplementary Table 12: Pairwise comparison of the microbial functions richness means by aquifer type corrected by the false discovery rate (FDR) method. Significant results are indicated in **bold**.

<i>Combination</i>	<i>Sums Of Squares</i>	<i>Mean of Squares</i>	<i>F Model</i>	<i>R²</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value corrected</i>
Geyser - Karst-Porous	410120561.635	410120561.635	14.480	0.270	0.0004	0.002
Geyser - Mine	190615157.042	190615157.042	4.710	0.158	0.039	0.066
Geyser - Porous	206866279.339	206866279.339	5.093	0.163	0.025	0.048
Geyser - Porous Contaminated	1202825.394	1202825.394	0.055	0.0007	0.81	0.819
Geyser - Subsurface saline	1912929.393	1912929.393	0.064	0.002	0.811	0.819
Karst-Porous - Mine	10558902.785	10558902.785	0.674	0.036	0.43	0.645
Karst-Porous - Porous	5882928.807	5882928.807	0.342	0.017	0.542	0.6782
Karst-Porous - Porous Contaminated	495732991.796	495732991.796	36.813	0.338	0.0002	0.001
Karst-Porous - Subsurface saline	303280056.932	303280056.932	34.005	0.576	0.0002	0.001
Mine - Porous	809089.714	809089.714	0.017	0.003	0.771	0.819
Mine - Porous Contaminated	191062067.372	191062067.372	12.640	0.178	0.004	0.012
Mine - Subsurface saline	185894342.400	185894342.400	15.716	0.588	0.012	0.026
Porous - Porous Contaminated	210288198.848	210288198.848	13.470	0.185	0.002	0.0097
Porous - Subsurface saline	196269312.114	196269312.114	13.501	0.529	0.009	0.024
Porous Contaminated - Subsurface saline	5275227.451	5275227.451	0.419	0.006	0.518	0.6782

References:

- Schmieder R, Edwards R (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>
- Wood DE, Lu J, Langmead B (2019) Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol* 20:257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Campos AB, Cavalcante LC, de Azevedo AR, et al (2021) CPR and DPANN Have an Overlooked Role in Corals' Microbial Community Structure. *Microb Ecol*. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01737-4>
- Silva GGZ, Green KT, Dutilh BE, Edwards RA (2016) SUPER-FOCUS: a tool for agile functional analysis of shotgun metagenomic data. *Bioinformatics* 32:354–361. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv584>
- Zhao Y, Tang H, Ye Y (2012) RAPSearch2: A fast and memory-efficient protein similarity search tool for next-generation sequencing data. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr595>
- Overbeek R, Begley T, Butler RM, et al (2005) The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res*. <https://doi.org/10.1093/nar/gki866>
- Anderson MJ (2017) *Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA)* . Wiley StatsRef Stat Ref Online 1–15. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841>
- Team R Development Core (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found Stat Comput 2:<https://www.R-project.org>
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, et al (2012) *vegan: Community Ecology Package*. R Packag. version 1:R package version 2.0-4
- Wheeler B, Torchiano M (2016) *ImPerm: Permutation Tests for Linear Models*. Rpackage version 2.1.0

11. Salazar G (2022) EcolUtils: Utilities for community ecology analysis. Rpackage version 0.1
12. Wickham H (2016) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York
13. Wickham H, Averick M, Bryan J, et al (2019) Welcome to the Tidyverse. J Open Source Softw 4:1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
14. Wickham H, François R, Henry L, Müller K (2019) dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 0.8.3
15. Neuwirth E (2014) RColorBrewer: ColorBrewer Palettes. R package version 1.1-2

4. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que a principal força de seleção de grupos e funções em aquíferos advém das características físico-químicas e das condições de armazenamento de água. Nosso estudo explorou as diferenças nas estruturas taxonômicas e funcionais microbianas entre os tipos de aquíferos, o que pode ser um reflexo das diferenças nas características físicas dos aquíferos, afetando cada característica (funcional ou taxonômica) de maneiras diferentes, formando grupos relacionados a suas características ambientais e estrutura biológica. Nossa análise mostrou que funções relacionadas às condições do aquífero e características físico-químicas são importantes para as diferenças entre as comunidades microbianas em cada tipo de aquífero. Com o presente trabalho, demonstramos que a microbiota de aquíferos, apesar de sujeita as características do ambiente (afótico e anóxicos), pode apresentar características distintas. Isso demonstra a relevância de um estudo detalhado dos aquíferos e das suas características individuais, juntamente com a comunidade de microrganismos que o habita e as funções. Infelizmente, durante a nossa busca pelas amostras metagenômicas, não encontramos nenhuma coletada em aquíferos brasileiros. Nossos resultados abrem fronteiras para outros estudos sobre a qualidade da água, impacto antrópico e a distribuição de microrganismos e suas funções no mundo.

5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- 156 Ahmad, M.U.D., Bastiaanssen, W.G.M., Feddes, R.A., 2002. Sustainable use of groundwater for
157 irrigation: A numerical analysis of the subsoil water fluxes. *Irrig. Drain.* 51, 227–241.
158 <https://doi.org/10.1002/ird.59>
- 159 Alan Glennon, J., 2005. Carbon-Dioxide-Driven, Cold-Water Geysers [WWW Document]. URL
160 <http://www.uweb.ucsb.edu/~glennon/crystalgeyser/index.htm> (accessed 12.12.21).
- 161 Barlow, P.M., Reichard, E.G., 2010. Saltwater intrusion in coastal regions of North America.
162 *Hydrogeol. J.* 18, 247–260. <https://doi.org/10.1007/s10040-009-0514-3>
- 163 Benner, S., Gould, W., Blowes, D., 2000. Microbial populations associated with the generation
164 and treatment of acid mine drainage. *Chem. Geol.* 169, 435–448.
165 [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(00\)00219-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(00)00219-9)
- 166 Cuthbert, M.O., Gleeson, T., Moosdorf, N., Befus, K.M., Schneider, A., Hartmann, J., Lehner, B.,
167 2019. Global patterns and dynamics of climate–groundwater interactions. *Nat. Clim. Chang.* 9,
168 137–141. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0386-4>
- 169 Earle, S., 2019. Groundwater and Aquifers, in: BCcampus, BC Open Textbook Project (Eds.),
170 *Physical Geology*. pp. 456–461.
- 171 Flemming, H.C., Wuertz, S., 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms.
172 *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 247–260. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>
- 173 Fryar, A.E., 2021. Groundwater of carbonate aquifers, in: *Global Groundwater*. Elsevier, pp. 23–34.
174 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818172-0.00002-5>
- 175 Gabrovšek, F., Menne, B., Dreybrodt, W., 2000. A model of early evolution of karst conduits
176 affected by subterranean CO₂ sources. *Environ. Geol.* 39, 531–543.
177 <https://doi.org/10.1007/s002540050464>
- 178 Gavrilesco, M., Pavel, L.V., Cretescu, I., 2009. Characterization and remediation of soils
179 contaminated with uranium. *J. Hazard. Mater.* 163, 475–510.
180 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.103>
- 181 Geldreich, E.E., 1990. Microbiological Quality of Source Waters for Water Supply. pp. 3–31.
182 https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4464-6_1
- 183 Griebler, C., Lueders, T., 2009. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshw. Biol.*
184 54, 649–677. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02013.x>
- 185 Hershey, O.S., Kallmeyer, J., Wallace, A., Barton, M.D., Barton, H.A., 2018. High microbial
186 diversity despite extremely low biomass in a deep karst aquifer. *Front. Microbiol.* 9, 1–13.
187 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02823>
- 188 Jackson, T.A., Vlaar, S., Nguyen, N., Leppard, G.G., Finan, T.M., 2015. Effects of Bioavailable
189 Heavy Metal Species, Arsenic, and Acid Drainage from Mine Tailings on a Microbial
190 Community Sampled Along a Pollution Gradient in a Freshwater Ecosystem. *Geomicrobiol. J.*
191 32, 724–750. <https://doi.org/10.1080/01490451.2014.969412>
- 192 Knobloch, S., Klonowski, A.M., Tómasdóttir, S., Kristjánsson, B.R., Guðmundsson, S.,
193 Marteinson, V.Þ., 2021. Microbial intrusion and seasonal dynamics in the groundwater
194 microbiome of a porous basaltic rock aquifer used as municipal water reservoir. *FEMS*
195 *Microbiol. Ecol.* 97. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab014>
- 196 Krumholz, L.R., 2000. Microbial communities in the deep subsurface. *Hydrogeol. J.* 8, 4–10.
- 197 Kumar Soni, A., 2019. Mining of Minerals and Groundwater in India, in: *Groundwater - Resource*
198 *Characterisation and Management Aspects*. IntechOpen.
199 <https://doi.org/10.5772/intechopen.85309>
- 200 Le Maitre, D.C., Scott, D.F., Colvin, C., 1999. A review of information on interactions between
201 vegetation and groundwater. *Water SA* 25, 137–152.

