



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA MOLECULAR

Estudo da riqueza de membros do domínio *Archaea* em sedimentos de lagoas do cerrado

Thiago Rodrigues de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular

Orientadora: Dra. Cynthia Maria Kyaw

2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA MOLECULAR

Estudo da riqueza de membros do domínio *Archaea* em sedimentos de lagoas do cerrado

Thiago Rodrigues de Oliveira

Dissertação aprovada pela banca:

Dra. Cynthia Maria Kyaw (orientadora) (Universidade de Brasília)

Dra. Betania Ferraz Quirino (Universidade Católica – Brasília)

Dra. Ildinete Silva Pereira (Universidade de Brasília)

Brasília, 2013

*Dedico essa dissertação de mestrado a
Carl Woese (1928-2012), grande pesquisador
que revolucionou a microbiologia, de forma que
sem suas contribuições para a ciência,
este trabalho não teria sido possível.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, Cynthia Kyaw, pela paciência, humildade, conselhos e apoio ao longo da realização desse trabalho. Admiro seu vasto conhecimento de microbiologia e biologia molecular e sua postura muito presente. Acima de tudo, no entanto, gostaria de agradecer pela sua amizade. Tive sorte de tê-la como orientadora.

Agradeço meus pais, Ednamara e Joanes, por terem me apoiado desde que era criança e falava que quando crescer queria ser cientista. Minha mãe me mostrou a importância de se fazer algo que ama, com seu compromisso e implicação como médica. Meu pai me mostrou que mesmo estando atento aos problemas que a realidade trás, podemos alcançar nossos objetivos.

Gostaria de agradecer minha irmã e amiga Nadja, super inteligente, que mesmo sem entender nada de biologia me ouviu reclamar de cada transformação que não funcionou.

Por fazer o trabalho de bancada ser muito mais divertido do que se poderia pensar, agradeço aos meus colegas de laboratório: Elisa Catão, Helena Magaldi, Julianna Peixoto, Vitor Valdez, Aline Belmok e Deborah Vasconcellos. Agradeço a companhia, a ajuda, as piadas e as contribuições intelectuais.

Gostaria de agradecer especialmente à minha veterana de laboratório e mestrado, Elisa Catão. Desde que entrei no laboratório me ensinou muitos procedimentos e me ajudou imensamente com as análises de bioinformática utilizadas nesse trabalho, sempre com muita paciência.

Agradeço aos meus amigos biológicos, colegas de semestre, cuja amizade se fez presente desde o início da graduação até hoje: Diogo César (Gira), Amanda Todeschini, Diêgo Iocca, Anderson Brito, Aline Belmok, Luiza Xavier (Luxi), Gabriel Caetano, Luiza Helena (Luli), Ester Rose, Chael Mazza, Stefânia Przybylska (demorei mais para escrever esse sobrenome do que a dissertação), Marcos Dumont, Gabriela Correa.

Agradeço também a duas pessoas muito especiais para mim: Alana Lima e Clau Nascimento. Nenhum dos dois entende de biologia, mas sempre fizeram esforço para entender do que eu falava. Além disso, sempre pude contar com seu apoio e companhia.

Obrigado ao meu amigo e colega de mestrado Lucas Carvalho por ter me dado suporte no seu laboratório sempre que o procurei.

Gostaria de agradecer os professores Ricardo Krüger e Mercedes Bustamante pela sua colaboração com essa pesquisa.

Muito obrigado a professora Silviene por ter disponibilizado o espectrofotômetro NanoVue™ de seu laboratório para a quantificação do DNA utilizado neste trabalho.

Obrigado aos responsáveis por boa parte do sequenciamento de minhas placas, feito no Laboratório de Biologia Molecular: Marcus Teixeira, Adriane Oliveira e Bruno.

Finalmente, agradeço a quem me ajudou a focar no processo de escrita com sua música: Dream Theater, Pain of Salvation, Queen, Metallica, After Forever, Aerosmith, Led Zeppelin, Scorpions, Deep Purple, Alice in Chains, Pink Floyd, Skid Row, Opeth, Porcupine Tree.

“Intuition and concepts constitute the elements of all our knowledge, so that neither concepts without an intuition in some way corresponding to them, nor intuition without concepts, can yield knowledge.”

Immanuel Kant

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética universal, na qual é possível observar o posicionamento filogenético dos três domínios da vida (Woese et al., 1990).....	7
Figura 2. Esquema dos diferentes tipos de parede celular encontrados em Archaea (Albers e Meyer, 2011).....	9
Figura 3. Microscopia de fluorescência após hibridização com sondas específicas, indicando a associação entre Nanoarchaeum equitans (vermelho) e Ignicoccus hospitalis (verde) (Huber et al., 2002).....	12
Figura 4. Árvore filogenética de Archaea baseada no alinhamento de proteínas ribossomais, englobando os filos aceitos formalmente e atualmente propostos (Brochier-Armanet et al., 2011).....	15
Figura 5. Mapa esquemático do Brasil indicando os biomas brasileiros. O cerrado ocupa a região central.....	18
Figura 6. Imagem de satélite indicando os pontos de coleta dos sedimentos RIB4 e RIB5, obtida utilizando-se o programa Google Earth™.....	20
Figura 7. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% das amostras de DNA total extraído dos sedimentos utilizados nesse trabalho.....	29
Figura 8. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo fragmentos de genes de rRNA 16S amplificados utilizando-se os iniciadores 340f e 1000r com a amostra LRPA.....	31
Figura 9. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo fragmentos de genes de rRNA 16S amplificados utilizando-se os iniciadores 21f e 958r para as amostras RIB4-M e RIB5-M.....	32
Figura 10. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo fragmentos de genes de rRNA 16S amplificados utilizando-se os iniciadores 21f e 958r para a mostra RIB4-S.....	33

Figura 11. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo fragmentos de genes de rRNA 16S amplificados utilizando-se os iniciadores 21f e 958r para a mostra RIB5-S.....	33
Figura 12. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, contendo plasmídeos recombinantes com os fragmentos de genes de rRNA 16S obtidos a partir do sedimento da Lagoa Rio Preto Alto (LRPA).....	35
Figura 13. Histograma da classificação taxonômica pelo RDP das sequências de trechos do gene que codifica o rRNA 16S obtidas a partir de ensaios de PCR com os sedimentos.....	37
Figura 14. Histograma indicando a distribuição das ordens de Euryarchaeota observadas com o alinhamento de sequências de genes de rRNA 16S com o RDP na amostra LRPA.....	39
Figura 15. Alinhamento das sequências provenientes da amostra LRPA com o banco de dados RDP, para o filo Euryarchaeota.....	39
Figura 16. Curva de rarefação referente à comunidade da amostra LRPA, com as porcentagens de dissimilaridade de 3%, 5%, 10%, 20%.....	43
Figura 17. Curva de rarefação referente à comunidade da amostra RIB4-M, com as porcentagens de dissimilaridade de 3%, 5%, 10%, 20%.....	45
Figura 18. Curva de rarefação referente à comunidade da amostra RIB5-M, com as porcentagens de dissimilaridade de 3%, 5%, 10%, 20%.....	45
Figura 19. Curva de rarefação referente à comunidade da amostra RIB4-S, com as porcentagens de dissimilaridade de 3%, 5%, 10%, 20%.....	46
Figura 20. Curva de rarefação referente à comunidade da amostra RIB5-S, com as porcentagens de dissimilaridade de 3%, 5%, 10%, 20%.....	46
Figura 21. Diagrama de Venn representando o número de OTUs (10%) exclusivas em cada um dos sedimentos, além das compartilhadas. O coeficiente de dissimilaridade adotado é 10%, correspondendo à classe.....	49

Figura 22. Diagrama de Venn representando o número de OTUs (5%) exclusivas em cada um dos sedimentos, além das compartilhadas. O coeficiente de dissimilaridade adotado é 5%, correspondendo à gênero.....	50
Figura 23. Diagrama de Venn representando o número de OTUs (3%) exclusivas em cada um dos sedimentos, além das compartilhadas. O coeficiente de dissimilaridade adotado é 3%, correspondendo à espécie.....	51
Figura 24. Gráfico de Análise das Principais Coordenadas (PCA) construído com o programa Unifrac (Lozupone et al., 2006), demonstrando o agrupamento dos sedimentos coletados.....	54
Figura 25. Árvore filogenética construída a partir dos representantes de cada OTU (3%) da amostra LRPA. A escala indica a distância da similaridade dos ramos.....	57
Figura 26. Árvore filogenética construída a partir dos representantes de cada OTU (3%) da amostra RIB4-M. A escala indica a distância da similaridade dos ramos.....	59
Figura 27. Árvore filogenética construída a partir dos representantes de cada OTU (3%) da amostra RIB5-M. A escala indica a distância da similaridade dos ramos.....	60
Figura 28. Árvore filogenética construída a partir dos representantes de cada OTU (3%) da amostra RIB4-S. A escala indica a distância da similaridade dos ramos.....	62
Figura 29. Árvore filogenética construída a partir dos representantes de cada OTU (3%) da amostra RIB5-S. A escala indica a distância da similaridade dos ramos.....	63

Tabela 1. Pares de iniciadores utilizados.....	21
Tabela 2. Condições dos ensaios de PCR.....	22
Tabela 3. Dados da coleta dos sedimentos utilizados.....	28
Tabela 4. Concentrações de DNA obtidas nos sedimentos amostrados.....	30
Tabela 5. Clones recombinantes obtidos após a transformação.....	34
Tabela 6. Gêneros de Euryarchaeota observados nos sedimentos coletados na Bacia Baixo Inhacica em ambas as estações.....	41
Tabela 7. Índices de riqueza (Ace e Chao) e diversidade (simpson e shannon) para o sedimento LRPA.....	44
Tabela 8. Quantidade de OTUs (3% de dissimilaridade) e singletons.....	44
Tabela 9. Índices de riqueza (Ace e Chao) e diversidade (simpson e shannon) para os sedimentos coletados na Bacia Baixo Inhacica.....	48
Tabela 10. Teste de hipótese Libshuff entre as amostras coletadas na seca e na estação de transição seca/chuvosa.....	53

Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução.....	3
2. Objetivos.....	5
2.1. Objetivo Geral	5
2.2. Objetivos Específicos	5
3. Referencial Teórico.....	6
3.1. Uso de ácidos nucleicos para estudos de filogenia e taxonomia	6
3.2. O Domínio Archaea.....	7
3.3. Sedimentos de lagoa.....	16
3.4. Microrganismos em Sedimentos de Lagoas	17
3.5. Sedimentos de lagoas do cerrado	18
4. Materiais e Métodos.....	20
4.1. Coleta dos sedimentos	20
4.2. Extração de DNA total e subsequente análise.....	21
4.3. Iniciadores utilizados e condições de PCR	21
4.4. Purificação e ligação dos fragmentos amplificados no vetor pGEM-T Easy.....	22
4.5. Preparo de células competentes de E. coli DH5 α e transformação por eletroporação	23
4.6. Preparo de células competentes de E. coli DH5 α e transformação por choque térmico	24
4.7. Seleção de clones recombinantes.....	25
4.8. Extração de DNA plasmidial (adaptado de Dagert e Ehrlich, 1979)	25
4.9. Quantificação de DNA	26
4.10. Sequenciamento de DNA	26
4.11. Análises de Bioinformática	26
5. Resultados e Discussão.....	28
5.1 Coleta dos sedimentos	28

5.2. Extração de DNA total	29
5.3. Amplificação por PCR de fragmentos de genes que codificam o rRNA 16S.....	30
5.4. Transformação de células de E. coli DH5 α e seleção de clones recombinantes	34
5.5. Extração de DNA Plasmidial.....	34
5.6 Sequenciamento e análises de bioinformática.....	36
5.6.1. Análise de qualidade das sequências	36
5.6.2. Alinhamento com o banco de dados <i>Ribosomal Database Project</i> (RDP)..	37
5.6.2.1 Lagoa Rio Preto Alto (LRPA) – 340f/1000r.....	38
5.6.2.2 Bacia Baixo Inhacica (RIB4 e RIB5) – 21f/958r	40
5.6.3. Análises de alfa-diversidade.....	41
5.6.3.1. Lagoa Rio Preto Alto (LRPA) – 340f/1000r.....	43
5.6.3.2. Bacia Baixo Inhacica (RIB4 e RIB5) – 21f/958r	44
5.6.4. Análises de beta-diversidade.....	52
5.6.5. Construção de árvores filogenéticas.....	55
6. Considerações finais.....	66
7. Conclusões.....	67
8. Perspectivas	68
Referências Bibliográficas	69
ANEXO I. Trabalhos apresentados em congresso.....	79

Resumo

O domínio *Archaea* possui características em comum com os domínios *Bacteria* e *Eukarya*, e ao mesmo tempo apresenta características próprias. Até o momento, são raros os estudos sobre a filogenia e diversidade de archaeas de ambientes naturais do Brasil e, por esta razão, este trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade de *Archaea* em sedimentos de lagoas do cerrado em diferentes estações, por meio da caracterização de genes de rRNA 16S. Amostras de sedimentos lacustres, coletadas em diferentes lagoas do Parque Nacional das Sempre Vivas, foram submetidas à extração de DNA total e o DNA foi utilizado em experimentos de PCR empregando os pares de iniciadores 340f/1000r ou 21f/958r, específicos para o domínio *Archaea*. Os fragmentos amplificados foram clonados em um vetor plasmidial e transformados em *E. coli*. O DNA plasmidial de clones recombinantes foi extraído, quantificado e submetido ao sequenciamento automático. Em uma das amostras, proveniente da Lagoa Rio Preto Alto (LRPA), observamos um grande predomínio de membros do filo Euryarchaeota, especialmente metanogênicos. Nos demais sedimentos, coletados na bacia Baixo Inhancica (RIB4 e RIB5) foi observado um predomínio de sequências do filo Thaumarchaeota sobre os filos Euryarchaeota e Crenarchaeota na estação seca, mas ainda foi possível observar sequências do filo Euryarchaeota. Na estação de transição seca/chuvosa, não foram encontradas sequências do filo Euryarchaeota e houve quase exclusivamente sequências do filo Thaumarchaeota. As estimativas de alfa-diversidade mostraram uma maior riqueza da comunidade de *Archaea* nos sedimentos coletados na estação seca e as curvas de rarefação indicaram que a amostragem dos ambientes foi adequada. As amostras de estações diferentes apresentaram diferenças significativas pelas técnicas de beta-diversidade J-Libshuff e gráfico de Análise de Componentes Principais (PCA).

Abstract

The *Archaea* domain has characteristics in common with the *Bacteria* and *Eukarya* domains, while presenting unique traits. Currently there are few studies on the phylogeny and diversity of *Archaea* in Brazilian environments; therefore, this study's objective is to estimate the diversity of *Archaea* communities in lake sediments of the Brazilian Savannah, Cerrado, in different seasons by rRNA 16S analysis. Lake sediment samples, obtained from different lakes in the park "Parque Nacional das Sempre Vivas", were submitted to DNA extraction, which was used in PCR assays using archaea-specific primers 340f/1000r or 21f/958r. The amplified fragments were cloned into *E. coli*. Plasmid DNA was extracted, quantified and submitted to standard sequencing procedures. In one of the samples, collected in the lake "Lagoa Rio Preto Alto" (LRPA), we were able to observe a high number of sequences affiliated to Euryarchaeota, especially methanogens. In the sediments collected in the Baixo Inhancica bay (RIB4 and RIB5), in the dry season members of the Thaumarchaeota phylum predominated over the other phyla. It was still possible to detect members of the Euryarchaeota phylum though. In the sediments collected in the transition period between the dry and rainy seasons we were not able to detect sequences affiliated to Euryarchaeota and there were almost exclusively sequences of the Thaumarchaeota phylum. The α -diversity estimates showed that the communities of Archaea in sediments collected in the dry season had higher richness and the non-parametric estimates showed that both the environments have been well sampled. There is a significant difference between the sediment samples collected in different seasons, shown by the statistical test χ^2 -Libshuff and by the Principal Component Analysis graphic (PCA).

1. Introdução

Desde a sua proposta por Woese (Woese *et al.*, 1990), o domínio *Archaea* levantou muitas questões na comunidade científica. Trata-se de um domínio da vida que apresenta características em comum com os domínios *Bacteria* e *Eukarya* e, ao mesmo tempo, apresenta características próprias. Apesar de ser considerado inicialmente um domínio de organismos de ambientes extremos, o domínio *Archaea* apresenta distribuição ubíqua (DeLong, 1998).

Várias metodologias podem ser utilizadas para a classificação de organismos procarióticos (Schleifer, 2009) e, como um grande número de archaeas ainda não foi cultivado em laboratório, o uso de técnicas de biologia molecular se mostra útil para estimar a diversidade desses organismos (Rondon *et al.*, 2000). O uso de análise de genes que codificam o rRNA 16S é eficaz para análises primárias de uma comunidade ambiental devido ao fato de se tratarem de genes extremamente conservados (Fox *et al.*, 1977; Olsen *et al.*, 1986).

Embora o número de estudos sobre o domínio *Archaea* tenha aumentado nos últimos anos, são ainda raros os estudos acerca da diversidade e filogenia destes organismos em ambientes brasileiros. O conhecimento sobre a riqueza e distribuição de microrganismos é de extrema importância para um melhor entendimento das relações ecológicas entre os organismos de um ecossistema, assim como o funcionamento de ciclos biogeoquímicos como o do nitrogênio e do carbono (Madigan *et al.*, 2010).

Sedimentos de lagoa apresentam uma alta quantidade de microrganismos (Esteves, 2011). Embora existam trabalhos científicos que descrevem a diversidade de *Archaea* em sedimentos de lagoa (Lovley *et al.*, 1983; Conrad *et al.*, 1985; Vetriani *et al.*, 1999; Antony *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012), poucos são os estudos que analisam as mudanças nessas comunidades relacionadas à variações ambientais. Sabe-se que diversos fatores ambientais, dentre eles a chuva, causam perturbações na água da lagoa e afetam assim a composição nutricional do sedimento (Wetzel, 2001). Será que essas mudanças afetam a comunidade de *Archaea*?

Com este questionamento em mente, esta dissertação de mestrado tem como objetivo analisar a presença de membros do domínio *Archaea* em sedimentos de lagoas do bioma Cerrado, nas épocas de seca e de transição para a chuvosa, por meio da caracterização de fragmentos de genes de rRNA 16S.

Os sedimentos foram coletados no Parque Nacional das Sempre Vivas localizado na Serra do Espinhaço no estado de Minas Gerais, Brasil. Houve coletas em diferentes estações, de forma que foram coletados sedimentos da bacia Baixo Inhancica (RIB4 e RIB5) e da Lagoa Rio Preto Alto (LRPA). O presente trabalho se insere no projeto “Avaliação da ocorrência e diversidade de *Archaea* em ambientes aquáticos do Cerrado no Distrito Federal e Entorno”, coordenado pela professora Cynthia Kyaw.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Analisar a ocorrência de membros do domínio *Archaea* em sedimentos de lagoas do cerrado.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar a presença de archaeas em sedimentos de lagoas do cerrado, com relação à diversidade e filogenia.
- Analisar o possível efeito da chuva na comunidade de archaeas em sedimentos de lagoas do cerrado.

3. Referencial Teórico

3.1. Uso de ácidos nucleicos para estudos de filogenia e taxonomia

Em 1969 foi proposta a classificação dos seres vivos em cinco reinos (Whittaker, 1969), baseada em aspectos estruturais, morfológicos e fisiológicos. No entanto, a diferenciação dos seres vivos ocorria sem se levar em conta o material genético, de forma que as relações filogenéticas entre os organismos não ficavam claras. Em 1965 foi postulado que o genoma de um organismo poderia ser considerado o principal registro de sua história evolutiva (Zuckerlandl e Pauling, 1965). A ideia de que o genoma de um organismo continha sua história evolutiva era bastante interessante para a microbiologia, uma vez que, até a segunda metade do século XX, o estudo das relações filogenéticas era considerado impossível para microrganismos (Schleifer, 2009).

A taxonomia de procariotos teve início com os trabalhos de Ferdinand Cohn, no final do século XIX. Este pesquisador caracterizou seis gêneros de bactérias como membros do grupo das plantas, a partir de análises morfológicas. No início do século XX, parâmetros fisiológicos e bioquímicos começaram a serem utilizados para classificação de microrganismos (Schleifer, 2009). No entanto, esses métodos, de forma similar aos empregados por Whittaker, não se mostravam eficientes para o estudo da história evolutiva.

Um trabalho importante para o estudo molecular de relações filogenéticas foi o de Zuckerlandl e Pauling, de 1965. Segundo este estudo, o fato de diferentes códonos poderem ser traduzidos em um mesmo resíduo de aminoácido em um polipeptídeo leva a variações nas sequências genéticas não observadas nas sequências de aminoácidos. Dessa maneira, o material genético carrega mais informações filogenéticas, sendo mais indicado para esse tipo de estudo. Assim, um importante marcador molecular para estudos de filogenia foi o rRNA. A escolha dessa molécula ocorreu devido a uma série de razões. Primeiramente, genes de rRNA 16S ou 18S são encontrados em todos os organismos, possuindo homologia funcional e evolutiva. Além disso, a presença de regiões conservadas e variáveis no gene que codifica o rRNA 16S

contribuiu para a sua escolha nesses estudos devido ao fato de ser possível observar as variações nas sequências de DNA a partir do alinhamento das seções conservadas. O gene que codifica o rRNA 16S também é pouco susceptível a eventos de transferência horizontal de genes, o que contribuiu para sua escolha como marcador filogenético (Fox *et al.*, 1977; Olsen *et al.*, 1986). A partir de estudos utilizando essa abordagem, Woese e Fox propuseram, em 1977, que os procariotos fossem divididos em dois reinos distintos: Eubacteria e Archaeobacteria.

3.2. O Domínio *Archaea*

A partir dos resultados obtidos nas análises comparativas de sequências de rRNA 16S de bactérias bastante conhecidas com aquelas de um grupo de bactérias ainda pouco caracterizado, as bactérias metanogênicas, Woese e Fox propuseram, em 1977, que os procariotos fossem divididos em dois reinos. Nesta divisão, o reino Eubacteria seria composto pelas bactérias já bem conhecidas, enquanto o reino Archaeobacteria seria composto pelas bactérias metanogênicas. Essa denominação foi adotada pelo fato dos organismos metanogênicos serem considerados, à época, organismos ancestrais de bactérias. No entanto, estudos posteriores revelaram que as chamadas archaeobactérias apresentavam características distintas daquelas encontradas em bactérias e eucariotos.

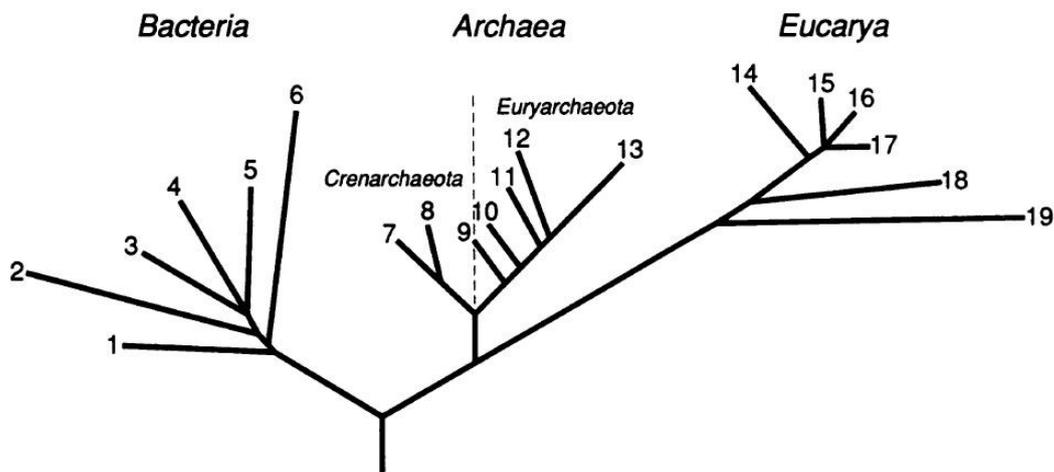


Figura 1. Árvore filogenética universal, na qual é possível observar o posicionamento filogenético dos três domínios da vida (Woese *et al.*, 1990).

Assim, Woese e colaboradores propuseram, em 1990, que os seres vivos fossem divididos em três domínios da vida: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* (Woese *et al.*, 1990). O nome archaeobacteria foi abandonado, sendo substituído pelo termo *Archaea*. Essa mudança ocorreu devido a análises comparativas de rRNAs 16S e 18S que revelaram que o domínio *Archaea* não consistia em um grupo ancestral de bactérias, mas sim de organismos procarióticos bastante relacionados com o domínio *Eukarya* (Figura 1).

O domínio *Archaea* se assemelha ao domínio *Eukarya* no que diz respeito aos genes informacionais, associados à replicação, transcrição e tradução. No entanto, os genes operacionais, envolvidos em vias metabólicas, são mais similares ao domínio *Bacteria* (Rivera *et al.*, 1998). Além dessas e outras características comuns com os outros dois domínios, o domínio *Archaea* também apresenta características únicas. Dentre essas podemos citar os lipídeos de membrana. Os lipídeos encontrados nas membranas de *Archaea* são bastante diferentes dos encontrados nas membranas bacterianas e eucarióticas. Em eucariotos e bactérias, os ácidos graxos são ligados a uma molécula de glicerol-3-fosfato por uma ligação do tipo éster. Em archaeas, não existem cadeias de ácidos graxos, mas sim cadeias laterais de hidrocarbonetos que se ligam a uma molécula de glicerol-1-fosfato por uma ligação do tipo éter (Kates *et al.*, 1993). Outra característica particular de archaea é a presença de monocamadas lipídicas, além das bicamadas, especialmente em membros hipertermófilos. Quando ocorrem as monocamadas, a fluidez é modulada por meio da ciclização de determinados componentes da cadeia lateral de hidrocarboneto (DeRosa *et al.*, 1991).

A composição e estrutura da parede celular são extremamente variáveis em *Archaea* (Figura 2) e, diferentemente de bactérias, não apresentam peptidoglicano. Algumas *Archaea* possuem pseudomureína, uma estrutura similar ao peptidoglicano. No entanto, diferentemente do que ocorre no peptidoglicano, a pseudomureína é composta de ácido N-acetilalosaminurônico e a ligação entre os açúcares da cadeia é do tipo β -1,3. Além disso, não há D-aminoácidos na porção peptídica da molécula (Kandler e Koenig, 1993). Além da pseudomureína, a metanocondroitina também pode compor a parede celular de algumas *Archaea*. Esta é um polímero de quatro açúcares, composto por sulfato de condroitina (Kreisl e Kandler, 1986). Existem

ainda organismos desse domínio que apresentam membrana externa (gênero *Ignicoccus*), polímeros de glutaminilglicano, heteropolissacarídeos sulfatados, dentre outros (Albers e Meyer, 2011). Muitas *Archaea* apresentam ainda uma camada protéica adicional na parede celular, denominada camada S. Essa camada é geralmente composta de uma única espécie de proteína ou glicoproteína com uma massa molecular variando entre 40 a 200 kDa, estando frequentemente associada à membrana citoplasmática (Sara e Sleytr, 1996). Uma característica interessante das proteínas da camada S é a sua habilidade de se agrupar em arranjos cristalinos bidimensionais. Os arranjos cristalinos possuem conformações com diferentes simetrias, mas a hexagonal é a simetria predominante em camadas S de *Archaea* (Albers e Meyer, 2011).

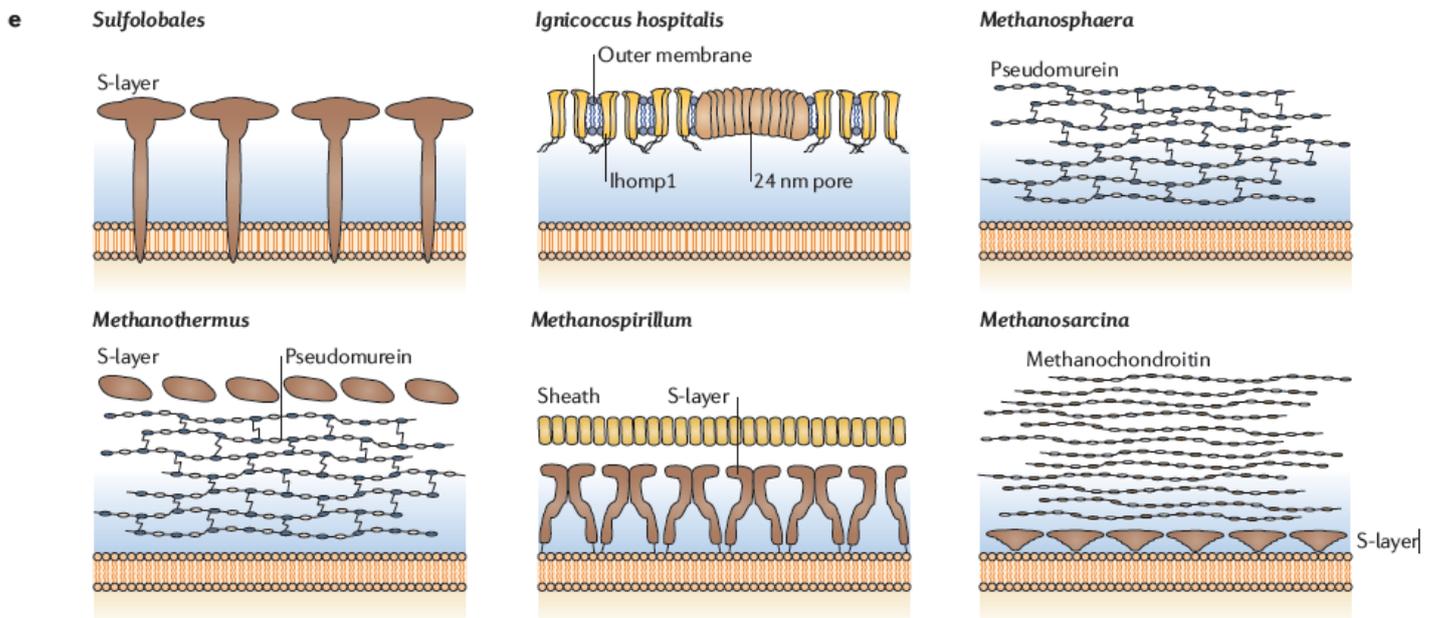


Figura 2. Esquema dos diferentes tipos de parede celular encontrados em *Archaea* (Albers e Meyer, 2011).

Como mencionado anteriormente, os mecanismos de replicação, transcrição e tradução em *Archaea* se assemelham aos do domínio *Eukarya*, mas de forma a não excluir algumas similaridades com *Bacteria*. O empacotamento de moléculas longas de DNA depende de um superenovelamento que, em *Bacteria*, ocorre através de uma DNA girase, enquanto em eucariotos o DNA é enovelado ao redor de histonas (Alberts et

al., 2004). Algumas Archaea possuem tanto a DNA girase, como proteínas análogas a histonas (Bernander, 2000).

O cromossomo de *Archaea* é circular e a replicação ocorre de forma bidirecional, o que é bastante semelhante ao observado em bactérias. No entanto, a maquinaria de replicação de DNA em *Archaea* se assemelha mais àquela encontrada em eucariotos. A presença de múltiplas origens de replicação, comum em eucariotos, também ocorre em archaeas. Em eucariotos, a DNA helicase e o complexo de reconhecimento da origem (ORC) são compostos complexos com múltiplas subunidades diferentes. Em *Archaea*, se observa complexos equivalentes, mas formados por uma única proteína. Por exemplo, a helicase eucariótica é formada por anéis que consistem em seis diferentes subunidades, enquanto em *Archaea* temos anéis contendo seis subunidades idênticas (Barry e Bell, 2006).

Além disso, é possível encontrar pelo menos três maquinarias de divisão celular neste domínio: o sistema FtsZ, similar ao encontrado em bactérias, proteínas homólogas ao sistema ESCRT-III de eucariotos e um sistema que utiliza proteínas similares à actina. A distribuição das diferentes maquinarias nos diferentes grupos de *Archaea* ocorre de forma que é possível observar organismos com genes para todos esses sistemas, ou para apenas alguns (Makarova *et al.*, 2010).

No caso da transcrição, a sequência de promotores, a estrutura e a atividade da RNA polimerase em *Archaea* se assemelha a eucariotos. A RNA polimerase de archaeas é semelhante à RNA polimerase II de eucariotos. No entanto, se observa apenas oito subunidades na RNA polimerase de archaeas, enquanto que a RNA polimerase II de eucariotos apresenta doze ou mais subunidades. Três elementos são críticos no reconhecimento do promotor em *Archaea*: o elemento iniciador (INIT), o TATA Box e o elemento B de reconhecimento (BRE). A proteína de ligação ao TATA (TBP) liga-se ao *TATA Box*, e em seguida o fator de transcrição B (TFB) liga-se a BRE e INIT. Uma vez TBP e TFB posicionados, ocorre a ligação da RNA polimerase e o início da transcrição. A regulação da transcrição em *Archaea* pode ocorrer por mecanismos similares aos encontrados em bactérias, mas também por meio da oclusão de promotores por proteínas análogas a histonas e a necessidade de determinadas proteínas, como Ptr 28, para que o processo ocorra. Além disso,

existem diferentes tipos de TBP e TFB, de forma que, dependendo dos tipos de proteínas envolvidas na ligação do promotor à RNA polimerase, a ligação pode ser mais forte ou mais fraca. Isso também atua como um mecanismo de regulação da transcrição (Grohmann e Werner, 2011).

Os ribossomos de *Archaea* exibem coeficiente de sedimentação 70S, como observado para bactérias. No entanto, apresentam composição proteica distinta. A tradução requer não apenas um ribossomo funcional, mas uma série de fatores traducionais. *Eukarya* e *Archaea* apresentam um número de fatores traducionais muito maior que o observado em *Bacteria*. Em eucariotos, esses fatores apresentam mais subunidades que em archaeas, mas apresentam um alto grau de homologia. No entanto, o mecanismo de síntese de proteínas em *Archaea* apresenta características em comum tanto com bactérias como com eucariotos. Os ribossomos de bactérias e archaeas reconhecem o mRNA por meio de seqüências de Shine-Dalgarno, inexistentes em eucariotos. Uma característica comum a eucariotos e *Archaea* consiste na inserção da metionina como primeiro aminoácido na tradução, enquanto em bactérias ocorre a inserção de N-formilmetionina (Dennis, 1997).

O domínio *Archaea* é dividido em dois filos formalmente aceitos: Euryarchaeota e Crenarchaeota (Woese *et al.*, 1990). O filo Euryarchaeota contém organismos com fisiologias bastante distintas. Neste filo são encontrados organismos metanogênicos, halófilos, redutores de sulfato, além de outros hipertermófilos. Os metanogênicos são anaeróbicos estritos e seu metabolismo é único, utilizando o carbono como acceptor final de elétrons. Durante o processo de obtenção de energia, estes organismos liberam metano como um dos seus produtos (Thauer, 1998). Dentre os halófilos, existem representantes extremos que habitam lagos ricos em carbonato de sódio, ambientes caracterizados por altas concentrações de sal e extremos de pH. O filo Crenarchaeota apresenta muitos organismos hipertermófilos. A maioria desses organismos é anaeróbia e vários utilizam o hidrogênio gasoso como fonte de energia. Esse filo foi inicialmente considerado mais ancestral, apresentando um fenótipo mais homogêneo do que o observado para o filo Euryarchaeota (Woese *et al.*, 1990; Madigan *et al.*, 2010).

Existem, no entanto, propostas para a criação de filos adicionais, tais como: Korarchaeota (Barns *et al.*, 1996), Nanoarchaeota (Huber *et al.*, 2002),

Thaumarchaeota (Bochier-Armanet *et al.*, 2008), Aigarchaeota (Nunoura *et al.*, 2011) e Geoarchaeota (Kozubal *et al.*, 2012).

O filo Korarchaeota foi descrito principalmente a partir de sequências de genes do rRNA 16S, obtidas inicialmente de fontes hidrotermais do Parque Nacional de Yellowstone, EUA. Após a análise dessas sequências, foi possível concluir que os organismos encontrados não pertenciam ao filo Euryarchaeota ou ao filo Crenarchaeota, situando-se em uma posição mais basal na árvore filogenética. Isso levou à proposição deste novo filo (Barns *et al.*, 1996; Auchtung, 2006; Takacs-Vesbach *et al.*, 2006). Embora até o momento não tenha sido descrito o cultivo de um membro deste filo em meios artificiais, recentemente, foi descrito o genoma completo de um membro deste novo filo, *Korarchaeum cryptofilum* (Elkins *et al.*, 2008).

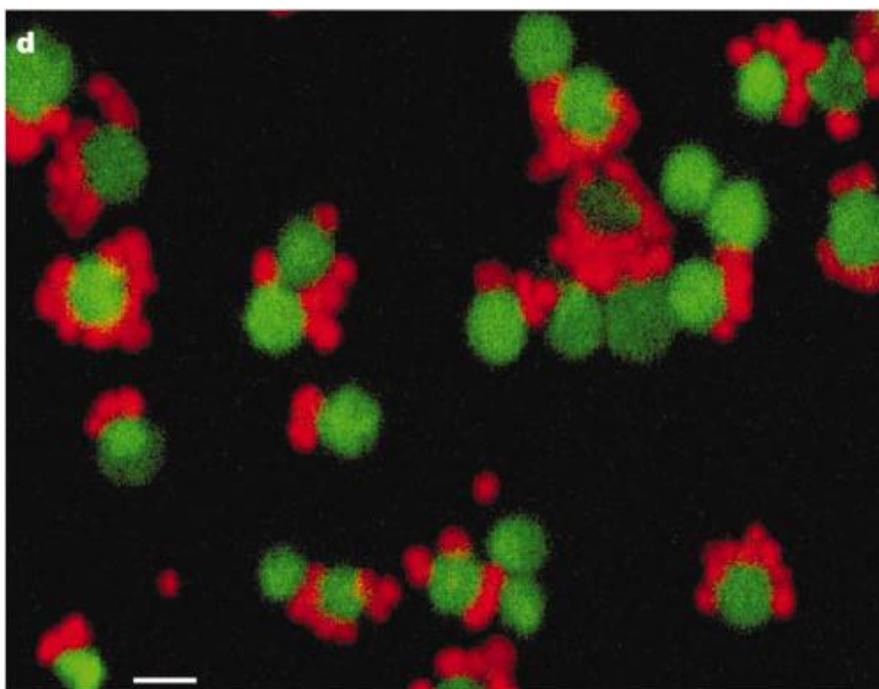


Figura 3. Microscopia de fluorescência após hibridização com sondas específicas, indicando a associação entre *Nanoarchaeum equitans* (vermelho) e *Ignicoccus hospitalis* (verde) (Huber *et al.*, 2002).

O filo Nanoarchaeota foi descrito a partir de um organismo isolado de uma fenda hidrotermal na Islândia. Esse organismo foi denominado *Nanoarchaeum equitans* e encontra-se em uma forte associação com outra archaea: *Ignicoccus hospitalis* (Figura 3). Os genes de rRNA 16S dessa archaea não eram amplificados por experimentos de PCR utilizando-se

iniciadores considerados universais para *Archaea*. Além disso, *Nanoarchaeum equitans* apresentava células muito pequenas (diâmetro de 400 nm), e não exibia crescimento na ausência de *Ignicoccus hospitalis*. Devido a essas características, o filo Nanoarchaeota foi proposto (Huber *et al.*, 2002). Alguns anos depois, por meio de análise comparativa da sequência de proteínas ribossomais, foi sugerido que esses organismos não constituiriam um novo filo, sendo novo grupo pertencente ao filo Euryarchaeota (Brochier *et al.*, 2005).

Archaeas oxidantes de amônia são abundantes na Terra. Inicialmente, ao se analisar sequências do gene do rRNA 16S, esses organismos foram considerados como membros do filo Crenarchaeota. No entanto, a análise de genomas completos desses organismos levou à proposta de um novo filo: Thaumarchaeota (Brochier-Armanet *et al.*, 2008; Spang, Hatzenpichler *et al.*, 2010). Assim, membros mesófilos do grupo I de Crenarchaeota fazem parte, segundo essa proposta, do filo Thaumarchaeota. Inicialmente, acreditava-se que esse filo consistia exclusivamente em organismos mesófilos oxidantes de amônia. No entanto, a partir da identificação de organismos não oxidantes de amônia que também foram classificados neste novo filo, atualmente considera-se que a similaridade entre as proteínas ribossomais seja a principal característica comum aos membros de Thaumarchaeota (Brochier-Armanet *et al.*, 2011).

Em 2011, foi proposto um outro filo, denominado Aigarchaeota (Nunoura *et al.*, 2011), a partir da caracterização de organismos termófilos, isolados de uma mina de ouro, com características similares ao filo Crenarchaeota. Tais organismos foram inicialmente classificados como *Hot Water Crenarchaeotic Group I* (HWCGI) (Nunoura *et al.*, 2005). No entanto, a construção de bibliotecas genômicas a partir de uma amostra ambiental de uma fonte geotermal resultou na montagem do genoma de um representante desse grupo: *Candidatus Caldiarchaeum subterraneum*. A análise desse genoma revelou a presença de um sistema do tipo ubiquitina, similar ao encontrado em eucariotos. Por esta razão, um novo filo - Aigarchaeota, foi proposto (Nunoura *et al.*, 2011), embora existam controvérsias em relação a essa proposta. Análises realizadas recentemente sugerem que este genoma pertença ao filo Thaumarchaeota, devido à presença de características desse filo no genoma de Aigarchaeota e seu posicionamento na base do ramo do filo

Thaumarchaeota em árvores filogenéticas construídas com proteínas ribossomais. (Brochier-Armanet *et al.*, 2011).

Um estudo recente propôs ainda a criação de outro novo filo de *Archaea*, o Geoarchaeota (Kozubal *et al.*, 2012). Estudos de comunidades microbianas encontradas em regiões com óxidos férricos do Parque Nacional Yellowstone revelaram uma quantidade considerável de archaeas ainda não descritas. No estudo mencionado, foram feitas análises de trechos ribossomais conservados e genes de processamento informacional, de maneira que não houve alinhamento desses organismos com nenhum outro filo. Desta maneira, foi feita a proposta do filo Geoarchaeota.

Tendo em vista o exposto, uma árvore filogenética atual e universal para *Archaea* é um tema ainda sujeito a amplas discussões. A Figura 4 apresenta uma proposta recente para uma árvore filogenética de *Archaea*, baseada na similaridade de várias sequências de proteínas ribossomais alinhadas.

Apesar de serem inicialmente considerados organismos exclusivos de ambientes extremos, archaeas são organismos ubíquos (DeLong, 1998). Existem estudos que detectaram representantes do domínio *Archaea* na cavidade oral humana (Belay *et al.*, 1988; Kulik *et al.*, 2001), intestino (Leep *et al.*, 2004), ambientes marinhos costeiros (Fuhrman *et al.* 1992; DeLong, 1992), solos (Kemnitz *et al.*, 2007; Timonen, 2009), lagos de água doce (Llirós *et al.*, 2008) e sedimentos (Briée *et al.*, 2007).

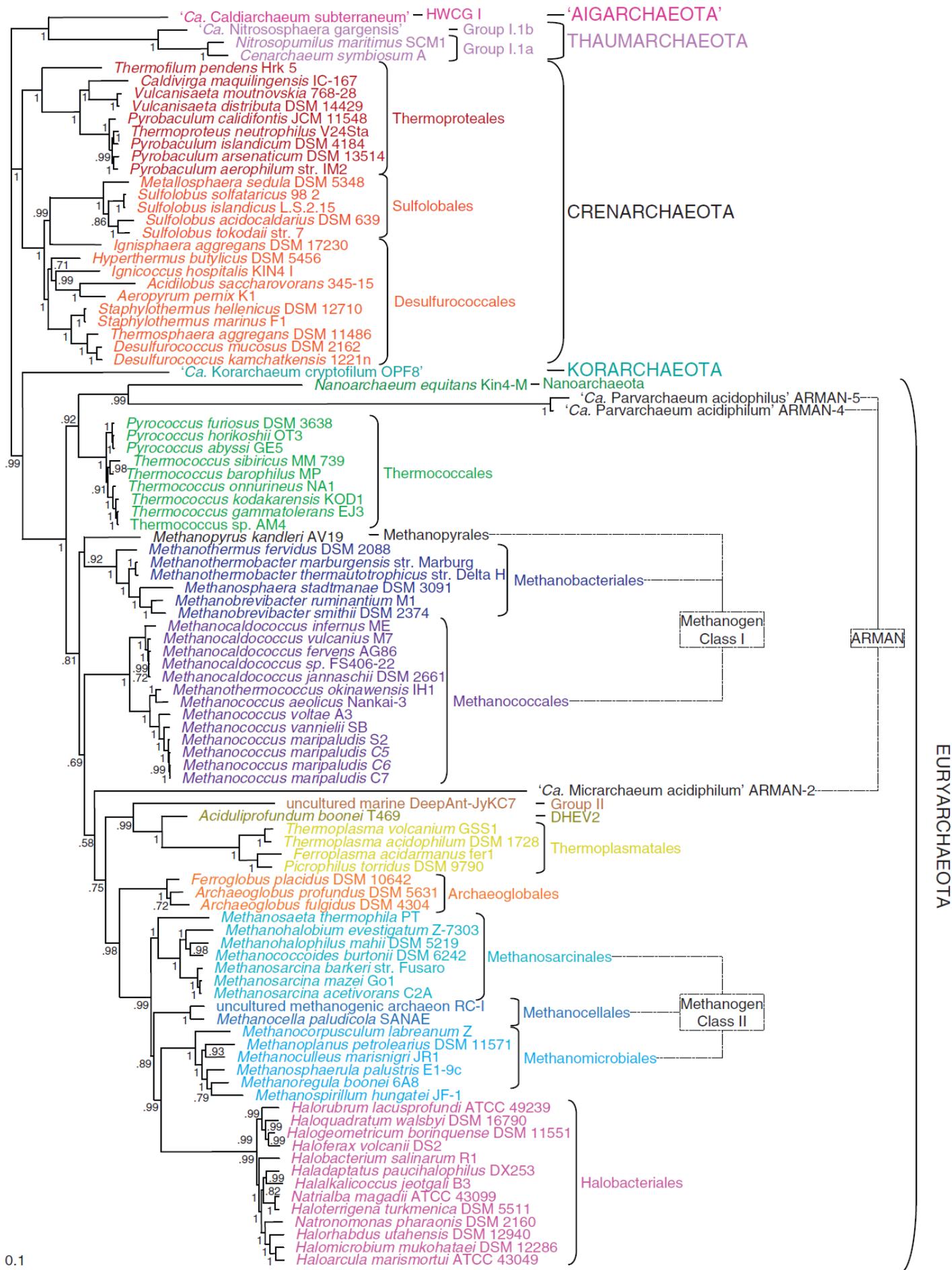


Figura 4. Árvore filogenética de *Archaea* baseada no alinhamento de proteínas ribossômicas, englobando os filos aceitos formalmente e atualmente propostos (Brochier-Armanet *et al.*, 2011).

3.3. Sedimentos de lagoa

Na maioria dos sedimentos límnicos distinguem-se duas camadas: a recente ou biológica, e a permanente. A camada recente é a parte do sedimento que está em contato direto com a água. Geralmente apresenta maior concentração de matéria orgânica, densidade de organismos bentônicos e atividade microbiana (Thomaz, 2001). A camada permanente localiza-se abaixo da recente e é caracterizada por um baixo teor de matéria orgânica e por uma condição de completa anaerobiose. Apresenta também textura mais rígida, sendo habitada quase que exclusivamente por microrganismos (Esteves, 2011).

Ambas as camadas são compostas por duas frações: a fração particulada e a fração dissolvida. A fração particulada constitui a principal fonte de energia para o crescimento de microrganismos. A fração dissolvida na água apresenta grande importância para o ecossistema aquático. Isso ocorre porque o ambiente aquático sofre um constante enriquecimento de nutrientes, que se difundem para os sedimentos a partir de perturbações na água da lagoa (Esteves, 2011). Já foi possível observar que a concentração de nutrientes na água dissolvida no sedimento é maior do que na água da lagoa (Furtado *et al.*, 2002).