- 202 Li, P., Karunanidhi, D., Subramani, T., Srinivasamoorthy, K., 2021. Sources and Consequences of
 203 Groundwater Contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 1–10.
 204 <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00805-z>
- 205 Mascarenhas, R., Ruziska, F.M., Moreira, E.F., Campos, A.B., Loiola, M., Reis, K., Trindade-Silva,
 206 A.E., Barbosa, F.A.S., Salles, L., Menezes, R., Veiga, R., Coutinho, F.H., Dutilh, B.E.,
 207 Guimarães, P.R., Assis, A.P.A., Ara, A., Miranda, J.G.V., Andrade, R.F.S., Vilela, B.,
 208 Meirelles, P.M., 2020. Integrating Computational Methods to Investigate the Macroecology of
 209 Microbiomes. *Front. Genet.* 10, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01344>
- 210 Morozova, D., Zettlitzer, M., Let, D., Würdemann, H., 2011. Monitoring of the microbial
 211 community composition in deep subsurface saline aquifers during CO₂ storage in Ketzin,
 212 Germany. *Energy Procedia* 4, 4362–4370. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2011.02.388>
- 213 Oliveira, I.B. de, Negrão, F.I., Silva, A.G.L.S., 2007. Mapeamento Dos Aquíferos Do Estado Da
 214 Bahia Utilizando O Índice De Qualidade Natural Das Águas Subterrâneas – Iqnas. *Águas*
 215 *Subterrâneas* 21, 123–137. <https://doi.org/10.14295/ras.v21i1.16176>
- 216 Parvizishad, M., Dalvand, A., Mahvi, A.H., Goodarzi, F., 2017. A Review of Adverse Effects and
 217 Benefits of Nitrate and Nitrite in Drinking Water and Food on Human Health. *Heal. Scope In*
 218 *Press.* <https://doi.org/10.5812/jhealthscope.14164>
- 219 Probst, A.J., Ladd, B., Jarett, J.K., Geller-Mcgrath, D.E., Sieber, C.M.K., Emerson, J.B.,
 220 Anantharaman, K., Thomas, B.C., Malmstrom, R.R., Stieglmeier, M., Klingl, A., Woyke, T.,
 221 Ryan, M.C., Banfield, J.F., 2018. Differential depth distribution of microbial function and
 222 putative symbionts through sediment-hosted aquifers in the deep terrestrial subsurface. *Nat.*
 223 *Microbiol.* 3, 328–336. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0098-y>
- 224 Pronk, M., Goldscheider, N., Zopfi, J., 2009. Microbial communities in karst groundwater and their
 225 potential use for biomonitoring. *Hydrogeol. J.* 17, 37–48. <https://doi.org/10.1007/s10040-008-0350-x>
- 227 Qureshi, A.S., 2015. Improving food security and livelihood resilience through groundwater
 228 management in Pakistan. *Glob. Adv. Res. J. Agric. Sci.* 4, 687–710.
- 229 REIMANN, C., HALL, G., SIEWERS, U., BJORVATN, K., MORLAND, G., SKARPHAGEN, H.,
 230 STRAND, T., 1996. Radon, fluoride and 62 elements as determined by ICP-MS in 145
 231 Norwegian hard rock groundwater samples. *Sci. Total Environ.* 192, 1–19.
 232 [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05272-2](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05272-2)
- 233 Riedel, T., Kübeck, C., 2018. Uranium in groundwater – A synopsis based on a large
 234 hydrogeochemical data set. *Water Res.* 129, 29–38.
 235 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.001>
- 236 Rose, D.A., Konukcu, F., Gowing, J.W., 2005. Effect of watertable depth on evaporation and salt
 237 accumulation from saline groundwater. *Aust. J. Soil Res.* 43, 565–573.
 238 <https://doi.org/10.1071/SR04051>
- 239 Shiklomanov, I. a., 1998. World Water Resources. A new appraisal and assessment for the 21st
 240 century. *United Nations Educ. Sci. Cult. Organ.* 40.
- 241 Soldera, B.C., 2017. Monitoramento dos níveis freáticos do aquífero Bauru (formação adamantina)
 242 no município de Assis-SP.
- 243 Su, C., Lei, L., Duan, Y., Zhang, K.Q., Yang, J., 2012. Culture-independent methods for studying
 244 environmental microorganisms: Methods, application, and perspective. *Appl. Microbiol.*
 245 *Biotechnol.* 93, 993–1003. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3800-7>
- 246 Taubert, M., Overholt, W.A., Heinze, B.M., Matanfack, G.A., Houhou, R., Jehmlich, N., von
 247 Bergen, M., Rösch, P., Popp, J., Küsel, K., 2022. Bolstering fitness via CO₂ fixation and
 248 organic carbon uptake: mixotrophs in modern groundwater. *ISME J.* 16, 1153–1162.
 249 <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01163-x>