O aumento na composição nutricional em sedimentos de lagoa está associado à ressuspensão e re-deposição da superfície do sedimento causadas por correntes de água. A ressuspensão pode ocorrer durante uma contínua perturbação na água, que leva à mistura e infiltração da água do lago até o fundo do sedimento. As causas ambientais dessa perturbação variam bastante, podendo ser associadas a fatores biológicos, como a presença de determinados organismos na região. Entre os fatores não biológicos, podemos citar a ocorrência de chuvas. Esse processo ocorre tanto em sedimentos de região profunda como em sedimentos próximos a superfície (Wetzel, 2001).

A ressuspensão e re-deposição podem ser causadas tanto pela presença de fatores do próprio ambiente aquático quanto perturbações na superfície da água (Gloor *et al.*, 1994). O fluxo de nutrientes decorrente da ressuspensão da superfície do sedimento favorece a atividade metabólica de diversos grupos de microrganismos (Wetzel, 2001).

3.4. Microrganismos em Sedimentos de Lagoas

A decomposição da matéria orgânica apresenta papel importante na reciclagem de moléculas complexas em moléculas menores, como CO₂ e CH₄. Em condições anaeróbicas, a matéria orgânica é hidrolisada e fermentada, de forma que os produtos da fermentação são convertidos em H₂, acetato e outras moléculas pequenas (Sansone e Martens, 1982).

Em sedimentos, onde aceptores de elétrons além do CO₂ não estão disponíveis, o consumo subsequente de H₂ é mediado por archaeas metanogênicas e bactérias acetogênicas. O acetato produzido por fermentação ou acetogênese atua como substrato importante para uma grande variedade de microrganismos (inclusive como substrato para a metanogênese), devido ao seu papel central no ciclo do carbono. Como em sedimentos de lagoas a quantidade de H₂ disponível é baixa, populações de microrganismos consumirão o H₂, promovendo a competição entre populações acetogênicas e metanogênicas pelo H₂ (Heuer *et al.* 2010).

Como a redução metanogênica do CO₂ é termodinamicamente mais favorável que a redução acetogênica, se espera que os organismos metanogênicos sejam favorecidos na competição pelo H₂. No entanto, em sedimentos naturais os processos não são influenciados apenas pelo favorecimento termodinâmico. Outros fatores, tais como a temperatura, exercem efeitos que influenciam os processos bioquímicos e apresentam efeitos na comunidade microbiana (Hoehler *et al.*, 2002). Além da metanogênese, ocorrem processos de oxidação do carbono orgânico, fermentação, redução de sulfato, nitrato, entre outros metabolismos de origem microbiana (Esteves, 2011).

É comum se encontrar uma alta incidência de membros do domínio *Archaea* em sedimentos de lagoa, especialmente representantes metanogênicos (Lovley *et al.*, 1983; Conrad *et al.*, 1985; Vetriani *et al.*, 1999; Antony *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012). De acordo com dados da literatura, são ainda poucos os estudos sobre a diversidade de archaeas em sedimentos de lagoas realizados no Brasil e não existem estudos sobre esse assunto a partir de sedimentos de lagoas do Cerrado.

3.5. Sedimentos de lagoas do cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, sendo menor apenas que a Floresta Amazônica (Oliveira e Marquis, 2002). O Cerrado, localizado principalmente na região central do Brasil (Figura 5), corresponde a 24% da área do país, ocorrendo em 11 estados (Walter *et al.*, 2008). Esse bioma é do tipo biócoro savana e apresenta uma precipitação média de 1100 a 1600 mm. É possível observar a presença de duas estações bem definidas: estação seca, de maio a setembro, e chuvosa, de outubro a abril (Eiten, 1972).



Figura 5. Mapa esquemático do Brasil indicando os biomas brasileiros. O cerrado ocupa a região central. (http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169).

Existem poucos estudos sobre sedimentos de lagoas do cerrado. O único estudo encontrado sobre esse assunto foi realizado por Zardo e colaboradores, em 2011. Esse estudo caracterizou a composição físico-química de um sedimento da micro-bacia do córrego Samambaia, localizado no Mato Grosso.

No estudo citado, foi observada uma alta acidez nas amostras de sedimento, se assemelhando às condições geralmente encontradas em solos do cerrado. Um aspecto discutido pelo grupo como provável fator que promoveu o baixo pH consiste na decomposição de matéria orgânica. Além disso, esse estudo detectou altos teores de Ca e Mg que, em conjunto com alto teor de alumínio, seriam determinantes para o pH encontrado.

O pequeno número de estudos sobre o domínio *Archaea* em ambientes brasileiros, em conjunto com o baixo número de estudos sobre estes organismos em sedimentos de lagoas, levou-nos a realizar o presente trabalho.

4. Materiais e Métodos

4.1. Coleta dos sedimentos

Os sedimentos foram coletados em duas estações: seca e transição seca/chuvosa. Os sedimentos da estação seca foram coletados em 5 e 7 de maio de 2010 e os da estação de transição foram coletados em 13 de setembro de 2010. A coleta ocorreu em diferentes pontos de lagoas do Parque Nacional das Sempre Vivas localizado na Serra do Espinhaço, nos municípios de Olhos d'Água, Diamantina, Curimataí e Bocaiúva, no estado de Minas Gerais, Brasil. O parque possui uma área de 124.555 ha e um perímetro de 169.069,291 metros. A coleta foi feita pelo grupo da professora Mercedes Bustamante, do departamento de Ecologia da Universidade de Brasília, e as amostras foram gentilmente cedidas para a realização deste trabalho.

A coleta foi realizada utilizando-se tubos de PVC com 10 cm de diâmetro, na proximidade da margem, estando os sedimentos submersos em ambas as estações. O tubo foi introduzido no sedimento a uma profundidade de 5 a 10 cm, dependendo da compactação e da estrutura do sedimento. O sedimento foi mantido em gelo e estocado à -20°C.

Os sedimentos utilizados foram coletados na Lagoa Rio Preto Alto (LRPA), localizada na bacia Preto Altitude, e na bacia “Baixo Inhacica” (RIB4 e RIB5). Os sedimentos utilizados para o estudo da influencia da estação na comunidade foram RIB4 (-17,77117; -43,62654) e RIB5 (-17,77125; -43,62665). Estes sedimentos foram coletados na mesma lagoa com uma distância de aproximadamente 15 metros, sendo, portanto, considerados réplicas (Figura 6).



Figura 6. Imagem de satélite indicando os pontos de coleta dos sedimentos RIB4 e RIB5, obtida utilizando-se o programa *Google Earth*™.

4.2. Extração de DNA total e subsequente análise

A extração de DNA dos sedimentos foi feita utilizando-se o *PowerSoil DNA Isolation Kit* (MO Bio Laboratories Inc.), segundo as instruções do fabricante. Utilizamos 0,5 g de sedimento para a extração e, em seguida, o DNA resultante foi avaliado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (concentração estoque 10 mg/ml) e quantificado em espectrofotômetro NanoVue™.

4.3. Iniciadores utilizados e condições de PCR

Utilizamos os seguintes pares de iniciadores universais para o domínio *Archaea*: 340f e 1000r (Gantner *et al.*, 2011); 21f e 958r (DeLong, 1992). Ambos os pares tem como alvo genes de rRNA 16S. O tamanho do fragmento esperado para o par 340f/1000r é de 660 pares de bases e o esperado para o par 21f/958r é de 937 pares de bases (Tabela 1).

Tabela 1. Pares de iniciadores utilizados

Iniciador	Sequência	Tm
340f	5' - CCC TAY GGG GYG CAS CAG -3'	61,3°C
1000r	5' - GGC CAT GCA CYW CYT CTC -3'	57,0°C
21f	5' - TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA - 3'	52,6°C
958r	5' - YCC GGC GTT GAM TCC AAT T - 3'	56,6°C

*Y: pirimidina; S: guanina ou citosina ; W: adenina ou timina; M: adenina ou citosina.

Os ensaios de PCR foram realizados em sistemas com volume final de 50 µL. O DNA extraído dos sedimentos foi diluído previamente para que houvesse 2,5 ng de DNA por reação no caso dos iniciadores 340f e 1000r. Para os iniciadores 21f e 958r, a diluição ocorreu de forma que houvesse 5 ng de DNA por reação.

As concentrações finais dos reagentes utilizados na reação de PCR para os iniciadores 340f/1000r foram as seguintes: 1 X de tampão de reação (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mg/L de soroalbumina bovina (BSA), 0,5 µM de iniciador 340f, 0,5 µM de iniciador 1000r, 0,8 mM de dNTPs e 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). Para o par de iniciadores 21f/958r, as concentrações finais foram as seguintes: 1 X de tampão de reação (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 400 ng/µl de soroalbumina bovina (BSA), 0,5 µM de iniciador

21f, 0,5 μ M de iniciador 958r, 200 μ M de dNTPs, 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen).

Os ensaios de PCR foram realizados em um termociclador MJ Research PTC-100 (Peltier Thermal Cycles), utilizando-se as condições descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições dos ensaios de PCR

	340f/1000r	21f/958r
1	Desnaturação a 98°C/2 minutos	Desnaturação a 94°C/1 minuto
2	Desnaturação a 95°C/30 segundos	Desnaturação a 94°C/1 minuto
3	Anelamento a 57°C/30 segundos	Anelamento a 55°C/1 minuto
4	Extensão a 72°C/1,30 minutos	Extensão a 72°C/1,30 minutos
5	Repetição dos passos 2-4/29 vezes	Repetição dos passos 2-4/29 vezes
6	Extensão final a 72°C/7 minutos	Extensão final a 72°C/5 minutos
7	Manutenção a 4°C	Manutenção a 4°C

Nos experimentos de PCR realizados foi utilizado como controle negativo um tubo onde se adicionou água em substituição ao DNA. Os produtos resultantes da amplificação foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10 mg/ml). O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado com auxílio de marcadores de massa molecular *1kb DNA ladder* (Invitrogen ou Promega).

4.4. Purificação e ligação dos fragmentos amplificados no vetor

pGEM-T Easy

Os fragmentos amplificados obtidos nos ensaios de PCR foram purificados utilizando-se o kit Wizard ([®]SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega), conforme as instruções do fabricante. Após a purificação, os fragmentos foram ligados ao vetor pGEM T easy[®] (Promega), novamente conforme as instruções do fabricante. O sistema de ligação foi mantido por 1 hora à temperatura ambiente e em seguida armazenado a 10°C por uma noite.

4.5. Preparo de células competentes de *E. coli* DH5 α e transformação por eletroporação

Células de *E. coli* DH5 α foram inoculadas em 10 mL de meio de cultura Luria Bertani (LB) e incubadas à 37°C por uma noite. Alíquotas de 5 mL deste inoculo foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo 200 mL de meio LB. Em seguida, os frascos foram incubados a 37°C, sob agitação de 220 RPM, até a cultura atingir uma densidade óptica (OD₆₀₀) de 0,4. Quando a densidade óptica desejada foi atingida, os frascos foram mantidos em gelo por 20 minutos. Em seguida, os frascos foram centrifugados a 1180 *g* por 20 minutos, a 4°C (condições de centrifugação utilizadas ao longo de todo o protocolo). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspensão em 50 mL de H₂O Mili-Q gelada, com adição posterior de 150 mL de H₂O Mili-Q gelada. Após uma segunda centrifugação sob as mesmas condições, o sedimento de células foi ressuspensão em 50 mL de glicerol 10% gelado. Em seguida, ocorreu adição de 50 mL de glicerol 10% gelado e uma nova centrifugação. Os sedimentos foram ressuspensos em 5 mL de glicerol 10% gelado, reunidos e transferidos para um tubo Falcon, previamente resfriado. O sistema foi novamente centrifugado, e o sedimento final foi ressuspensão em 1 mL de glicerol 10% gelado. Uma alíquota de 10 μ L foi diluída 1:100 e a concentração de células foi avaliada em espectrofotômetro, sendo então corrigida para um valor final de 2 a 3 x 10¹⁰ células/mL. Foram preparadas alíquotas de 50 μ L de células competentes, as quais foram armazenadas a -80°C.

Para a transformação, um volume de 3 μ L de sistema de ligação contendo os produtos de PCR foi adicionado à uma alíquota de 50 μ L de células competentes. Em seguida, o sistema de transformação foi transferido para uma cubeta de plástico com eletrodos de alumínio (1 mm de ranhura). Essa cubeta foi submetida a uma corrente elétrica em um eletroporador, conforme os seguintes parâmetros: 2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω (Maranhão, 2003). Foi adicionado 1 mL de meio SOC na cubeta e o volume total foi transferido para um tubo eppendorf. Em seguida, esse tubo foi incubado a 37°C por 1 hora, quando alíquotas de 25 a 200 μ L de sistema de transformação foram inoculadas em placas contendo meio LB ágar (1,5%) suplementado com IPTG (0,5 mM), Xgal (0,00625%) e ampicilina (150 μ g/ml). A semeadura foi feita por

espalhamento, utilizando-se pérolas de vidro estéreis. As placas foram incubadas a 37°C por 16 a 24 horas.

O preparo de células competentes e eletroporação foram realizados no laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília.

4.6. Preparo de células competentes de *E. coli* DH5 α e transformação por choque térmico

Uma colônia de *E. coli* DH5 α foi inoculada em 5 mL de meio LB e incubada a 37°C por uma noite. Um volume de 300 μ L desta cultura foi transferido para um frasco Erlenmeyer contendo 30 mL de meio LB, sendo então incubado a 37°C sob agitação (220 RPM) até atingir densidade óptica (OD₆₀₀) de 0,2 a 0,3. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 1250 *g*, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células ressuspensas em 15 mL de cloreto de cálcio (CaCl₂) 100 mM gelado. As células ressuspensas foram incubadas em gelo por 20 a 30 minutos e então centrifugadas a 310 *g*, por 10 minutos, a 4°C. O sedimento de células foi ressuspensas em 1 mL de CaCl₂ 100 mM gelado e incubadas em gelo por um período mínimo de 1 hora. Alíquotas de 100 μ L dessas células foram misturadas a volumes de 5 a 10 μ l dos sistemas de ligação, e incubadas em gelo por 30 minutos. Após este período, procedeu-se ao choque térmico, por meio de incubação dos sistemas de transformação em banho a 37°C por 5 minutos. Ao final desse tempo, foi adicionado 1 mL de meio LB a cada sistema, sendo estes incubados a 37°C por 1 hora. Assim como na transformação por eletroporação, alíquotas de 25 a 200 μ L de sistema de transformação foram inoculadas em placas contendo meio LB ágar (1,5%) suplementado com IPTG (0,5 mM), Xgal (0,00625%) e ampicilina (150 μ g/ml). Novamente a semeadura foi feita por espalhamento utilizando-se pérolas de vidro estéreis e as placas incubadas em uma estufa a 37°C por 16 a 24 horas.

4.7. Seleção de clones recombinantes

As colônias brancas observadas nas placas semeadas com sistema de transformação foram selecionadas com palitos estéreis e incubadas a 37°C por uma noite em 5 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. Após a incubação, alíquotas das culturas foram estocadas a -20°C com uma concentração final de 35% de glicerol.

4.8. Extração de DNA plasmidial (adaptado de Dagert e Ehrlich, 1979)

Os clones estocados foram inoculados em 5 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/ml) e incubados a 37°C por uma noite. A cultura foi então transferida para um tubo tipo eppendorf e centrifugada a 3500 g por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o mesmo procedimento foi repetido por duas vezes, no intuito de se obter um sedimento com maior quantidade de células. O sedimento de células foi então ressuspensão em 100 µL de solução I (50 mM de glicose, 25 mM de tampão Tris-HCl, pH 8.0 e 10 mM de EDTA) e mantido à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução II (0,2 M de NaOH, 1% SDS), preparada na hora do uso. Após a homogeneização suave, o sistema foi incubado em gelo por 5 minutos. Ao fim desse tempo, foram adicionados 150 µL da solução III (acetato de potássio 3 M, ácido acético glacial 2 M, pH 4,8). Novamente foi feita a homogeneização suave das soluções e incubação em gelo por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000 g por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo eppendorf, quando foram adicionados 6 µL de RNase A (20 mg/mL), sendo os tubos incubados a 37°C por 1 a 2 horas. Após esse tempo, foi adicionado 1 volume (400 µL) de clorofane (25 fenol:24 clorofórmio:1 álcool iso-amílico) e os tubos centrifugados a 7000 g por 3 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde ocorreu adição de 2,5 a 3 volumes de etanol 100% gelado. Os tubos foram mantidos por uma noite a -20°C. Em seguida, estes foram centrifugados a 12000 g por 5 minutos a 4°C, o etanol 100% descartado, adicionando-se então 300 µL de etanol 70% gelado. Os tubos foram centrifugados novamente sob as mesmas condições e o etanol 70% foi descartado. Os tubos foram

então invertidos e mantidos à temperatura ambiente para secar. O DNA sedimentado foi ressuspensão em 50 µL de H₂O milli-Q e armazenado em um freezer a -20°C. A qualidade e concentração dos DNAs plasmidiais foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose.

4.9. Quantificação de DNA

O DNA foi quantificado a partir da comparação visual dos fragmentos de DNA de interesse em gel de agarose com aqueles do marcador de massa molecular *High Mass* (Invitrogen). Foi aplicado no gel sempre o mesmo volume de solução aquosa contendo DNA. Além disso, o mesmo DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanovue™ (GE), gentilmente cedido para uso pela professora Silviene de Oliveira, do Laboratório de Genética da UnB.

4.10. Sequenciamento de DNA

Parte do sequenciamento do DNA plasmidial contendo os fragmentos de interesse foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, em placas de 96 poços. O equipamento utilizado foi o sequenciador automático ABI3730 da Applied Biosystems. A outra parte do sequenciamento foi feita com os serviços da empresa Macrogen. Os iniciadores 340f ou 21f foram utilizados no sequenciamento, conforme o iniciador utilizado durante a PCR.

4.11. Análises de Bioinformática

A qualidade das sequências de DNA obtidas foi verificada por meio do algoritmo PHRED (Ewing 1998), sendo selecionadas sequências com valor de PHRED acima de 20. Essa análise foi feita *online*, utilizando-se a ferramenta *Electropherogram quality analysis* (disponível na página <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> da EMBRAPA). Para verificar a presença de sequências quiméricas, foi realizada a análise pelo programa Bellerophon (Huber *et al.*, 2004). As sequências apontadas como quimeras foram verificadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology*

Information (NCBI) e quando não apresentavam padrão compatível com uma quimera, as mesmas foram mantidas. As sequências que apresentavam valor de PHRED inferior a 20, ou que apresentavam características compatíveis com quimeras, foram descartadas.

As sequências foram submetidas a análises comparativas com os bancos de dados não redundantes do NCBI e do *Ribosomal Database Project* (RDP), utilizando-se a ferramenta “Classifier”. As sequências que apresentavam identidade igual ou superior a 90% com aquelas depositadas nos bancos de dados foram consideradas válidas.

As sequências válidas foram alinhadas com o algoritmo NAST, disponível no site Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) (DeSantis *et al.*, 2006). O programa MOTHUR (Schloss *et al.*, 2009) foi utilizado para filtrar as colunas formadas por lacunas, que surgiram no alinhamento feito pelo algoritmo NAST. O alinhamento foi realizado manualmente, utilizando-se o programa BioEdit. O MOTHUR também foi utilizado para estimar a riqueza de unidades taxonômicas operacionais (OTUs). O mesmo programa foi utilizado para a construção de curvas de rarefação, de forma que os limites de corte foram de 80% para o nível taxonômico de filo, 90% para classe, 95% para gênero e 97% para espécie. Ainda utilizando-se o programa MOTHUR, foram obtidos os seguintes coeficientes de riqueza e diversidade: ACE, CHAO, SHANNON e SIMPSON.

Foram realizadas as seguintes análises de β -diversidade: β -Libshuff, PCA e diagrama de Venn. O teste β -Libshuff foi obtido pelo programa MOTHUR e realizado com a finalidade de observar a significância da diferença entre as comunidades. O valor-p foi ajustado pela correção de Bonferroni. O gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCA) foi feito com o programa Unifrac (Lozupone *et al.*, 2006). O diagrama de Venn também foi obtido com auxílio do programa MOTHUR.

O programa MEGA (Tamura *et al.*, 2011) foi utilizado para construção de árvores filogenéticas. O método foi utilizado com os seguintes parâmetros: *Neighbour-Joining*, teste de *bootstrap* de 1000 repetições e modelo de evolução Jukes-Cantor.

5. Resultados e Discussão

5.1 Coleta dos sedimentos

Os sedimentos foram coletados nas estações de seca e transição seca/chuvosa, em 2010. Os sedimentos LRPA (Lagoa Rio Preto Alto), RIB4-Maio e RIB5-Maio (bacia Baixo Inhancica em Maio) foram coletados na estação seca, enquanto os sedimentos RIB4-Set e RIB5-Set (bacia Baixo Inhancica em Setembro) foram coletados na estação de transição seca/chuvosa. A Tabela 3 apresenta os dados relativos à coleta dos sedimentos utilizados neste trabalho.

Tabela 3. Dados da coleta dos sedimentos utilizados

	LRPA	RIB4 - Maio	RIB5 - Maio	RIB4 - Set	RIB5 - Set
Data da coleta	05/05/2010	07/05/2010	07/05/2010	13/09/2010	13/09/2010
Temperatura Água	26°C	26,1 °C	25,6 °C	21,7 °C	21,7 °C
Latitude	-17,9423	-17,77117	-17,77125	-17,77117	-17,77125
Longitude	-43,83027	-43,62654	-43,62665	-43,62654	-43,62665
Profundidade (cm)	0,7	5,4	5,4	4,8	4,6
pH	5,56	5,5	5,63	5,64	5,92
P-Total (µg/L)	20	8	10	16	21
N-Total (µg/L)	22	10	12	22	25

A profundidade de coleta de todos os sedimentos utilizados não ultrapassou o valor de seis centímetros. Assim, pode-se concluir que estes sedimentos fazem parte da camada recente de deposição (Thomaz, 2001). Os valores de pH dos sedimentos não variaram muito, mantendo-se em torno de 5,5. O pH ácido encontrado nestes sedimentos pode ser devido à liberação de íons de hidrogênio no meio, como produto do metabolismo da comunidade microbiana (Esteves, 2011; Zardo *et al.* 2011).

Fatores ambientais, tais como a chuva, afetam os parâmetros físico-químicos de sedimentos de lagoa (Wetzel, 2001). Como observado na Tabela 3, os sedimentos coletados na estação de transição seca/chuvosa apresentaram teores mais elevados de nitrogênio e fósforo. O sedimento da lagoa Rio Preto Alto (LRPA), coletado na estação de seca, também apresentou

altas concentrações destes compostos. Como esta lagoa situa-se próxima a uma área de pasto para gado, é possível que tal fato tenha afetado a sua composição nutricional. Sabe-se que a comunidade microbiana de solos do cerrado é alterada conforme as estações de chuva e seca (Silva, 2004), de forma que é possível que as estações também influenciem as comunidades microbianas de sedimentos lacustres.

5.2. Extração de DNA total

A extração de DNA total das amostras de sedimento apresentou eficiência variável (Figura 7). A amostra de RIB5-Set apresentou uma pequena quantidade de DNA, quando observamos o perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Por outro lado, a amostra LRPA foi a que apresentou maior quantidade de DNA. O perfil eletroforético também permitiu verificar que os DNAs extraídos apresentavam pequeno grau de degradação, permitindo assim seu uso nos experimentos subsequentes de PCR.

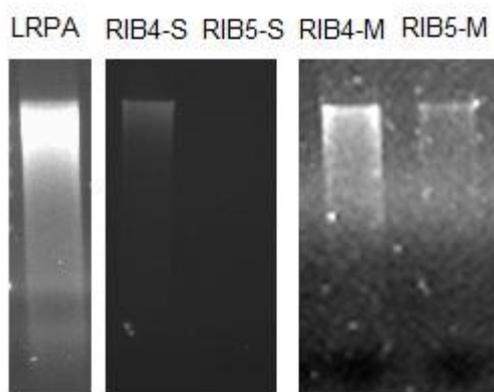


Figura 7. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% das amostras de DNA total extraído dos sedimentos utilizados nesse trabalho: Lagoa Rio Preto Alto (LRPA); RIB4-S e RIB5-S - sedimentos coletados da bacia “Baixo Inhacica” na estação de transição seca/chuvosa (setembro); RIB4-M e RIB5-M - sedimentos coletados da bacia “Baixo Inhacica” na estação seca (maio).

A Tabela 4 apresenta as concentrações de DNA dessas amostras, quantificadas em espectrofotômetro NanoVue™. Apesar da variação nas quantidades de DNA obtidas, todas as amostras geraram fragmentos de DNA, quando submetidas aos ensaios de PCR.

Tabela 4. Concentrações de DNA obtidas nos sedimentos amostrados

Amostra de Sedimento	Concentração de DNA (ng/ μ L)	A260/A280*
LRPA	51,0	1,729
RIB4-Maio	25,0	2,024
RIB5-Maio	27,0	2,318
RIB4-Setembro	17,5	2,000
RIB5-Setembro	3,7	2,000

*Razão entre as concentrações de ácidos nucleicos e proteínas obtidos na extração. Valores ideais variam entre 1,8 e 2,0.

O kit *PowerSoil* (MoBio), utilizado para a extração de DNA total dos sedimentos, baseia-se no princípio de extração direta. Isso significa que a lise das células ocorre junto à matriz do solo ou sedimento (Ogram *et al.*, 1987). Nesse tipo de extração é comum a ocorrência de ácidos húmicos, dentre outras substâncias orgânicas, que podem inibir procedimentos posteriores com o DNA extraído (Roose-Amsaleg *et al.*, 2001). No entanto, a extração por meio desse kit retira tais substâncias que, caso estivessem presentes, poderiam ser identificadas como substâncias de coloração marrom em géis de agarose.

5.3. Amplificação por PCR de fragmentos de genes que codificam o rRNA 16S

Tendo em vista o crescente número de trabalhos que descrevem a caracterização de archaeas em diversos ambientes, novos iniciadores vêm sendo propostos na literatura, por apresentarem melhor sensibilidade e especificidade para o Domínio *Archaea*. Assim, visando avaliar a especificidade destes novos iniciadores, neste trabalho foram utilizados dois pares, descritos como universais para o domínio *Archaea*. Inicialmente, foram realizados experimentos de PCR com a amostra LRPA (oriunda da Lagoa Rio Preto Alto), empregando-se o par de iniciadores 340f/1000R, recentemente descrito por Gantner *et al.*, (2011). Estes ensaios foram realizados a fim de se verificar a especificidade de tais iniciadores, uma vez que os autores propõem se tratar de um par que promove a amplificação eficiente de fragmentos de DNA de genes de rRNA 16S de diferentes filos de *Archaea*. De acordo com a posição de

pareamento dos iniciadores, os fragmentos amplificados deveriam apresentar 660 pares de base. A análise dos produtos de amplificação em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio revelou a amplificação do fragmento de tamanho esperado (Figura 8). No trabalho original, os autores utilizaram uma DNA polimerase não disponível no nosso laboratório (KAPA2GTM *Robust Hot Start polymerase*). Segundo os autores, a quantidade de DNA ideal para a amplificação com esses iniciadores era de 1 ng por reação. No entanto, neste trabalho, não foi possível amplificar fragmentos com essa quantidade de DNA e a *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), rotineiramente usada por nosso grupo. A amplificação de fragmentos de tamanho esperado foi possível somente a partir da utilização de 2,5 e 5 ng de DNA por reação.

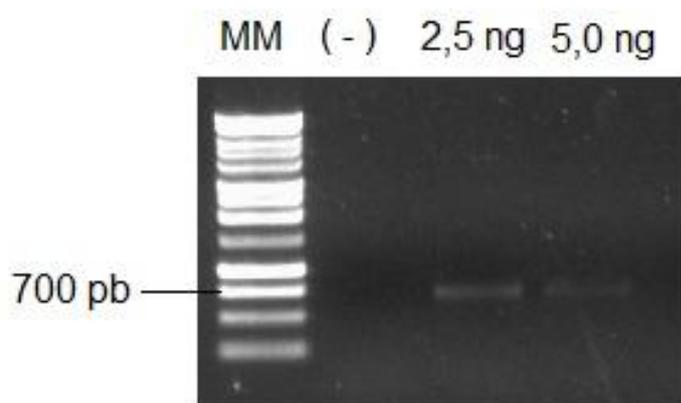


Figura 8. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo fragmentos de genes de rRNA 16S amplificados utilizando-se os iniciadores 340f e 1000r com a amostra LRPA. MM: marcador de massa molecular 1 kb ladder (Promega); (-): controle negativo utilizado na reação de PCR, onde não foi adicionado DNA; 2,5 ng: fragmento obtido utilizando-se 2,5 ng de DNA na PCR; 5,0 ng: fragmento obtido utilizando-se 5,0 ng de DNA na PCR.

Os demais experimentos de PCR, empregando as amostras coletadas em períodos de seca e de transição seca/chuvosa, foram realizados utilizando-se o par de iniciadores 21f/958r, descrito por DeLong (1992) para a detecção de membros do domínio *Archaea* em ambientes marinhos costeiros. Esse par de iniciadores vem sendo utilizado por nosso grupo em outros trabalhos e se mostrou eficiente na descrição de comunidades de *Archaea* em ambientes do cerrado (Catão, 2012). Pelo fato de termos experimentado dificuldades nos experimentos de PCR empregando o par 340f/1000r e pelo fato de termos excelentes resultados prévios com o uso do par 21f/958r, este foi escolhido para o estudo da influência da chuva na comunidade de *Archaea* em

sedimentos. O fragmento de DNA amplificado por esse par apresenta aproximadamente 937 pares de bases. Na figura 9, é possível observar os fragmentos amplificados a partir de 5 ng de DNA extraído de sedimentos coletados na bacia “Baixo Inhacica” (RIB4 e RIB5) na estação seca (maio).

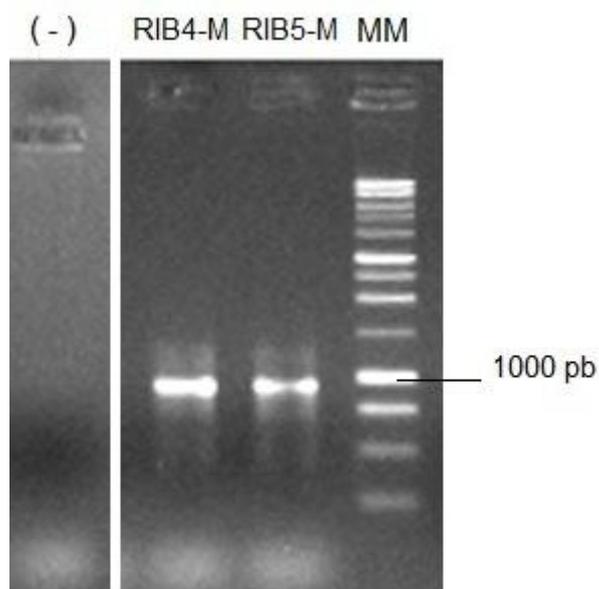


Figura 9. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo fragmentos de genes de rRNA 16S amplificados utilizando-se os iniciadores 21f e 958r para as amostras RIB4-M e RIB5-M; (-): controle negativo utilizado na reação de PCR, onde não foi adicionado DNA. Este controle foi observado em um gel a parte; RIB4-M: fragmento obtido a partir de DNA extraído do sedimento RIB4 coletado em maio; RIB5-M: fragmento obtido a partir de DNA extraído do sedimento RIB5 coletado em maio. MM: marcador de massa molecular 1 kb ladder (Promega)

Nas figuras 10 e 11 são apresentados os fragmentos amplificados a partir de DNA extraído de sedimentos coletados na bacia “Baixo Inhacica” na estação de transição seca/chuvosa (setembro) utilizando-se o par de iniciadores 21f e 958r.

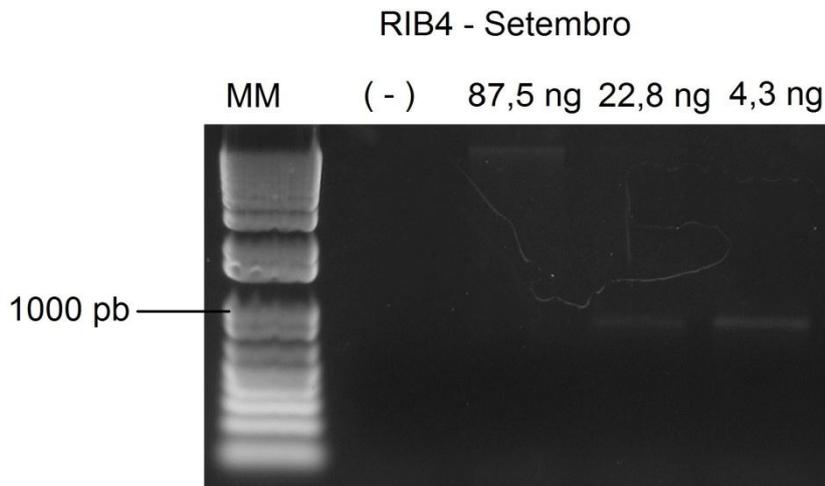


Figura 10. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo fragmentos de genes de rRNA 16S amplificados utilizando-se os iniciadores 21f e 958r para a mostra RIB4-S. MM: marcador de massa molecular 1 kb ladder (Invitrogen); (-): controle negativo utilizado na reação de PCR, onde não foi adicionado DNA; 87,5 ng: poço correspondente ao tubo ao qual foram utilizados 87,5 ng de DNA na PCR; 22,8 ng: fragmento obtido utilizando-se 22,8 ng de DNA na PCR; 4,3 ng: fragmento obtido utilizando-se 4,3 ng de DNA na PCR.

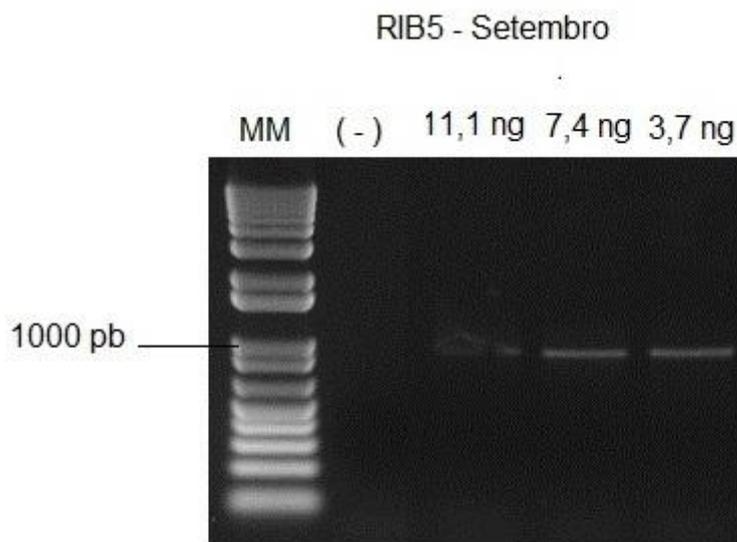


Figura 11. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo fragmentos de genes de rRNA 16S amplificados utilizando-se os iniciadores 21f e 958r para a mostra RIB5-S. MM: marcador de massa molecular 1 kb ladder (Invitrogen); (-): controle negativo utilizado na reação de PCR, onde não foi adicionado DNA; 11,1 ng: poço correspondente ao tubo no qual foram utilizados 11,1 ng de DNA na PCR; 7,4 ng: fragmento obtido utilizando-se 7,4 ng de DNA na PCR; 3,7 ng: fragmento obtido utilizando-se 3,7 ng de DNA na PCR.

5.4. Transformação de células de *E. coli* DH5 α e seleção de clones recombinantes

Após a ligação dos fragmentos de DNA obtidos a partir dos ensaios de PCR ao vetor plasmidial, células de *E. coli* DH5 α foram transformadas por meio de eletroporação e/ou choque térmico. No caso dos fragmentos amplificados a partir dos iniciadores 340f/1000r, utilizados no estudo da detecção de *Archaea* na Lagoa Rio Preto Alto (LRPA), foi utilizada a técnica de eletroporação. No entanto, como obtivemos dificuldades em repetir o processo de transformação de forma eficiente no caso dos fragmentos amplificados pelo par 21f/958r, optou-se pela transformação de células de *E. coli* por meio de transformação por choque térmico.

Após o sistema de transformação ser semeado em placas contendo meio LB ágar suplementado com Xgal, IPTG e ampicilina, seguido de incubação por uma noite a 37°C, foi possível observar o crescimento de várias colônias brancas. O número de clones selecionados e estocados em glicerol 35% a -20°C encontram-se na tabela 5.

Tabela 5. Clones recombinantes obtidos após a transformação

Sedimento / Iniciadores utilizados	Número de clones recombinantes
LRPA / 340f e 1000r	197
RIB4 – Maio / 21f e 958r	257
RIB5 – Maio / 21f e 958r	190
RIB4 - Setembro / 21f e 958r	198
RIB5 - Setembro / 21f e 958r	192
Total	1034

Os fragmentos obtidos a partir de todos os sedimentos foram ligados ao plasmídeo vetor e em seguida submetidos à extração de DNA plasmidial para posterior sequenciamento.

5.5. Extração de DNA Plasmidial

Os clones obtidos a partir de todas as amostras tiveram o seu DNA plasmidial extraído para posterior sequenciamento. A concentração e pureza do DNA foram avaliadas em géis de agarose corados com brometo de etídio e em espectrofotômetro NanoVueTM. De acordo com os resultados obtidos, a concentração de DNA plasmidial variou, na maior parte dos casos, entre 35 e

60 ng/μL. No entanto, algumas amostras tiveram que ser diluídas para otimizar o sequenciamento, já que apresentavam uma concentração de DNA mais alta que o ideal. Houve amostras que apresentaram concentrações muito baixas de DNA. Pelo fato destas amostras terem sido poucas, podemos concluir que o método de extração utilizado apresenta uma boa eficiência. A Figura 12 ilustra o perfil plasmidial obtido a partir do sedimento de LRPA.

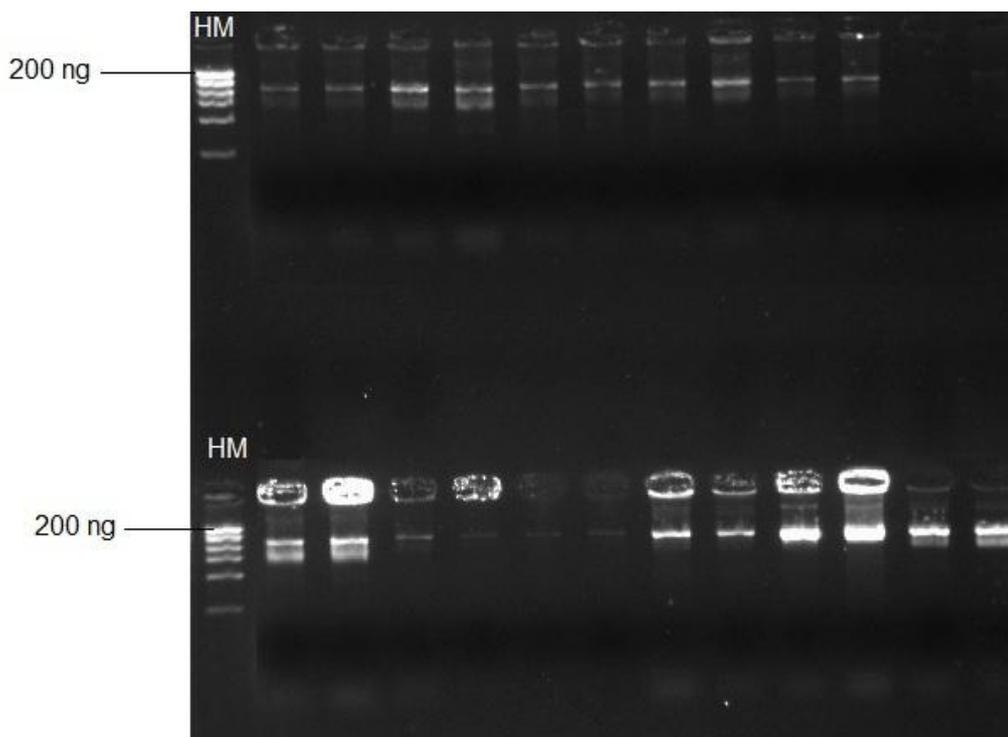


Figura 12. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, contendo plasmídeos recombinantes com os fragmentos de genes de rRNA 16S obtidos a partir do sedimento da Lagoa Rio Preto Alto (LRPA). HM: *High Mass DNA ladder* (Invitrogen)

O número de plasmídeos submetidos ao sequenciamento não equivale ao número total de clones. Foram submetidos ao sequenciamento 192 amostras de DNA plasmidial provenientes de clones obtidos a partir da amostra LRPA, e 96 amostras de cada um dos sedimentos RIB4 Maio, RIB4 Setembro, RIB5 Maio e RIB5 Setembro.

5.6 Sequenciamento e análises de bioinformática

5.6.1. Análise de qualidade das sequências

Como mencionado acima, 192 clones da biblioteca da Lagoa Rio Preto Alto (iniciadores 340f/1000r) foram submetidos ao sequenciamento automático, empregando-se os iniciadores específicos. No caso dos demais sedimentos, RIB4-M, RIB5-M, RIB4-S, RIB5-S (iniciadores 21f/958r), 96 clones de cada amostra foram submetidos ao sequenciamento. Assim, um total de 576 clones foi submetido ao sequenciamento automático. No caso das amostras provenientes de LRPA, foi utilizado o iniciador 340f, enquanto para as demais, o iniciador 21f foi utilizado. Das 576 sequências, 451 apresentaram resultado Phred (Ewing *et al.*, 1998) de qualidade superior a 20 em mais de 250 nucleotídeos, sendo as 125 restantes, que não apresentaram tal qualidade, descartadas. Assim, 139 sequências de LRPA, 78 sequências de RIB4-M, 71 sequências de RIB5-M, 75 sequências de RIB4-S e 88 sequências de RIB5-S foram submetidas a análises posteriores.

A análise das 451 sequências consideradas válidas com o programa Bellerophon (Huber *et al.*, 2004) detectou 71 quimeras. No entanto, o alinhamento de todas essas sequências com o banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) não apresentou características de sequências quiméricas. Além disso, os alinhamentos obtidos ocorriam com archaeas não ainda cultivadas. Paralelamente, foi também realizado o alinhamento das 71 possíveis quimeras com o banco de dados *Ribosomal Database Project* (RDP) e todas apresentaram identidade superior a 90% com sequências de *Archaea*. De fato, foram detectadas sequências que apresentaram 100% de identidade com o banco de dados até o grau taxonômico de gênero. Assim, essas 71 sequências inicialmente classificadas como quimeras foram consideradas nas análises posteriores.

5.6.2. Alinhamento com o banco de dados *Ribosomal Database Project (RDP)*

O alinhamento das sequências obtidas foi realizado contra o banco de dados *Ribosomal Database Project (RDP)* (Wang *et al.*, 2007). Este banco de dados é específico para sequências que codificam o rRNA 16S de procariotos e 18S de fungos. Como as sequências obtidas neste trabalho codificam trechos de genes do rRNA 16S, este banco foi escolhido. A ferramenta *Classifier* do RDP permite classificar sequências em análises taxonômicas, comparando-as com as sequências depositadas.

Assim, as 471 sequências selecionadas foram submetidas à análise pela ferramenta *Classifier*, com um limite de confiança de 90%. Todas essas sequências apresentaram identidade com o domínio *Archaea*, com variações quanto à classificação observada, de acordo com os sedimentos analisados (Figura 13).

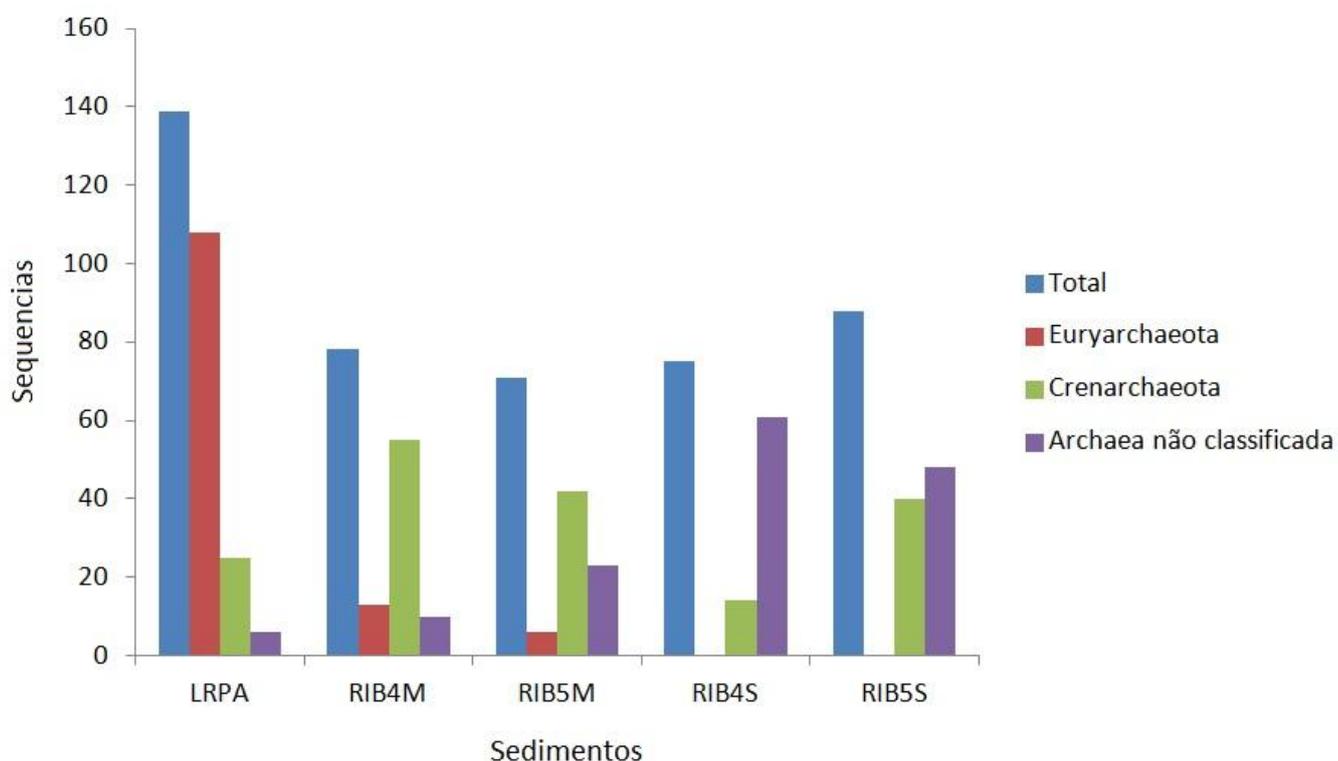


Figura 13. Histograma da classificação taxonômica pelo RDP das sequências de trechos do gene que codifica o rRNA 16S obtidas a partir de ensaios de PCR com amostras de DNA dos sedimentos: LRPA (Lagoa Rio Preto Alto); RIB4M e RIB5M (Bacia Baixo Inhacica na estação seca); RIB4S e RIB5S (Bacia Baixo Inhacica na estação de transição seca/chuvosa).

5.6.2.1 Lagoa Rio Preto Alto (LRPA) – 340f/1000r

Em relação ao sedimento de LRPA (Figura 13), das 139 sequências obtidas, foi verificado um alto predomínio de membros do filo Euryarchaeota (108 sequências - 77%), enquanto que membros do filo Crenarchaeota foram detectados em menor quantidade (27 sequências - 20%). Algumas sequências foram definidas como *Archaea* ainda não classificadas (4 sequências - 3%).