- 250 Wu, X., Holmfeldt, K., Hubalek, V., Lundin, D., Åström, M., Bertilsson, S., Dopson, M., 2016.
251 Microbial metagenomes from three aquifers in the Fennoscandian shield terrestrial deep
252 biosphere reveal metabolic partitioning among populations. *ISME J.* 10, 1192–1203.
253 <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.185>
- 254 Zhou, J., Deng, Y., Zhang, P., Xue, K., Liang, Y., Van Nostrand, J.D., Yang, Y., He, Z., Wu, L.,
255 Stahl, D.A., Hazen, T.C., Tiedje, J.M., Arkin, A.P., 2014. Stochasticity, succession, and
256 environmental perturbations in a fluidic ecosystem. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111.
257 <https://doi.org/10.1073/pnas.1324044111>
- 258 Zhou, Y.Q., Sawyer, A.H., David, C.H., Famiglietti, J.S., 2019. Fresh Submarine Groundwater
259 Discharge to the Near-Global Coast. *Geophys. Res. Lett.* 46, 5855–5863.
260 <https://doi.org/10.1029/2019GL082749>

ANEXOS

NORMAS DE FORMATAÇÃO DA REVISTA

Notas

A Microbial Ecology aceita contribuições mais curtas na forma de NOTAS. Uma Nota deve ser um texto contínuo com um comprimento não superior a 1200 palavras. Não deve haver mais de três figuras ou tabelas com legendas breves. Os métodos devem ser incluídos, bem como as referências.

Abstract

Forneça um resumo de 150 a 250 palavras. O resumo não deve conter abreviaturas indefinidas ou referências não especificadas.

Palavras-chave

Forneça de 4 a 6 palavras-chave que podem ser usadas para fins de indexação.

Formatação de texto

Os manuscritos devem ser submetidos em Word.

Use uma fonte normal e simples (por exemplo, Times Roman de 10 pontos) para o texto.

Use itálico para dar ênfase.

Use a função de numeração automática de páginas para numerar as páginas.

Não use funções de campo.

Use tabulação ou outros comandos para recuos, não a barra de espaço.

Use a função de tabela, não planilhas, para fazer tabelas.

Use o editor de equações ou MathType para equações.

Salve seu arquivo em formato docx (Word 2007 ou superior) ou formato doc (versões mais antigas do Word).