A distribuição dos filos observada no sedimento LRPA pode ter diferido dos demais pelo fato de as sequências terem sido obtidas se utilizando um par de iniciadores diferente daquele usado nos demais sedimentos, tendo em vista a possível introdução de vieses de amplificação de sequências de DNA afiliadas a alguns grupos de *Archaea* específicos devido à escolha de determinados iniciadores (Baker *et al.*, 2003). Além disso, trechos de DNA mais abundantes na amostra terão uma maior probabilidade de amplificação por PCR (Forney *et al.*, 2004). Outro fator a ser considerado está no fato do sedimento LRPA ter sido oriundo de uma lagoa diferente, com características distintas, o que também pode ter sido determinante na ocorrência dessas diferenças. A presença de membros do filo Euryarchaeota em sedimentos de lagoa é algo comum, em especial organismos metanogênicos (Lovley *et al.*, 1983; Conrad *et al.*, 1985; Vetriani *et al.*, 1999; Antony *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012).

Um aspecto a ser considerado é o fato do banco de dados RDP ainda não levar em conta a proposta de novos filos. Assim, sequências possivelmente provenientes de membros do filo Thaumarchaeota são classificadas como Crenarchaeota (Kan, 2011).

As 27 sequências classificadas como Crenarchaeota foram consideradas da classe Thermoprotei, a única classe desse filo e, por esta razão, não foi possível obter uma classificação para níveis taxonômicos mais específicos para os membros do filo Crenarchaeota.

No caso das sequências consideradas como pertencentes ao filo Euryarchaeota foi possível, em vários casos, determinar a classificação até o grau taxonômico de gênero (Figura 15). Os resultados revelam um alto predomínio de ordens referentes a organismos metanogênicos (Figura 14), de

maneira que foram detectados organismos de quatro das cinco ordens metanogênicas conhecidas de Euryarchaeota (Thauer, 1998).

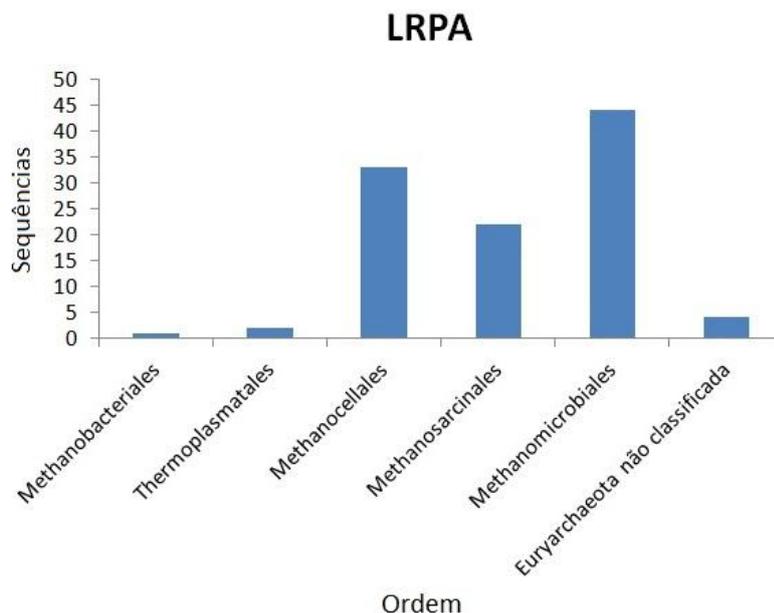


Figura 14. Histograma indicando a distribuição das ordens de Euryarchaeota observadas com o alinhamento de seqüências de genes de rRNA 16S com o RDP na amostra LRPA

- Filo *Euryarchaeota* (108 sequencias)
 - classe Methanobacteria (1)
 - ordem Methanobacteriales (1)
 - família Methanobacteriaceae (1)
 - gênero Methanosphaera (1)
 - classe Thermoplasmata (2)
 - ordem Thermoplasmatales (2)
 - família Thermoplasmatales incertae sedis (2)
 - gênero Thermogymnomonas (2)
 - classe Methanomicrobia (101)
 - ordem Methanocellales (33)
 - família Methanocellaceae (33)
 - gênero Methanocella (33)
 - ordem Methanosarcinales (21)
 - família Methanosaetaceae (6)
 - gênero Methanosaeta (6)
 - família Methanosarcinaceae (12)
 - gênero Methanosarcina (9)
 - gênero Methanosarcinaceae não classificada (3)
 - família Methanosarcinales não classificada (3)
 - ordem Methanomicrobiales (44)
 - família Methanospirillaceae (5)
 - gênero Methanospirillum (5)
 - família Methanomicrobiales incertae sedis (34)
 - gênero Methanoregula (33)
 - gênero Methanomicrobiales incertae sedis não classificada (1)
 - família Methanomicrobiales não classificada (5)
 - ordem Methanomicrobia não classificada (3)
 - Euryarchaeota não classificada (4)

Figura 15. Alinhamento das seqüências provenientes da amostra LRPA com o banco de dados RDP, para o filo Euryarchaeota. Entre parênteses está indicado o número de seqüências.

Esse resultado sugere uma alta diversidade de membros do filo Euryarchaeota, em especial metanogênicos. O fato de sedimentos de lagoa serem ambientes sem a presença de oxigênio com alta deposição de matéria orgânica é um fator que pode contribuir para a elevada ocorrência desses organismos (Torres *et al.*, 2010).

5.6.2.2 Bacia Baixo Inhacica (RIB4 e RIB5) – 21f/958r

Ao observar-se a figura 13, em relação ao alinhamento das sequências de RIB4-M e RIB5-M (coletados em maio), houve um predomínio de membros do filo Crenarchaeota (55 sequências – 70% em RIB4-M; 42 sequências – 59% em RIB5-M), com menor número de sequências relativas a membros do filo Euryarchaeota (13 sequências – 17% em RIB4-M; 6 sequências – 8% em RIB5-M) e poucas sequências definidas como *Archaea* ainda não classificadas (10 sequências – 13% em RIB4-M; 23 sequências – 33% em RIB5-M). Em RIB4-S e RIB5-S, coletados na estação de transição seca/chuvosa, não foram encontradas sequências afiliadas ao filo Euryarchaeota e houve um alto predomínio de *Archaea* ainda não classificadas (61 sequências – 81% em RIB4-S; 48 sequências – 54% em RIB5-S), com a presença de sequências de Crenarchaeota (14 sequências – 19% em RIB4-S; 40 sequências – 46% em RIB5-S).

O baixo número de membros do filo Euryarchaeota encontrados em RIB4-M e RIB5-M e a completa ausência em RIB4-S e RIB5-S em comparação à LRPA pode ser devido ao mencionado viés de iniciadores. No entanto, o estudo dos sedimentos RIB4 e RIB5 em diferentes estações foi realizado com o mesmo par de iniciadores. Assim, podemos inferir que as diferenças na distribuição dos filos encontrados devem-se, provavelmente às próprias características das amostras, sugerindo assim uma possível influência das estações na composição das comunidades. Com a presença de chuvas, ocorrem maior ressuspensão e re-deposição no sedimento, alterando sua composição físico-química (Wetzel, 2001). Essa alteração provavelmente afetou a comunidade de *Archaea* desses sedimentos.

Novamente, um aspecto a ser considerado é o fato do banco de dados RDP ainda não levar em consideração a proposta de novos filios, de maneira que é possível que membros do filo Thaumarchaeota estejam sendo classificados como do filo Crenarchaeota.

As sequências classificadas como membros do filo Crenarchaeota, no caso dos sedimentos RIB4-M, RIB5-M, RIB4-S e RIB5-S, foram consideradas da classe Thermoprotei. O número de sequências associadas a gêneros de Euryarchaeota detectados nesses sedimentos pode ser observado na tabela 6.

Tabela 6. Gêneros de Euryarchaeota observados nos sedimentos coletados na Bacia Baixo Inhacica em ambas as estações

Gênero	Sequências			
	RIB4M	RIB5M	RIB4S	RIB5S
Methanosarcina	1	1	0	0
Methanosaeta	4	1	0	0
Não classificado	8	4	0	0
Total	13	6	0	0

RIB4M e RIB5M: réplicas coletadas na estação seca; RIB4S e RIB5S: réplicas coletadas na estação de transição seca/chuvosa.

5.6.3. Análises de alfa-diversidade

A diversidade de qualquer sistema biológico se baseia na riqueza e na abundância dos organismos presentes no ambiente. A riqueza representa o número de espécies diferentes, enquanto que a abundância diz respeito a sua distribuição (Melo, 2008). A alfa-diversidade é um parâmetro que descreve as espécies encontradas em um determinado local (Forney *et al.*, 2004).

Em procariotos, não se emprega o conceito de espécie, mas de unidade taxonômica operacional (OTU) (Coenye, 2005). O posicionamento hierárquico taxonômico utilizado nesse sistema é feito a partir de valores de similaridade. Assim, sequências de DNA que apresentam apenas 20% de diferença entre si são consideradas como de organismos de um mesmo filo. Se for observado apenas 10% de diferença, os organismos são considerados de uma mesma classe/família. Se houver 5% de diferença, os organismos em questão serão considerados do mesmo gênero e para apenas 3% de diferença nas sequências de DNA os organismos são considerados de uma mesma espécie (Schloss e Handelsman, 2004), embora outros autores defendam a idéia de

que dois organismos procarióticos devem ser considerados de uma mesma espécie somente quando for verificado apenas 1% de diferença nas sequências analisadas (Yassin *et al.*, 2003). Neste trabalho, no entanto, consideramos como parâmetros de dissimilaridade os valores de: 20%, 10%, 5% e 3%.

Para a realização destas análises, as sequências obtidas foram agrupadas por meio de seu alinhamento múltiplo, empregando-se o algoritmo NAST, diretamente no site *Greengenes* (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) (DeSantis *et al.*, 2006). As colunas geradas pelo alinhamento foram filtradas utilizando-se o programa MOTHUR (Schloss *et al.* 2009). Em seguida, foi gerada a matriz de distâncias, pelo método de *average neighbor*. Essa matriz foi a base para o agrupamento das sequências nos táxons, de acordo com os coeficientes de dissimilaridade mencionados. O alinhamento foi realizado com cada um dos sedimentos (LRPA, RIB4-M, RIB5-M, RIB4-S, RIB5-S) isoladamente, e também com o conjunto RIB4-M, RIB5-M, RIB4-S e RIB5-S. As sequências oriundas de LRPA não foram incluídas no alinhamento em conjunto uma vez que foram obtidas utilizando-se com um par de iniciadores diferentes e por não terem sido incluídas no estudo da possível influência das estações na comunidade de *Archaea*.

Foram obtidos também os seguintes coeficientes de riqueza e diversidade para as sequências analisadas: ACE, CHAO, SHANNON, SIMPSON. O SHANNON (Shannon e Weaver, 1949) é um índice de diversidade utilizado para avaliar qual comunidade é mais diversa. Como é um índice que avalia diversidade, nesta análise são levadas em conta a riqueza e a abundância dos organismos. O parâmetro SIMPSON (Simpson, 1949) consiste em um valor que varia entre 0 e 1, de forma que quanto mais próximo de 0, maior a diversidade.

Os índices de riqueza não paramétricos ACE (Chao e Lee, 1992) e CHAO (Chao, 1984) estimam o número de OTUs esperadas. Estes índices são calculados de uma maneira diferente, de forma que não é incomum estimarem um número de OTUs maior do que o observado.

5.6.3.1. Lagoa Rio Preto Alto (LRPA) – 340f/1000r

O número de OTUs, com dissimilaridade de 3%, no sedimento LRPA foi de 44. Esses dados indicam que LRPA é um sedimento bastante rico quanto à presença de membros do domínio *Archaea*, conforme previamente verificado quando da análise da distribuição das ordens de Euryarchaeota (Figura 14). No alinhamento com o programa BioEdit foram excluídas nove sequências, de maneira que foram utilizadas 130 sequências para as análises posteriores. Foram encontrados 27 singletons (OTUs formadas por uma única sequência) nessa amostra.

Para observar a cobertura da amostragem das comunidades estudadas, foram construídas curvas de rarefação, nas quais é possível observar a correlação entre o número de OTUs e o número absoluto de sequências. A cobertura da amostragem foi avaliada nessas curvas para os níveis de espécie (3%), gênero (5%), classe (10%) e filo (20%).

A figura 16 apresenta a curva de rarefação obtida para a comunidade do sedimento da Lagoa Rio Preto Alto. Para a construção da curva foram utilizadas apenas 130 sequências. Para os níveis de filo e classe, a amostragem mostrou-se suficiente, uma vez que as curvas encontram-se próximas ao platô. No entanto, para gênero e espécie, seriam necessárias mais sequências, apesar de suas curvas apresentarem uma tendência a alcançar o platô.

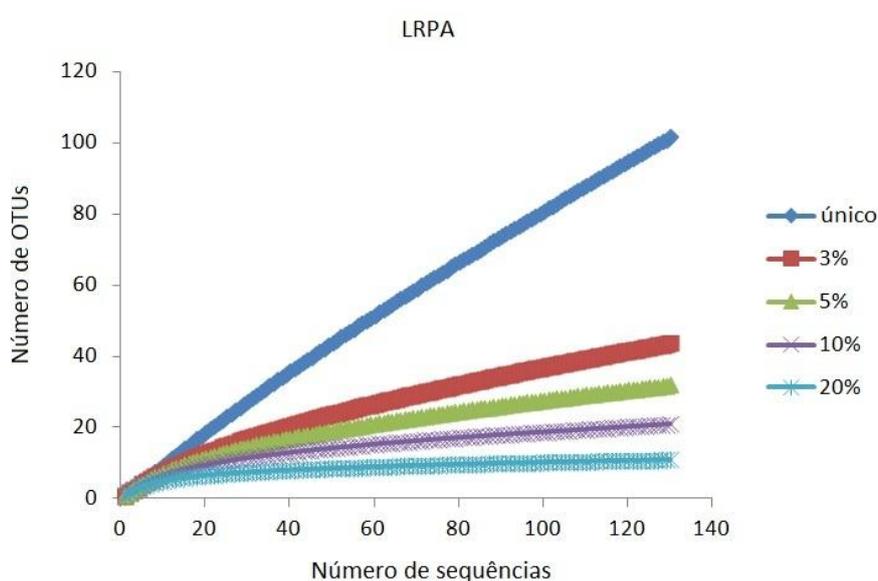


Figura 16. Curva de rarefação referente à comunidade da amostra LRPA, com as porcentagens de dissimilaridade de 3%, 5%, 10%, 20%.

Na tabela 7 é possível observar os índices de riqueza (Ace e Chao) e diversidade (Simpson e Shannon) da amostra LRPA, além da cobertura da amostragem, a qual indica em porcentagem o quanto a amostra ambiental analisada foi coberta com o número de sequências obtidas. Na tabela, sobs indica o número de OTUs observadas. Conforme previamente observado na curva de rarefação (Figura 16), os coeficientes de riqueza e diversidade mostram que a comunidade de LRPA é bastante diversa, sendo a descrição da comunidade adequada, a partir do número de sequências obtidas.

Tabela 7. Índices de riqueza (Ace e Chao) e diversidade (Simpson e Shannon) para o sedimento LRPA

	Dissimilaridade	sobs	chao	ace	Shannon	Simpson	Cobertura
LRPA	3%	44	87,88	186,84	3,13	0,07	79,23%
	5%	32	59,20	104,29	2,81	0,09	86,92%
130	10%	21	33,00	46,65	2,42	0,12	93,08%
sequências	20%	11	12,50	19,49	1,85	0,19	97,69%

5.6.3.2. Bacia Baixo Inhacica (RIB4 e RIB5) – 21f/958r

O número de OTUs, com dissimilaridade de 3%, em cada um dos sedimentos coletados na bacia Baixo Inhacica foi 39 em RIB4-M, 45 em RIB5-M, 8 em RIB4-S e 21 em RIB5-S (Tabela 8). Os sedimentos RIB4-M e RIB5-M, coletados na estação seca, apresentaram uma quantidade de OTUs muito maior que na estação de transição seca/chuvosa, permitindo concluir que havia uma comunidade com maior riqueza na estação seca que na transição seca/chuva. Além disso, um dado interessante é a quantidade de singletons, de maneira que a sua alta quantidade indica uma alta riqueza, mas não permite afirmar que há uma alta abundância dos organismos encontrados.

Tabela 8. Quantidade de OTUs (3% de dissimilaridade) e singletons

	Sequências	OTUs	Singletons
RIB4-M (seca)	78	39	26
RIB5-M (seca)	71	45	30
RIB4-S (transição)	75	8	2
RIB5-S (transição)	88	21	7

Nas figuras 17 e 18 é possível observar as curvas de rarefação construídas para avaliar a cobertura da amostragem das amostras RIB4-M e RIB5-M. O mesmo pode ser observado nas figuras 19 e 20 para as amostras RIB4-S e RIB5-S.

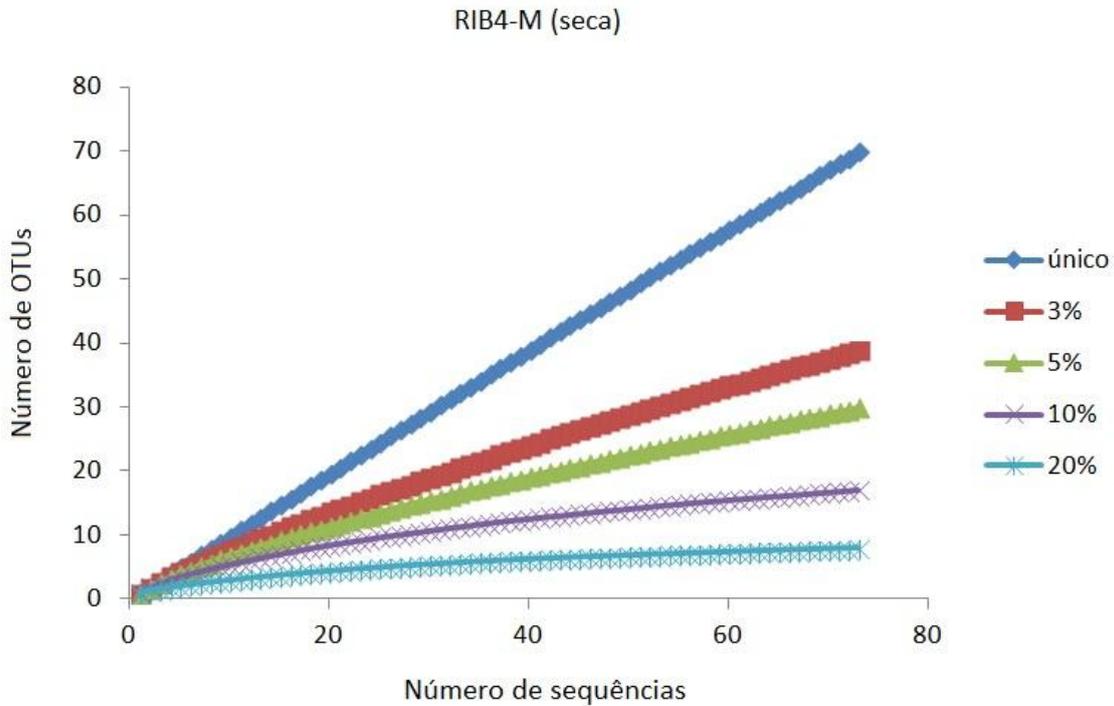


Figura 17. Curva de rarefação referente à comunidade da amostra RIB4-M, com as percentagens de dissimilaridade de 3%, 5%, 10%, 20%.

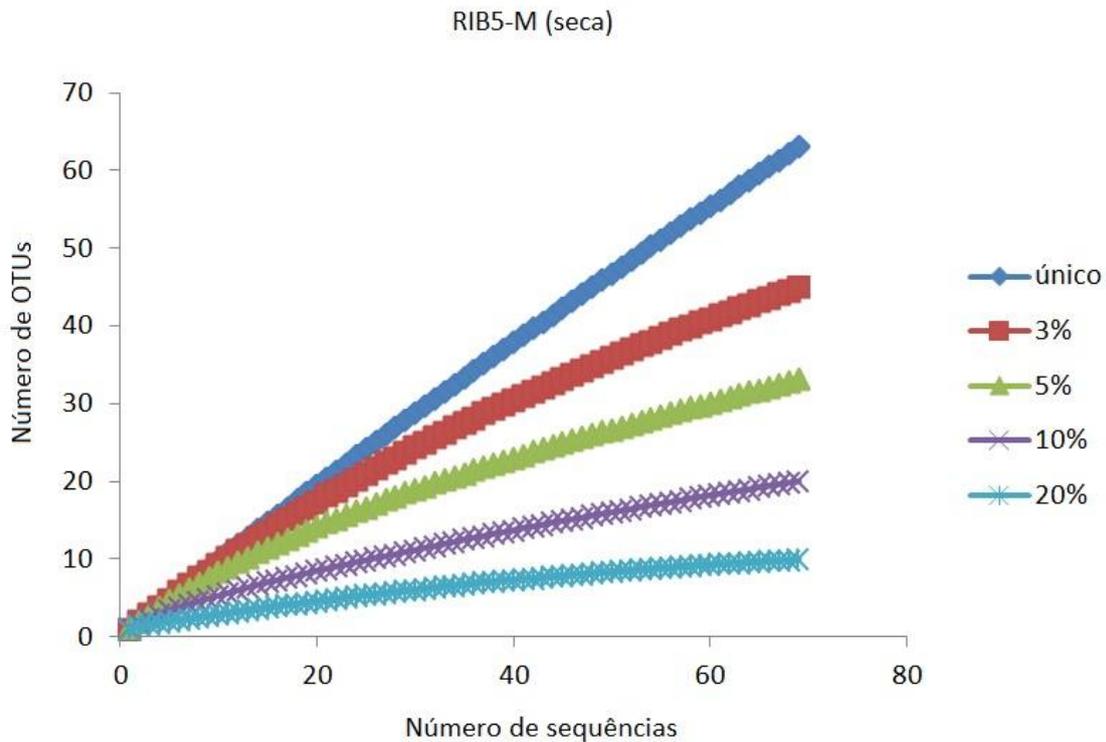


Figura 18. Curva de rarefação referente à comunidade da amostra RIB5-M, com as percentagens de dissimilaridade de 3%, 5%, 10%, 20%.

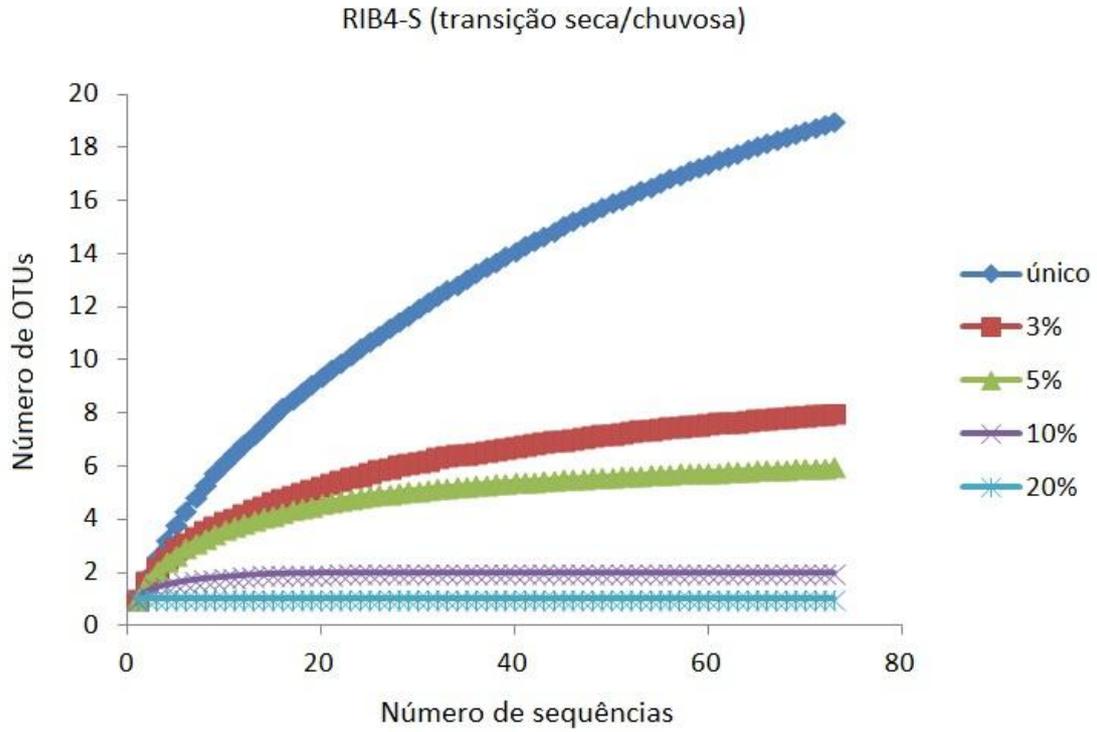


Figura 19. Curva de rarefação referente à comunidade da amostra RIB4-S, com as porcentagens de dissimilaridade de 3%, 5%, 10%, 20%.

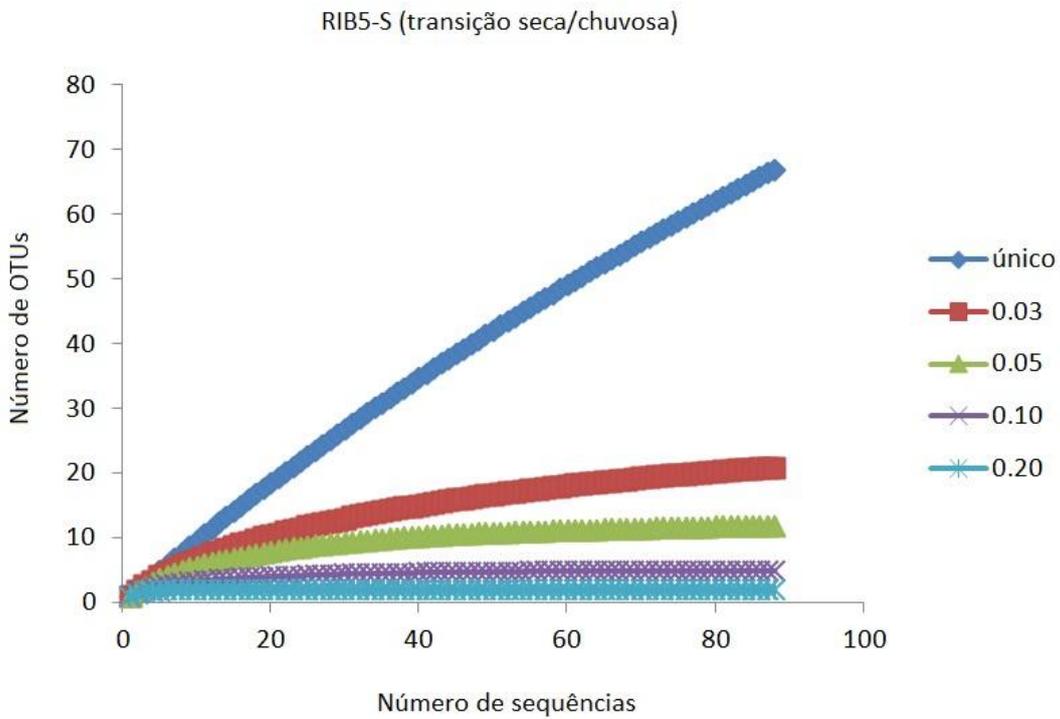


Figura 20. Curva de rarefação referente à comunidade da amostra RIB5-S, com as porcentagens de dissimilaridade de 3%, 5%, 10%, 20%.

É importante notar que algumas sequências foram excluídas na construção dessas curvas no alinhamento com o programa BioEdit. Ao observar-se as figuras 17 e 18, podemos concluir que mais sequências seriam necessárias para descrever as comunidades de estação seca (RIB4-M e RIB5-M), já que as curvas não alcançaram o platô com os coeficientes de dissimilaridade de 3% (espécie) e 5% (gênero). No caso das curvas referentes a 10% (classe) e 20% (filo), houve aproximação do platô, sendo a amostragem suficiente.

Observando-se as figuras 19 e 20, referentes às comunidades descritas a partir de sedimentos coletados na estação de transição seca/chuvosa (RIB4-S e RIB5-S), podemos notar que a amostragem foi suficiente para todos os níveis taxonômicos avaliados, já que todas as curvas alcançaram o platô. A diferença observada nas curvas de rarefação entre as comunidades de *Archaea* nos sedimentos de diferentes estações nos permite concluir que na estação seca há maior riqueza de organismos, já que o número de sequências utilizadas para análise não variou muito entre as amostras. O número de OTUs observado nesses sedimentos (Tabela 8) reafirma uma riqueza maior nas comunidades provenientes de sedimentos coletados na estação seca.

Novamente, foram obtidos os índices de riqueza e diversidade: ACE, CHAO, SHANNON, SIMPSON para estas amostras, conforme apresentados na tabela 9. Novamente, esta tabela apresenta também a cobertura, a qual indica em porcentagem o quanto a amostra ambiental analisada foi coberta com o número de sequências obtidas. Na tabela, sob *sobs* indica o número de OTUs observadas. Os coeficientes de riqueza e diversidade observados na tabela confirmam os resultados obtidos nas curvas de rarefação (Figura 17, 18, 19 e 20) e na tabela 8.

É interessante notar que os coeficientes indicam que a comunidade de *Archaea* nesses sedimentos não só apresenta maior riqueza na estação seca, como uma maior diversidade em comparação com a estação de transição seca/chuvosa. O índice SHANNON apresenta valores absolutos e é possível observar que para todos os níveis taxonômicos, este se manteve em valores mais altos nas amostras da estação seca (RIB4-M e RIB5-M). O índice SIMPSON, cujo valor indica maior diversidade quando mais próximo de 0, confirma tais dados, de forma que nas amostras da estação seca o valor

observado foi menor, sugerindo, portanto, que a comunidade de *Archaea* nestes sedimentos são mais diversos que os sedimentos da estação de transição seca/chuvosa.

Tabela 9. Índices de riqueza (Ace e Chao) e diversidade (Simpson e Shannon) para os sedimentos coletados na Bacia Baixo Inhacica

	Dissimilaridade	sobs	chao	ace	Shannon	Simpson	Cobertura
RIB4-M	3%	39	111,50	341,46	3,11	0,08	58,90%
	5%	30	87,75	176,19	2,70	0,12	69,86%
73	10%	17	35,00	41,44	2,01	0,24	87,67%
sequências	20%	8	9,50	10,41	0,95	0,59	95,89%
RIB5-M	3%	45	88,50	93,19	3,67	0,02	56,52%
	5%	33	79,20	165,50	3,12	0,05	68,12%
69	10%	20	50,33	99,24	2,05	0,23	79,71%
sequências	20%	10	12,50	15,00	0,93	0,64	92,75%
RIB4-S	3%	8	8,50	9,37	1,41	0,33	97,26%
	5%	6	6,00	6,45	1,29	0,35	98,63%
73	10%	2	2,00	0,00	0,45	0,72	100,00%
sequências	20%	1	1,00	0,00	0,00	1,00	100,00%
RIB5-S	3%	21	24,50	26,10	2,53	0,11	92,05%
	5%	12	13,00	12,65	2,06	0,16	97,73%
88	10%	5	5,00	5,00	1,23	0,34	100,00%
sequências	20%	2	2,00	0,00	0,68	0,50	100,00%

Além disso, mesmo com um número de sequências relativamente similar em todos os sedimentos, a cobertura das comunidades dos sedimentos da estação de transição seca/chuvosa foi muito mais alta que a observada nas comunidades dos sedimentos de estação seca. Isso corrobora os resultados apresentados até o momento, no sentido da comunidade da estação de transição exibir menor riqueza e diversidade.

Foi realizado também o alinhamento múltiplo entre RIB4-M, RIB5-M, RIB4-S e RIB5-S, com a finalidade de realizarmos análises comparativas das comunidades de *Archaea*. Para a realização do alinhamento múltiplo algumas sequências foram excluídas, no intuito de obter-se um alinhamento com sequências de tamanho maior que 340 pares de bases. A fim de verificarmos quantas OTUs eram compartilhadas entre as comunidades de sedimento,

foram confeccionados diagramas de Venn, utilizando-se os seguintes coeficientes de dissimilaridade 10% (Figura 21), 5% (Figura 22) e 3% (Figura 23).

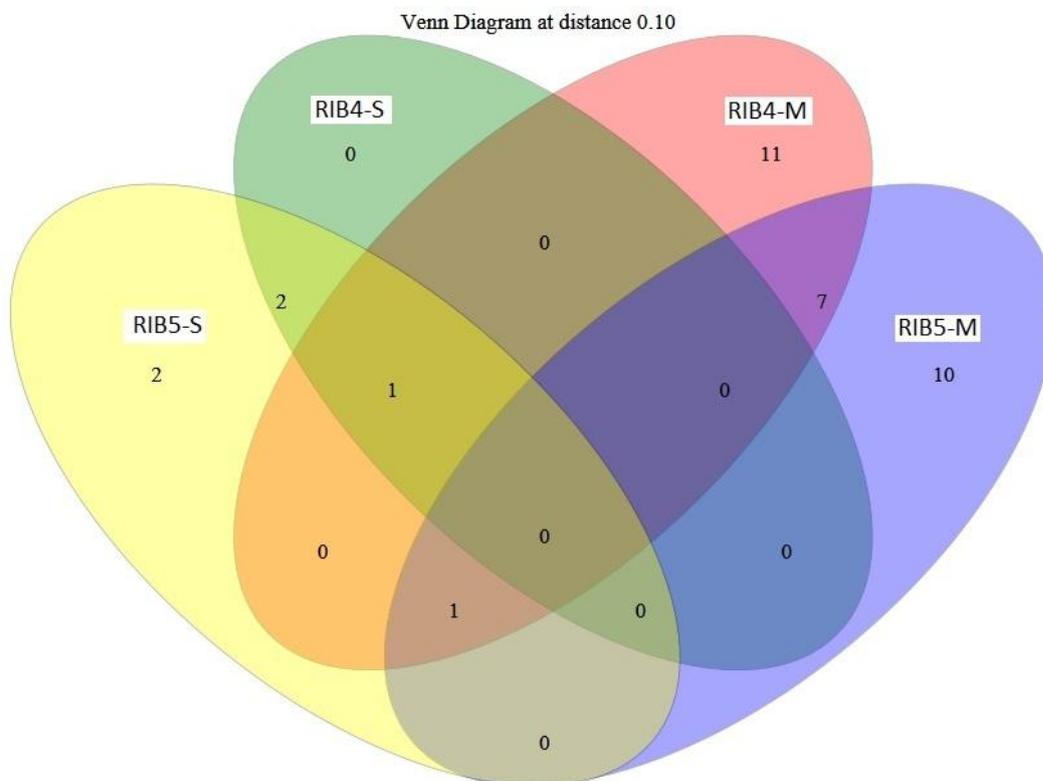


Figura 21. Diagrama de Venn representando o número de OTUs (10%) exclusivas em cada um dos sedimentos, além das compartilhadas. O coeficiente de dissimilaridade adotado é 10%, correspondendo à classe. RIB4-M e RIB5-M foram coletados em maio, sendo da estação seca. RIB4-S e RIB5-S foram coletados em setembro, sendo da estação de transição seca/chuvosa.

O diagrama de Venn ilustrado na figura 21 revela que RIB4 coletado em setembro (RIB4-S) não apresenta OTUs exclusivas referentes ao nível taxonômico de classe. Todas suas OTUs são compartilhadas por RIB5 coletado na mesma estação (RIB5-S). Isso indica que as sequências de RIB4-S estão contidas em RIB5-S, revelando também que a riqueza de RIB5-S é superior à de RIB4-S, apesar de ainda se tratarem de comunidades similares. Com relação aos sedimentos da estação seca (RIB4-M e RIB5-M), é possível observar que existem sete classes em comum entre tais amostras. No entanto temos onze OTUs em RIB4-M e dez OTUs em RIB5-M, referentes a nível de classe, que são exclusivas destes sedimentos. Novamente, tal fato poderia ser

explicado pela alta riqueza observada nas comunidades dos sedimentos coletados na seca.

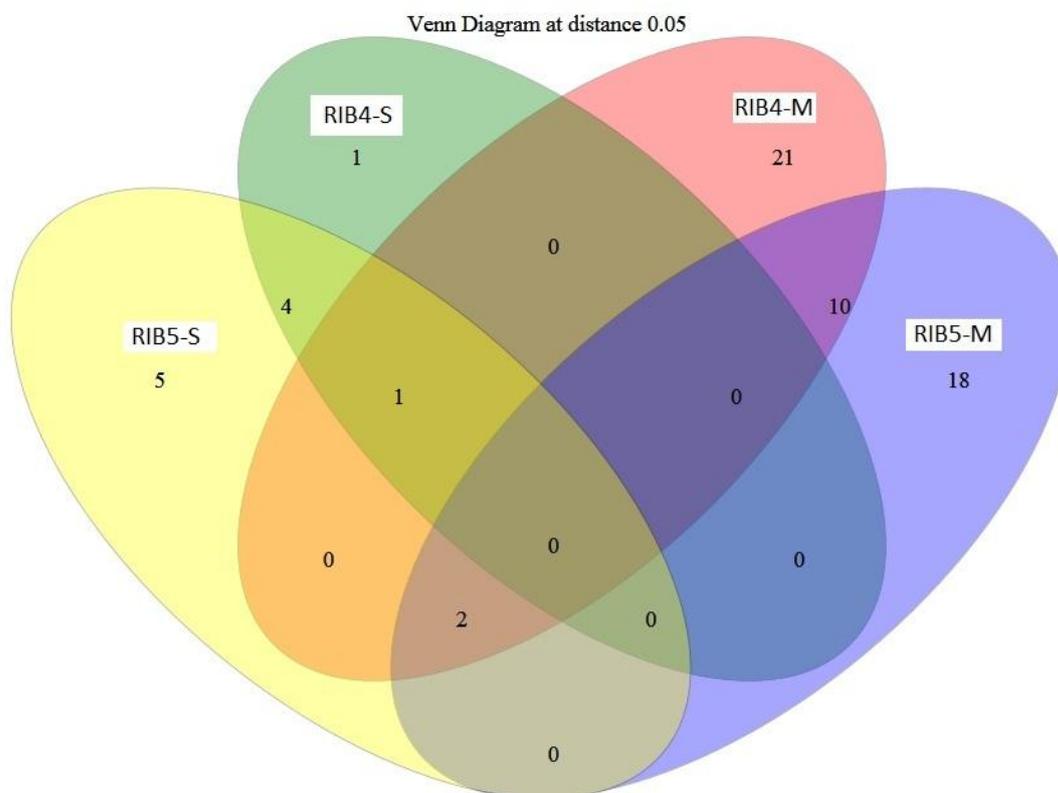


Figura 22. Diagrama de Venn representando o número de OTUs (5%) exclusivas em cada um dos sedimentos, além das compartilhadas. O coeficiente de dissimilaridade adotado é 5%, correspondendo à gênero. RIB4-M e RIB5-M foram coletados em maio, sendo da estação seca. RIB4-S e RIB5-S foram coletados em setembro, sendo da estação de transição seca/chuvosa.

O diagrama de Venn da figura 22, referente a diferentes gêneros, revela uma diminuição no número de OTUs compartilhadas. No entanto, ainda é possível observar que mesmo com apenas 5% de dissimilaridade, RIB4-S está em sua maior parte contido em RIB5-S, apresentando apenas uma OTU exclusiva. No caso dos sedimentos coletados na estação de seca, é possível observar doze gêneros compartilhados. Este diagrama revela, como esperado, um grande aumento no número de OTUs exclusivas, quando comparado ao diagrama de Venn obtido para o nível taxonômico de classe (Figura 21).

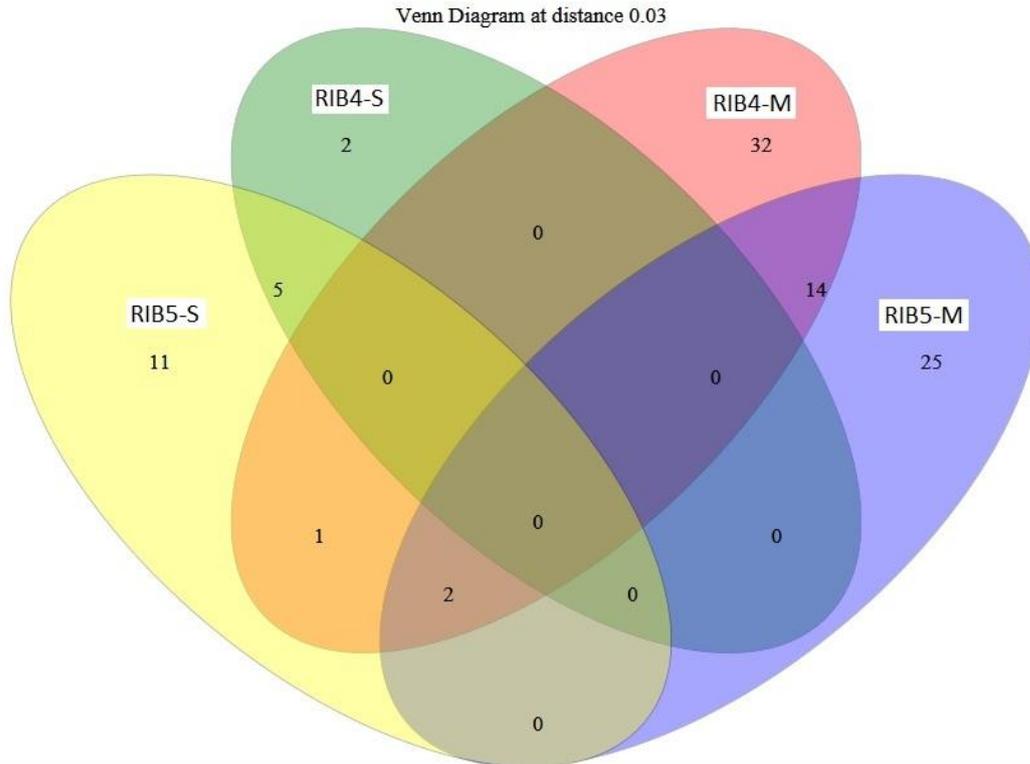


Figura 23. Diagrama de Venn representando o número de OTUs (3%) exclusivas em cada um dos sedimentos, além das compartilhadas. O coeficiente de dissimilaridade adotado é 3%, correspondendo à espécie. RIB4-M e RIB5-M foram coletados em maio, sendo da estação seca. RIB4-S e RIB5-S foram coletados em setembro, sendo da estação de transição seca/chuvosa.

O diagrama de Venn da figura 23, referente ao nível taxonômico de espécie, confirma a tendência dos resultados observados até então, uma vez que nos sedimentos coletados na estação de transição seca/chuvosa foi possível observar uma maior riqueza em RIB5-S, com RIB4-S permanecendo, em grande parte, contido em RIB5-S, apresentando apenas duas OTUs exclusivas. Nas comunidades referentes aos sedimentos coletados na estação de seca é possível observar uma alta riqueza de espécies em ambos, com quatorze OTUs compartilhadas. Isso sugere que RIB4-M e RIB5-M são réplicas sujeitas a alterações decorrentes de fatores ambientais, que podem ter contribuído para as diferenças observadas.

O fato das comunidades observadas nos sedimentos coletados na estação de transição seca/chuvosa não terem tido a mesma variação entre si pode ser explicado devido à sua menor riqueza de espécies. No entanto, o menor número de espécies encontradas na estação de transição

seca/chuvosa, quando comparamos as comunidades de ambas as estações, é sugestiva. É possível que as alterações físico-químicas induzidas nesses sedimentos pela ocorrência de chuvas possa ter sido um fator determinante nas mudanças observadas nas comunidades.

É importante notar que foram detectadas poucas OTUs, com coeficiente de dissimilaridade de 3%, compartilhadas por sedimentos de ambas as estações, sugerindo que as comunidades de *Archaea* dos sedimentos analisados sofrem bastante influência de mudanças ambientais. É possível ainda que as diferenças encontradas entre as comunidades das réplicas, RIB4 e RIB5, em período de seca especialmente, possa ter sido decorrente de pequenas alterações presentes nos diferentes pontos de coleta. Apesar do pH destes sedimentos não ter variado muito, a quantidade de fósforo e nitrogênio difere bastante quando comparamos os sedimentos de ambas as estações (Tabela 3). Essas diferenças podem ter contribuído para uma menor riqueza da comunidade nos sedimentos coletados em setembro.

5.6.4. Análises de beta-diversidade

A Beta-diversidade é uma análise que descreve as diferenças na composição de espécies entre diferentes ambientes, e pode ser estimada por testes estatísticos de hipótese alternativos aos baseados em OTUs (Forney *et al.*, 2004). Dentre estes testes, podemos citar o β -Libshuff (Schloss *et al.*, 2004) e Unifrac (Lozupone *et al.*, 2006).

O β -Libshuff é um teste que compara as comunidades de diferentes ambientes par a par e formula uma significância, que indica se a comunidade estudada é única de seu local. Esse teste permite também observarmos se uma amostra consiste em uma sub-amostra de outra.

O valor p gerado pelo β -Libshuff deve ser corrigido pela correção de Bonferroni, possibilitando assim avaliar a significância entre amostras. Os testes de Beta-diversidade foram realizados a partir do alinhamento múltiplo, incluindo as amostras RIB4-M, RIB5-M, RIB4-S e RIB5-S. Assim como no caso da construção dos diagramas de Venn, a amostra LRPA não foi incluída nessas análises, novamente devido a suas sequências terem sido obtidas por um par de iniciadores diferente.

Os resultados obtidos com o teste χ^2 -Libshuff para as amostras RIB4-M, RIB5-M, RIB4-S e RIB5-S podem ser observados na tabela 10. As amostras coletadas na seca, RIB4-M e RIB5-M, não apresentaram diferença significativa, mesmo sendo possível observar OTUs exclusivas em cada uma dessas réplicas nos diagramas de Venn (Figuras 21, 22 e 23). Dessa maneira, segundo o teste de χ^2 -Libshuff, RIB4-M e RIB5-M podem ser consideradas réplicas. Para as amostras coletadas na estação de transição seca/chuvosa, RIB4-S e RIB5-S, foi possível observar que não existe diferença significativa na comparação RIB4-S/RIB5-S. No entanto, na comparação inversa de RIB5-S com RIB4-S houve diferença significativa, indicando que RIB4-S é uma subamostra de RIB5-S. Esses dados confirmam o observado nos diagramas de Venn, de forma que podemos concluir que a comunidade de RIB4-S está de fato contida na comunidade de RIB5-S. Todas as demais comparações entre os sedimentos analisados revelaram a ocorrência de diferenças significativas entre as comunidades.

Tabela 10. Teste de hipótese Libshuff entre as amostras coletadas na seca (RIB4-M e RIB5-M) e na estação de transição seca/chuvosa (RIB4-S e RIB5-S)

Comparação	dCXYScore	valor ρ	Significância se $\rho=0,05/12=0,0041$
RIB4-M/RIB4-S	0.12000498	<0.0001	Significativo
RIB4-S/RIB4-M	0.12941969	<0.0001	Significativo
RIB4-M/RIB5-M	0.00045136	0.4132	Não
RIB5-M/RIB4-M	0.00025435	0.7710	Não
RIB4-M/RIB5-S	0.01103596	<0.0001	Significativo
RIB5-S/RIB4-M	0.05617532	<0.0001	Significativo
RIB4-S/RIB5-M	0.18462745	<0.0001	Significativo
RIB5-M/RIB4-S	0.12805991	<0.0001	Significativo
RIB4-S/RIB5-S	0.00026194	0.1861	Não
RIB5-S/RIB4-S	0.00784268	<0.0001	Significativo
RIB5-M/RIB5-S	0.01548516	<0.0001	Significativo
RIB5-S/RIB5-M	0.11920140	<0.0001	Significativo

É interessante observar que, em sua maioria, houve um agrupamento entre as comunidades de coletas das mesmas estações. Sabe-se que membros do domínio *Archaea* podem se agrupar conforme o ambiente e habitat (Auguet, 2009). Assim, temos mais um indício de que as alterações

induzidas nos sedimentos pela mudança de estação desempenharam papel determinante nas comunidades dos sedimentos analisados. Naturalmente, para confirmar esta possibilidade seria interessante verificar essas mudanças em outros anos.

Para avaliar a diferença da estrutura entre as comunidades dos sedimentos coletados em diferentes estações, foi utilizado o programa Unifrac (Lozupone *et al.*, 2006). Neste teste, uma árvore filogenética no formato Newick foi utilizada como *input* e, após sua análise no Unifrac, foi possível observar as diferenças das comunidades. A visualização das diferenças entre as comunidades por esse teste é possível a partir do gráfico de Análise das Principais Coordenadas (PCA) (Figura 24).

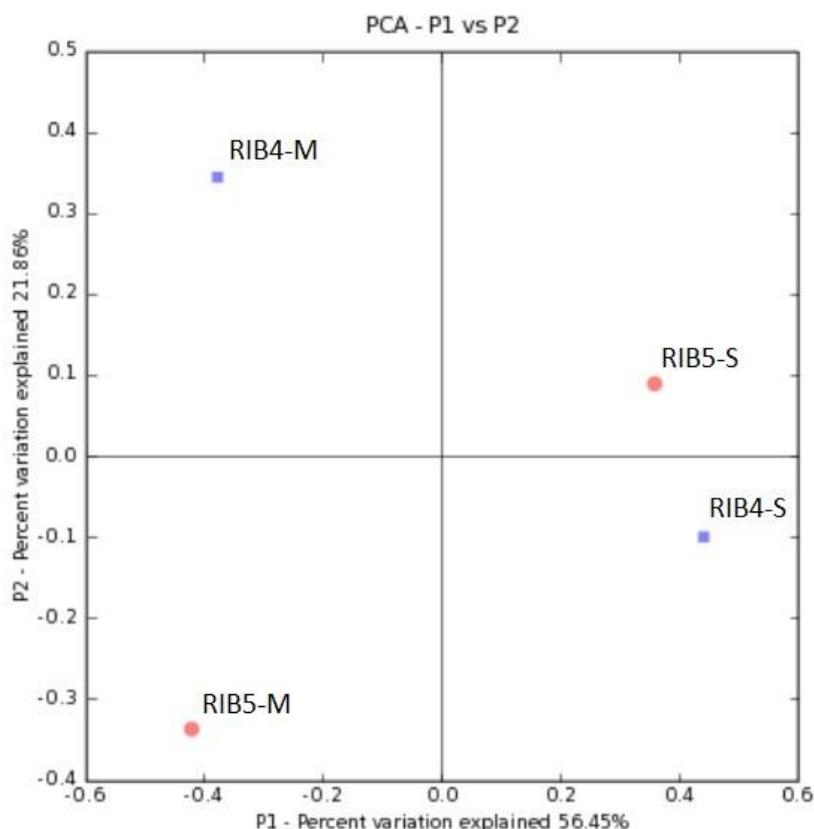


Figura 24. Gráfico de Análise das Principais Coordenadas (PCA) construído com o programa Unifrac (Lozupone *et al.*, 2006), demonstrando o agrupamento das sequências obtidas a partir dos sedimentos coletados. RIB4-M indica uma das réplicas coletadas na seca, enquanto que RIB4-S indica o mesmo ponto na estação de transição seca/chuvosa. RIB5-M é a réplica de RIB4-M, coletada em outro ponto na mesma estação, enquanto RIB5-S é a réplica de RIB4-S.

No gráfico PCA obtido é possível observar que houve diferença entre os sedimentos coletados na estação seca e na estação de transição seca/chuvosa. Houve uma maior aproximação entre as réplicas da estação de

transição seca/chuvosa, RIB4-S e RIB5-S, do que entre as réplicas da estação seca, RIB4-M e RIB5-M. O posicionamento dessas réplicas no gráfico PCA pode ter sido decorrente da alta riqueza das comunidades observadas na estação seca. Além disso, o PCA é gerado ao se comparar todas as comunidades simultaneamente, enquanto no teste β -Libshuff essa comparação é feita aos pares. Tal fato pode ter ressaltado as diferenças existentes entre as comunidades. É importante observar a porcentagem da variação indicada nos eixos, de maneira que variações observadas no eixo vertical representam uma porcentagem menor do que no eixo horizontal. Isso indica que as diferenças entre as réplicas de uma mesma estação são menores do que entre as réplicas de estações diferentes.

Assim, ambas as análises feitas para Beta-diversidade indicam que há uma diferença significativa entre as comunidades observadas nos sedimentos coletados em diferentes estações.

5.6.5. Construção de árvores filogenéticas

A construção de árvores filogenéticas foi realizada a partir do alinhamento múltiplo entre as sequências representativas das comunidades estudadas com sequências disponíveis em banco de dados. A seleção de sequências representativas foi feita com o programa MOTHUR (Schloss *et al.*, 2009), e o coeficiente de dissimilaridade de 3% foi adotado, correspondendo a OTUs em nível taxonômico de espécie.

Foram também selecionadas sequências previamente descritas de isolados de *Archaea* dos filos Euryarchaeota e Crenarchaeota, assim como dos filos propostos Thaumarchaeota e Korarchaeota para os sedimentos coletados na bacia Baixo Inhacica. Como grupo externo, foi escolhida uma sequência de uma Acidobacteria ainda não cultivada. Estas sequências foram alinhadas com as sequências representantes de OTUs para a construção de árvores filogenéticas, com a intenção de melhor estimar a possível classificação das sequências obtidas a partir dos sedimentos analisados.

Para a construção das árvores, foram selecionados os seguintes isolados do filo Euryarchaeota: *Methanosaeta thermophila*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanocella paludicola*, *Methanoregula boonei*, *Methanospirillum*

hungatei, *Methanosphaera stadtmanae*, *Thermogymnomonas acidicola*, *Pyrococcus furiosus* e *Archaeoglobus profundus*. No entanto, nenhuma das sequências obtidas na estação de transição seca/chuvosa apresentou alinhamento significativo com as sequências selecionadas. Assim, no intuito de proporcionar uma melhor visualização, nessas árvores foram mantidos apenas os isolados *Methanosaeta thermophila* e *Methanosarcina acetivorans* (Figura 28 e 29). Foram incluídos também isolados representantes do filo Crenarchaeota: *Sulfolobus solfataricus*, *Ignicoccus hospitalis*, *Thermoproteus neutrophilus*, *Pyrobaculum islandicum*, *Staphylothermus hellenicus*, *Ignicoccus pacificus*, *Ignisphaera aggregans*, *Fervidicoccus fontis*, *Caldisphaera lagunensis* e *Thermocladium modestius*.

Alguns isolados do grupo I de Crenarchaeota são classificados como Thaumarchaeota por alguns autores (Brochier-Armanet *et al.*, 2011). Nesta dissertação, essa será a classificação utilizada para esses organismos. Assim, como representantes do filo Thaumarchaeota foram selecionados os seguintes isolados do grupo I.1a: *Crenarchaeum symbiosum* (Preston *et al.*, 1996); *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* (Konneke *et al.*, 2005); *Giganthauma karukareense*, *Giganthauma insulaporcus* (Muller *et al.*, 2010) e *Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis* (Jung *et al.*, 2011). Foram escolhidos também os seguintes representantes do grupo I.1b: *Nitrososphaera gargensis* (Hatzenpichler *et al.*, 2008), *Nitrososphaera viennensis* (Tourna *et al.*, 2010) e *Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii* (de la Torre *et al.*, 2008). A grande maioria destes isolados, excluindo-se as espécies de *Giganthauma*, apresenta o gene *amoA*, que codifica a enzima amônia monooxigenase, envolvida na oxidação de amônia.

O método *Neighbor-Joining* foi utilizado para a construção das árvores filogenéticas. Esse método foi escolhido por ser o mais simples e mais utilizado para construção de árvores envolvendo sequências de genes de rRNA 16S, gerando árvores filogenéticas a partir de uma matriz de distância (Saitou e Nei, 1987). A figura 25 apresenta a árvore filogenética de *Archaea* construída a partir das sequências obtidas do sedimento da amostra LRPA, com o par de iniciadores 340f/1000r.

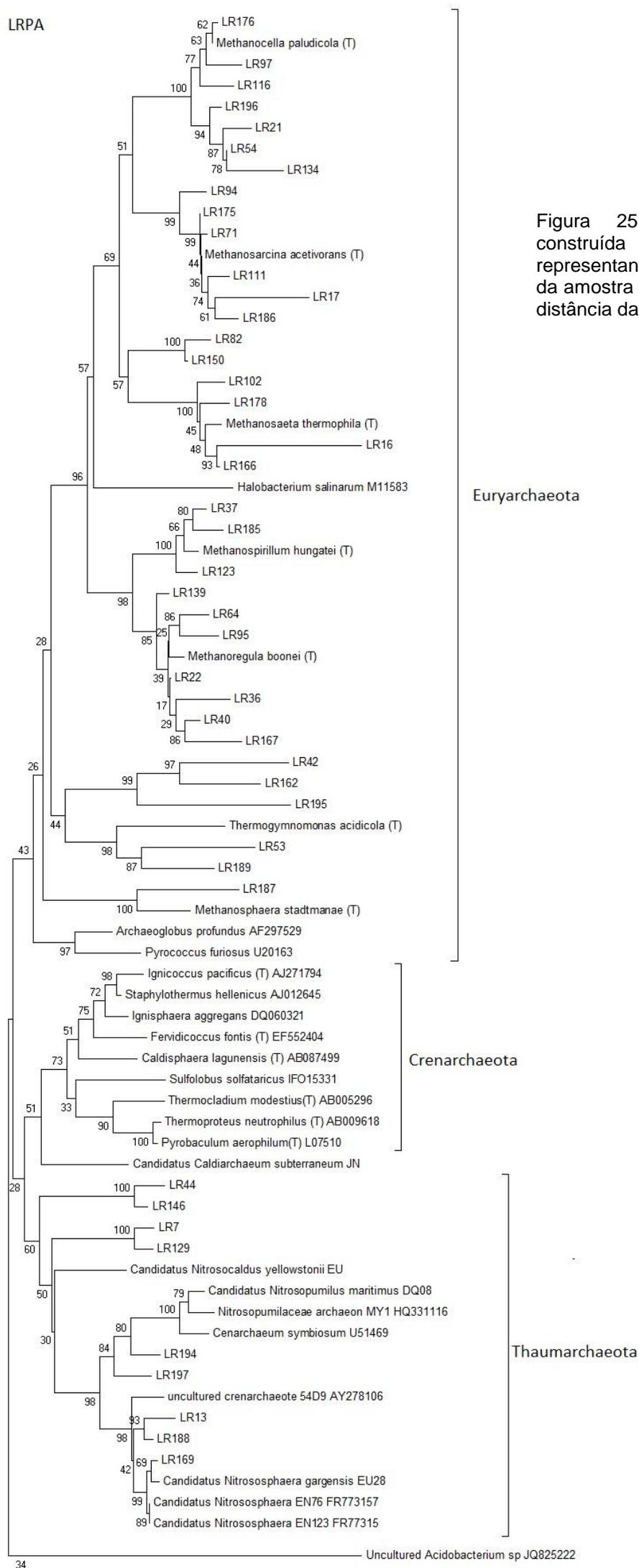


Figura 25. Árvore filogenética construída a partir dos representantes de cada OTU (3%) da amostra LRPA. A escala indica a distância da similaridade dos ramos.

A análise da árvore relativa à amostra LRPA (figura 25) revela grande predomínio de sequências afiliadas ao filo Euryarchaeota, como anteriormente verificado, quando do alinhamento das sequências contra sequências depositadas no banco RDP. Dentre estas, foi observada predominância e alta riqueza de organismos metanogênicos. Sedimentos são normalmente ricos em matéria orgânica (Torres *et al.*, 2010) e, além disso, esse sedimento específico foi coletado em uma lagoa próxima a pasto para gado. Sabe-se que archaeas metanogênicas são comuns em rúmen (Jarvis, 2000). Assim, é possível que a proximidade do pasto tenha sido um fator que favoreceu o alto predomínio desses organismos.

Podemos observar também a ausência de sequências afiliadas ao filo Crenarchaeota. Todas as sequências não afiliadas a Euryarchaeota se agruparam com os isolados do filo Thaumarchaeota. No alinhamento prévio contra o banco de dados RDP (Figura 13), a classificação para a comunidade deste sedimento revelou 27 sequências classificadas como Crenarchaeota. Antes da proposta do novo filo Thaumarchaeota, alguns de seus membros eram considerados membros mesófilos de Crenarchaeota (Brochier-Armanet *et al.*, 2011; Nunoura *et al.*, 2011). Assim, a diferença observada entre a árvore filogenética da figura 25 e o resultado do alinhamento contra o banco de dados RDP deve-se ao fato deste banco de dados ainda não levar em conta a existência do filo Thaumarchaeota, de forma que as sequências referentes a este filo são classificadas como Crenarchaeota (Kan, 2011).

As figuras 26 e 27, apresentam as árvores filogenéticas construídas a partir de OTUs representativas de espécie (3%) para as amostras RIB4-M e RIB5-M, coletadas na estação de seca. As sequências de todas as análises do estudo do possível efeito da estação na comunidade foram obtidas com o par de iniciadores 21f/958r. Com o intuito de facilitar a visualização, as sequências de RIB4-M são representadas com a letra K e as sequências de RIB5-M são representadas com a letra L.

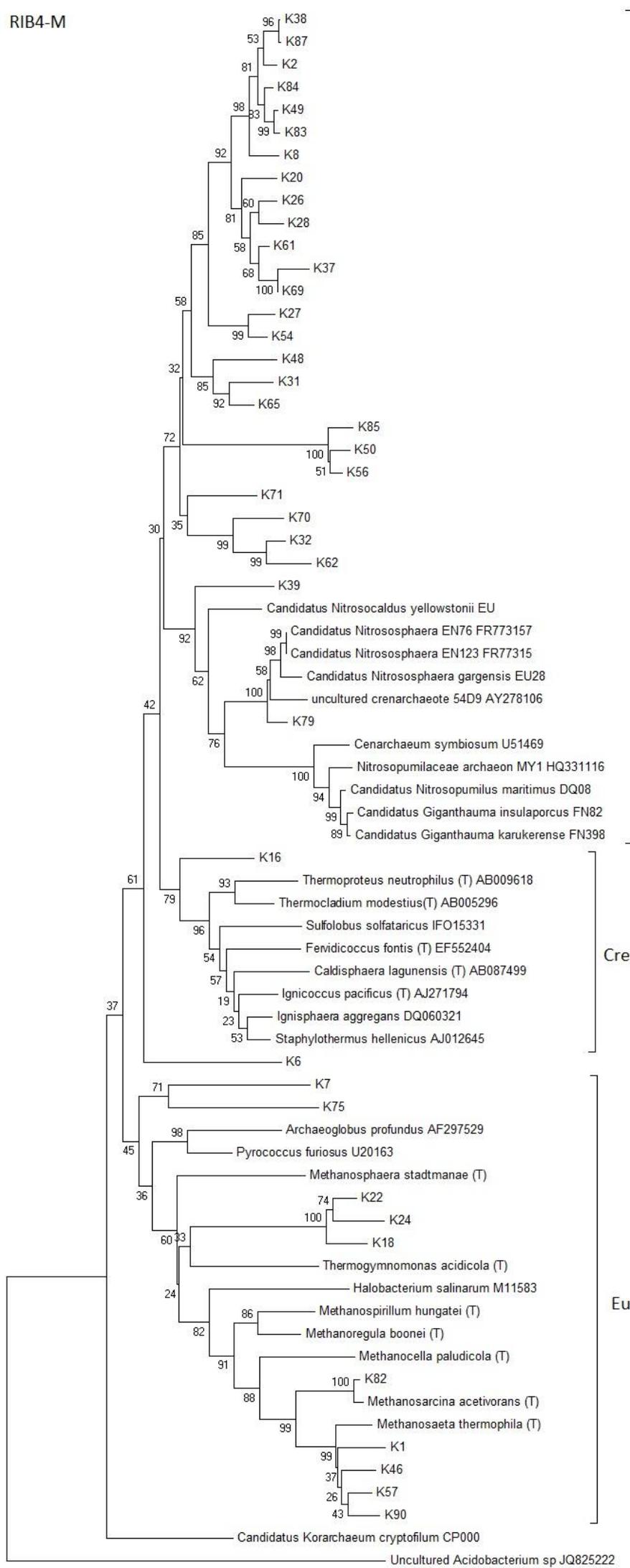


Figura 26. Árvore filogenética construída a partir dos representantes de cada OTU (3%) da amostra RIB4-M. A escala indica a distância da similaridade dos ramos.

Thaumarchaeota

Crenarchaeota

Euryarchaeota

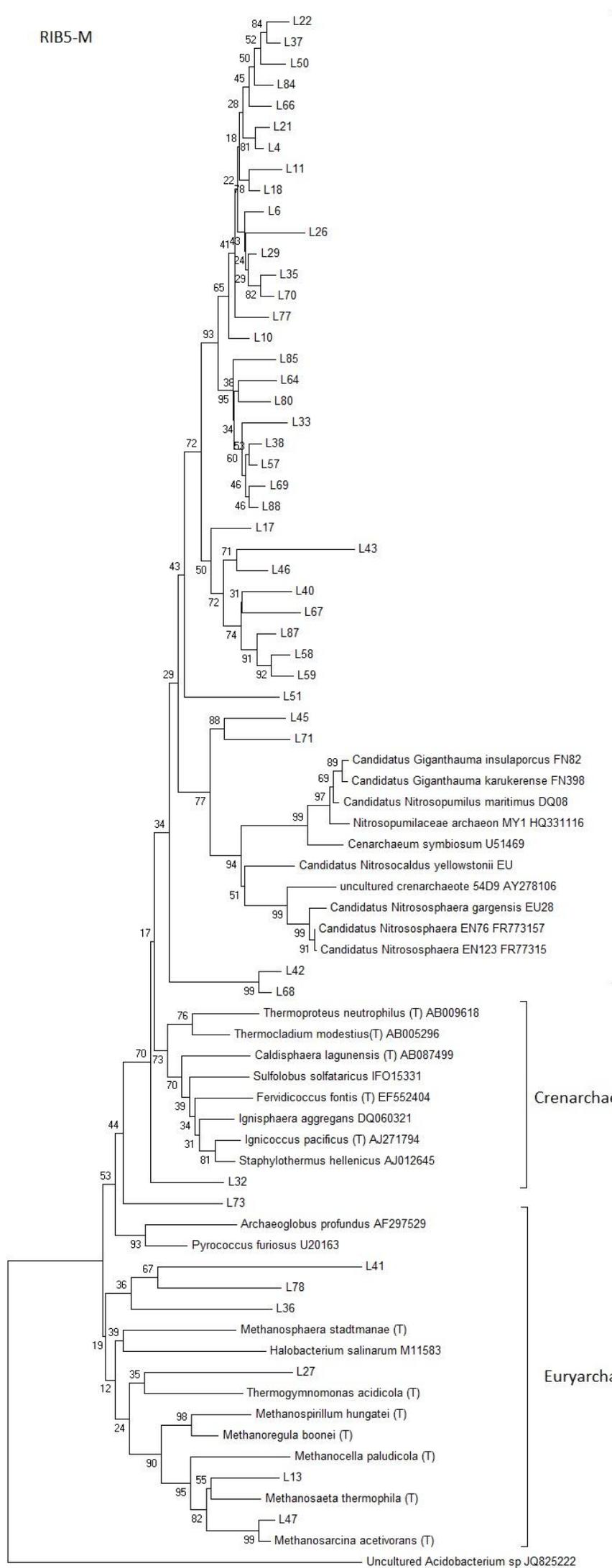


Figura 27. Árvore filogenética construída a partir dos representantes de cada OTU (3%) da amostra RIB5-M. A escala indica a distância da similaridade dos ramos.

Thaumarchaeota

Crenarchaeota

Euryarchaeota

As árvores filogenéticas das comunidades dos sedimentos RIB4 e RIB5 coletados na estação seca revelam distribuição similar, com a grande maioria das sequências afiliadas ao filo Thaumarchaeota, anteriormente classificadas como crenarchaeotas mesófilas. Curiosamente, as duas amostras de sedimento revelaram um grande número de sequências provavelmente ainda não descritas do filo Thaumarchaeota. A maioria das sequências de Thaumarchaeota utilizadas na construção da árvore foi isolada de ambientes aquáticos, o que é coerente com o tipo de ambiente analisado neste trabalho.

Poucas sequências foram alinhadas ao filo Crenarchaeota em ambos os sedimentos. Tendo em vista que os membros mesófilos deste filo são considerados atualmente do filo Thaumarchaeota (Brochier-Armanet *et al.*, 2011), os representantes de Crenarchaeota utilizados para construção das árvores são em maior parte termófilos, algo que não condiz com a amostra estudada. Assim, o baixo número de sequências alinhadas com esse filo é coerente com o ambiente estudado, sendo que a temperatura da água no caso desses sedimentos era de aproximadamente 25°C.

O resultado do alinhamento das sequências obtidas neste trabalho com o banco de dados *Ribosomal Database Project (RDP)* é compatível com o observado nas árvores filogenéticas, de modo que o número de sequências classificadas como do filo Euryarchaeota foi abaixo do esperado para um sedimento de lagoa. Como mencionado anteriormente, é possível que isso tenha ocorrido devido a algum tipo de viés introduzido pelo par de iniciadores de PCR utilizado na amplificação dos fragmentos do gene de rRNA 16S. No entanto, as sequências obtidas e afiliadas ao filo Euryarchaeota alinharam em quase sua totalidade com membros metanogênicos. A exceção, em ambos os casos, foi o alinhamento das sequências K18, K22, K24 e L27 com o organismo acidófilo *Thermogymnomonas acidicola*. O alinhamento com organismos metanogênicos é esperado, tendo em vista que sedimentos de lagoas são ambientes ricos em matéria orgânica e com baixos teores de oxigênio, características que favorecem a metanogênese (Thauer, 1998).

As figuras 28 e 29, apresentam as árvores filogenéticas construídas a partir de OTUs representativas de espécie (3%) para as amostras RIB4-S e RIB5-S, coletadas na estação de transição seca/chuvosa. As sequências de

RIB4-S são representadas com a letra KS e as sequências de RIB5-M são representadas com a letra LS.

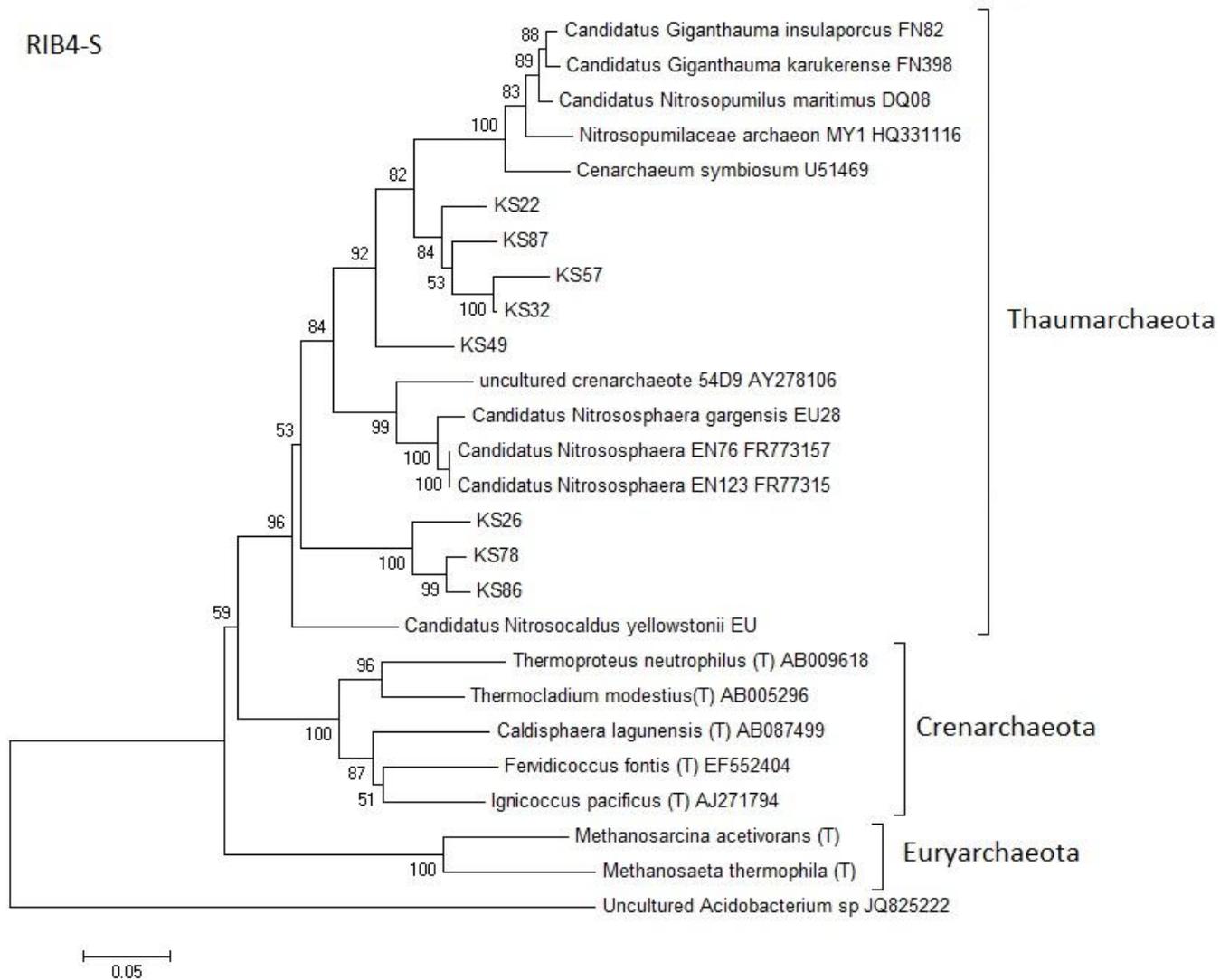


Figura 28. Árvore filogenética construída a partir dos representantes de cada OTU (3%) da amostra RIB4-S. A escala indica a distância da similaridade dos ramos.

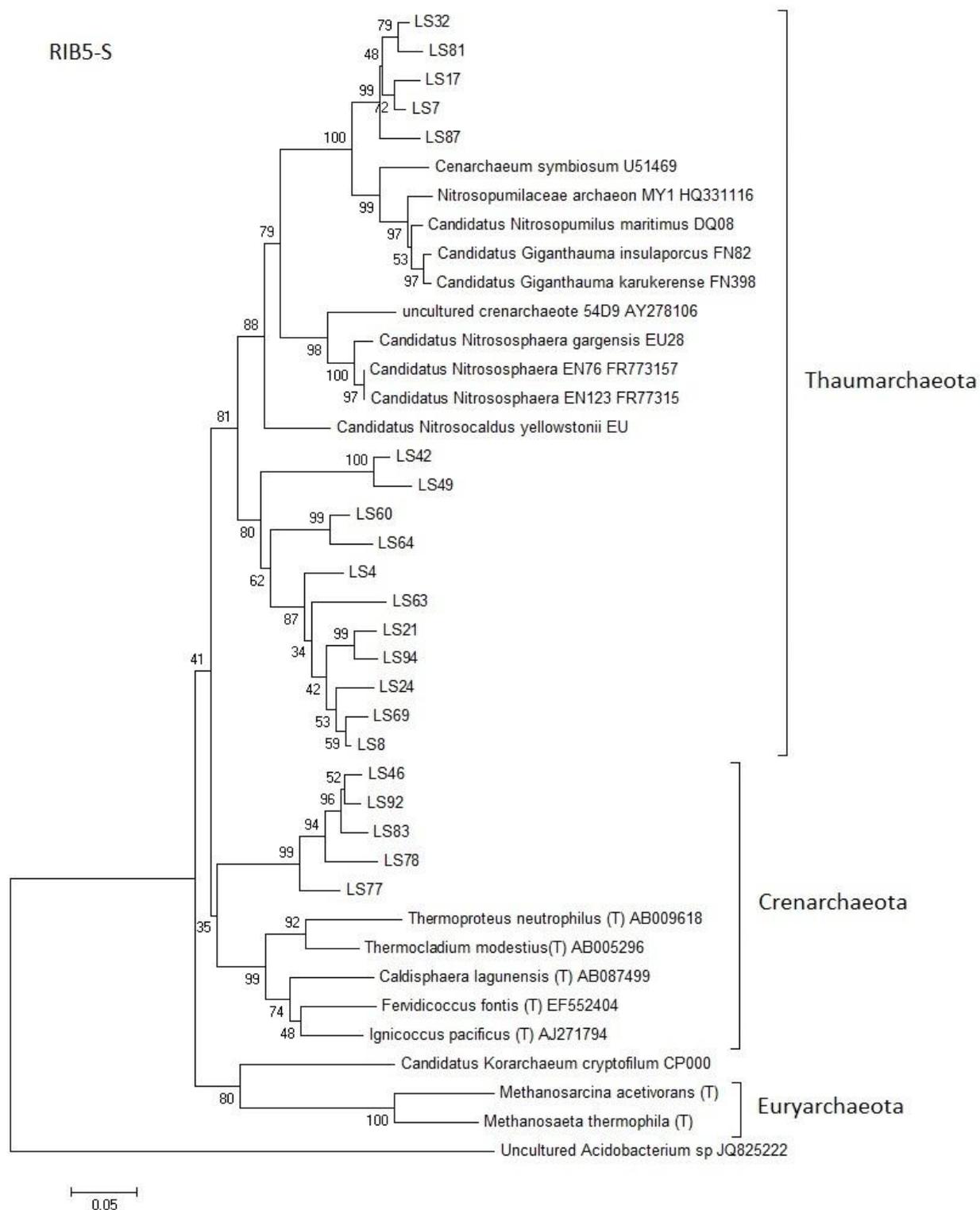


Figura 29. Árvore filogenética construída a partir dos representantes de cada OTU (3%) da amostra RIB5-S. A escala indica a distância da similaridade dos ramos.

O padrão observado nas árvores filogenéticas construídas para as comunidades dos sedimentos coletados na estação de transição seca/chuvosa revela uma distribuição similar entre si, mas bastante distinto daquele apresentado nas árvores construídas para as comunidades dos sedimentos coletados na estação seca (Figuras 26 e 27). É possível observar que, no caso do sedimento RIB4-S (Figura 28), todas as OTUs representativas foram alinhadas com o filo Thaumarchaeota. Não foi possível observar o alinhamento com qualquer outro filo. No caso da árvore construída para a comunidade do sedimento RIB5-S (Figura 29), a maioria das OTUs representativas afiliou-se ao filo Thaumarchaeota. No entanto, foi possível observar algumas OTUs agrupadas no filo Crenarchaeota. Em ambos os casos não houve OTUs alinhadas com o filo Euryarchaeota na estação de transição seca/chuvosa.

Como mencionado anteriormente, os isolados escolhidos do filo Thaumarchaeota apresentam indícios, em sua maioria, de metabolismo de nitrificação. As primeiras chuvas da estação provavelmente causaram perturbações na água, levando aos processos de ressuspensão e re-deposição da superfície do sedimento, afetando sua composição físico-química (Wetzel, 2001). A análise físico-química dos sedimentos revelou que na estação de transição seca/chuvosa os sedimentos apresentavam teor aumentado de nitrogênio total (Tabela 3). Além disso, as sequências representativas de maior número de OTUs, KS 32 e LS8, foram alinhadas com organismos nitrificadores do filo Thaumarchaeota. Assim, pode-se sugerir que o aumento de compostos nitrogenados no ambiente, decorrentes da mudança da estação, favoreceu o crescimento destes organismos em detrimento de membros do filo Euryarchaeota. O fato de não terem sido encontradas OTUs afiliadas a este filo nesta estação não significa que esses organismos de fato não estejam presentes, tendo em vista os possíveis vieses introduzidos pelos iniciadores de PCR utilizados no trabalho. No entanto, sabendo que o mesmo par de iniciadores foi utilizado no estudo da influência da estação na comunidade de *Archaea*, pode-se concluir que houve uma diminuição no número de organismos do filo Euryarchaeota.

O perfil das comunidades observado nas figuras 28 e 29 corrobora os resultados obtidos nos diagramas de Venn (Figura 21, 22 e 23) e no teste de Beta-diversidade β -Libshuff (Tabela 10). É possível observar um alinhamento

em comum entre as árvores das réplicas RIB4-S e RIB5-S, no sentido de se observar uma alta incidência de OTUs afiliadas a Thaumarchaeota. No entanto, enquanto todas as OTUs representativas em RIB4-S estão contidas em Thaumarchaeota, em RIB5-S algumas sequências afiliaram-se ao filo Crenarchaeota. A partir desses dados, podemos constatar novamente que a comunidade de RIB4-S consiste em uma sub-amostra de RIB5-S.

Podemos ainda verificar que, apesar da utilização de pares distintos de iniciadores nas amostras LRPA e RIB, a maioria das sequências classificadas como Crenarchaeota no banco de dados *Ribosomal Database Project (RDP)* foram alinhadas, nas árvores filogenéticas, com o filo Thaumarchaeota. Novamente, isto poderia ser explicado pelo fato de a classificação feita no RDP ainda não levar em conta o novo filo Thaumarchaeota. Assim, é possível que este filo seja mais abundante em amostras de sedimento de lagoa do cerrado que o filo Crenarchaeota.

6. Considerações finais

Esse trabalho apresenta a primeira descrição da riqueza de *Archaea* em sedimentos de lagoas do cerrado. Além disso, é o primeiro estudo a analisar o efeito de estações na comunidade de *Archaea* nesses ambientes. No entanto, foram analisadas apenas comunidades de sedimentos coletados na estação seca e estação de transição seca/chuvosa, de maneira que é possível que existam variações na comunidade nas estações de chuva e de transição chuva/seca.

Vários trabalhos relatam a predominância de membros metanogênicos do filo Euryarchaeota em sedimentos de lagoa. Apesar de em um dos sedimentos analisados tal característica ter sido observada, nos demais houve um número consideravelmente pequeno de organismos desse filo. Este fato pode ser decorrente das características individuais dos sedimentos analisados, mas também é possível que o uso de diferentes pares de iniciadores no estudo tenha influenciado os resultados obtidos.

A presença de sequências de fragmentos de genes de rRNA 16S de organismos metanogênicos nos permite inferir que a metanogênese é uma via metabólica que provavelmente ocorre nos ambientes analisados. Não é possível, no entanto, concluir a ocorrência de outras vias metabólicas. Apesar disso, pode-se especular um potencial nitrificador por parte das sequências dos organismos que se agruparam ao filo Thaumarchaeota pelo fato de ter ocorrido um alinhamento com isolados participantes do ciclo de nitrogênio.

Para uma análise mais completa dos ambientes estudados, seria interessante o uso de outros marcadores filogenéticos, como proteínas ribossomais, em conjunto com genes que codificam o rRNA 16S. No entanto, considerando que este estudo corresponde à primeira análise da diversidade de *Archaea* em sedimentos de lagoa do cerrado e da influência das estações nessas comunidades, nossos resultados permitem inferir características sobre as comunidades de *Archaea* nas amostras analisadas.

7. Conclusões

- A Lagoa Rio Preto Alto (LRPA) apresenta uma grande quantidade de organismos metanogênicos, do filo Euryarchaeota. Esse dado é similar ao encontrado em vários trabalhos sobre a diversidade de *Archaea* em sedimentos de lagoa.
- Nos sedimentos coletados na bacia Baixo Inhacica (RIB4 e RIB5) foi possível observar um maior número de membros do filo Thaumarchaeota em ambas estações.
- Foi possível observar uma maior riqueza e diversidade nos sedimentos coletados na estação seca em comparação com os coletados na estação de transição seca/chuvosa.
- Não foram encontrados organismos do filo Euryarchaeota nos sedimentos coletados na estação de transição seca/chuvosa. O fato de esses organismos terem sido encontrados, mesmo em menor número, na estação de seca nos permite especular que alguma alteração no ambiente decorrente da presença de chuvas levou ao desfavorecimento destes organismos.
- A grande ocorrência de sequências associadas ao filo Thaumarchaeota, em conjunto com o aumento da quantidade de nitrogênio total nos sedimentos da estação de transição seca/chuvosa nos permite sugerir a possibilidade de o aumento de nitrogênio ter favorecido organismos nitrificadores do filo Thaumarchaeota, em detrimento de organismos do filo Euryarchaeota.
- Houve diferenças significativas entre as comunidades de sedimentos de diferentes estações nos testes estatísticos de beta-diversidade. Além disso, o teste χ^2 -Libshuff concluiu que as amostras coletadas nas mesmas estações podem ser, em geral, consideradas réplicas.
- As curvas de rarefação mostraram que a amostragem foi suficiente para os sedimentos LRPA, RIB4-S e RIB5-S. No entanto, mais sequências seriam necessárias para se obter uma maior cobertura em RIB4-M e RIB5-M, um indicativo de sua maior riqueza em comparação com RIB4-S e RIB5-S.

8. Perspectivas

- O uso de diferentes iniciadores de PCR neste trabalho levanta a questão de possíveis vieses de amplificação. Assim, uma análise de diversidade e filogenia utilizando-se diferentes pares de iniciadores para o domínio *Archaea* em uma mesma amostra ambiental pode ser interessante no sentido de se verificar essa questão.
- Ensaio de PCR quantitativa utilizando pares de iniciadores para o gene *amoA* podem ser úteis para verificar a ocorrência de metabolismo de nitrificação nos ambientes estudados, tendo em vista que este metabolismo é comumente encontrado em organismos do filo Thaumarchaeota.
- Análises de transcriptoma para genes centrais nas vias de nitrificação e de metanogênese também podem ser interessantes para verificar a ocorrência dessas vias metabólicas nos sedimentos estudados.
- A tentativa de cultivo de *Archaea* de sedimentos de lagoa do cerrado pode trazer novas informações para um entendimento maior dessas comunidades, sua fisiologia e seu papel nos ciclos ecológicos.
- Pelo fato de ter sido encontrado um alto número de sequências de organismos provavelmente ainda não descritos nos sedimentos da estação seca, seria interessante o cultivo em cultura pura de alguns desses organismos, para posteriores análises de genoma completo.
- Análises da presença de possíveis genes de interesse biotecnológico seriam interessantes para verificar uma possível aplicação dos organismos encontrados na indústria.
- Este trabalho apresenta indícios de um possível efeito da estação na comunidade de *Archaea* de sedimentos de lagoa. Assim, os resultados aqui encontrados podem ser úteis para outros estudos, sejam eles de diversidade, filogenia ou metagenoma. As evidências aqui encontradas podem ser um fator a ser considerado no planejamento do desenho experimental de estudos futuros.

Referências Bibliográficas

- Albers, S.V.; Meyer, B.H. (2011). The archaeal cell envelope. **Nature reviews. Microbiology**, 9(6), 414-26.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2004). Capítulo 4 DNA e Cromossomos. **Biologia Molecular da Célula**. 4ª Edição – Porto Alegre, Artmed, p. 191-234.
- Antony, C.P.; Murrell, J.C.; Shouche, Y.S. (2011). Molecular diversity of methanogens and identification of *Methanobolus* sp. as active methylophilic Archaea in Lonar crater lake sediments. **FEMS microbiology ecology**, 1-9.
- Auchtung, T.A.; Takacs-Vesbach C.D.; Cavanaugh, C.M. (2006). "16S rRNA phylogenetic investigation of the candidate division "Korarchaeota"." **Applied and Environmental Microbiology** 72(7): 5077-5082.
- Auguet, J.C.; Barberan, A.; Casamayor, E.O. (2009) Global ecological patterns in uncultured archaea. **The ISME Journal**, 4: 182-190.
- Baker, G.C.; Smith, J.J.; Cowan, D.A. (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**, 55: 541-555.
- Barns, S.M.; Delwiche, C.F.; Palmer, J.D.; Pace, N.R. (1996). Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 93: 9188-9193
- Barry, E.R.; Bell, S.D. (2006). DNA Replication in the Archaea. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 70(4): 876-887.
- Belay, N.; Johnson, R.; Rajagopal, B.S.; Macario, E.C.; Daniels, L. (1988) Methanogenic Bacteria from Human Dental Plaque. **Applied and Environmental Microbiology**, 54(2): 600-603.
- Bernander, R. (2000). Chromosome replication, nucleoid segregation and cell division in Archaea. **Trends in Microbiology**, 8(6): 278-283.

- Boone, D.R.; Castenholz, R.W.; Garrity, G.M. (2001). **Bergey's manual of systematic bacteriology** / George M. Garrity, editor-in-chief. New York, Springer.
- Briée, C.; Moreira, D.; López-García, P. (2007) Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. **Research in Microbiology**, 158: 213-227.
- Brochier-Armanet, C.; Boussau, B.; Gribaldo, S.; Forterre, P. (2008) Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. **Nature Reviews Microbiology**, 6: 245-252.
- Brochier-Armanet, C.; Forterre, P.; Gribaldo, S. (2011). Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. **Current opinion on Microbiology**, 14(3): 274-281.
- Casanueva, A. ; Galada, N.; Baker, G.C.; Grant, W.D.; Heaphy, S.; Jones, B.; Yanhe, M.; Ventosa, A.; Blamey, J.; Cowan, D.A. (2008) Nanoarchaeal 16S rRNA gene sequences are widely dispersed in hyperthermophilic and mesophilic halophilic environments. **Extremophiles**, 12: 651-656.
- Catão, E.C.P. (2012). **Riqueza do domínio Archaea no solo do bioma cerrado**. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular – Universidade de Brasília.
- Chao, A. (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, 11: 265–70.
- Chao, A.; Lee, S.M. (1992) Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of the American Statistical Association**, 87: 210–7.
- Coenye, T.; Gevers, D.; Van de Peer, Y.; Vandamme, P.; Swings, J. (2005) Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, 29: 147-167.
- Conrad, R.; Phelps, T.J.; Zeikus, J.G. (1985). Methanogenic Bacteria in Sewage Sludge and Juxtaposition of Hydrogen-Producing and Gas Metabolism Evidence in Support of the Lake Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, 50(3): 595-601.

- Dagert, M.; Ehrlich, S.D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. **Gene**, 6: 23-28.
- De La Torre, J.R.; Walker, C.B.; Ingalls, A.E.; Konneke, M.; Stahl, D.A. (2008) Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. **Environmental Microbiology**, 10 (1): 810-818.
- DeLong, E.F. (1992). Archaea in coastal marine environments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 89(12): 5685-5689.
- DeLong, E.F. (1998). Everything in moderation: archaea as 'non-extremophiles'. **Current Opinion in Genetics & Development** 8(6): 649-654.
- Dennis, P.P. (1997). Ancient Ciphers: Translation in Archaea. **Cell**, 89: 1007-1010.
- DeRosa, M.; Trincone, A.; Nicolaus, B.; Gambacorta, A. In: **Life Under Extreme Conditions** (Ed. diPrisco, G.) p. 61-87. (Springer, Berlin Heidelberg, 1991).
- Desantis, T.Z.; Hugenholtz, P.; Larsen, N.; Rojas, M.; Brodie, E.L.; Keller, K.; Huber, T.; Dalevi, D.; Hu, P.; Andersen, G.L. (2006) Greengenes, a Chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, 72(7): 5069-5072.
- Eiten, G. The Cerrado Vegetation of Brazil. (1972) **The botanical review**, 38: 201-341.
- Elkins, J.G., Podar, M., Graham, D.E., Makarova, K.S., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B.P., et al. (2008). A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 105(23), 8102-7.
- Esteves, F.A. (2011). Sedimentos Límnicos. **Fundamentos de limnologia**, 3ª edição – Interciência, Rio de Janeiro, p. 339-354.
- Ewing, B.; Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, 8:186-194.

- Forney, L.J.; Zhou, X.; Brown, C.J. (2004) Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. **Current Opinion in Microbiology**, 7:210-220.
- Fox, G.E.; Pechman, K.R.; Woese, C.R. (1977) Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 27(1): 44-57.
- Fuhrman, J.A.; McCallum, K.; Davis, A.A. (1992) Novel major archaeobacterial group from marine plankton. **Letters to Nature**, 356: 148-149.
- Furtado, A.L.S.; Casper P.; Esteves, F.A. (2002). Methanogenesis in an impacted and dystrophic coastal lagoon (Macaé, Brazil). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 45(2)195-202
- Gantner, S.; Andersson, A.F.; Alonso-Sáez, L.; Bertilsson, S. (2011). "Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples." **Journal of Microbiological Methods** 84(1): 12-18.
- Gloor, M; Wüest, A.; Münnich, M. (1994). Benthic boundary mixing and resuspension induced by internal seiches. **Hydrobiologia** 284:59-68.
- Grohmann, D.; Werner, F. (2011). Recent advances in the understanding of archaeal transcription. **Current Opinion in Microbiology**, 14:1-7.
- Hatzenpichler, R.; Lebedeva, E.V.; Spieck, E.; Stoecker, K.L.; Richter, A.; Daims, H.; Wagner, M. (2008) A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 105(6): 2134-2139.
- Heuer, V.B.; Krüger, M.; Elvert, M.; Hinrichs, K.U. (2010). Experimental studies on the stable carbon isotope biogeochemistry of acetate in lake sediments. **Organic Geochemistry**, 41(1), 22-30.
- Hoehler, T.M.; Albert, D.B.; Alperin, M.J.; Bebout, B.M.; Martens, C.S.; Des Marais, D.J. (2002) Comparative ecology of H₂ cycling in sedimentary and phototrophic ecosystems. **International Journal of General and Molecular Microbiology** 81 (1–4), 575–585.

- Huber, H.; Hohn, M.J.; Rachel, R.; Fuchs, T.; Wimmer, V.C.; Stetter, K.O. (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. **Nature**, 417: 63-68.
- Huber, T.; Faulkner, G.; Hugenholtz, P. (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. **Bioinformatics**, 20: 2317-2319.
- Jarvis, G.N.; Strömpl, C.; Burgess, D.M.; Skillman, L.C.; Moore, E.R.B.; Joblin, K.N. (2000) Isolation and Identification of Ruminal Methanogens from Grazing Cattle. **Environmental Microbiology**, 40: 327-332.
- Jung, M-Y.; Park, S-J.; Min, D.; Kim, J-S.; Ripjstra, W.I.C.; Damsté, J.S.S.; Kim, G-J.; Madsen, E.L.; Rhee, S-K. (2011) Enrichment and characterization of an autotrophic ammonia-oxidizing archaeon of mesophilic crenarchaeal group I.1a from an agricultural soil. **Applied and Environmental Microbiology**, 77 (24): 8635-8647.
- Kan, J.; Clingenpeel, S.; Macur, R.E.; Inskeep, W.P.; Loyalvo, D.; Varley, J.; Gorby, Y.; Mcdermott, T.R.; Nealson, K. (2011) Archaea in Yellowstone Lake. **The ISME Journal**, 1-12.
- Kandler, O.; Koenig, H. (1993). In: **The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)**. (Kates, M.; Kushner, D.J.; Matheson, A.T.; eds). Amsterdam: Elsevier, p. 223–333
- Kates, M. (1993) Membrane lipids of archaea. In: **The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)**. (Kates, M.; Kushner, D.J.; Matheson, A.T.; eds). Amsterdam: Elsevier. Capítulo 9, p. 261-295.
- Kemnitz, D.; Kolb, S.; Conrad, R. (2007) High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic Forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, 60: 442-448.
- Könneke, M.; Bernhard, A.E.; Torre, J.R.; Walker, C.B.; Waterbury, J.B. Stahl, D.A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature Letters**, 437: 543-546.

- Kozubal, M. A.; Romine, M.; Jennings, R.M.; Jay, Z.J.; Tringe, T.G.; Rusch, D.B.; Beam, J.P.; McCue, L.A.; Inskeep, W.P. (2012) Geoarchaeota: a new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park. **The ISME Journal**, 1-13.
- Kreisl, P.; Kandler, O. (1986) Chemical structure of the cell wall polymer of Methanosarcina. **Systematic Applied Microbiology**, 7: 293–299.
- Kulik, E.M.; Sandmeier, H.; Hinni, K.; Meyer, J. (2001). "Identification of archaeal rDNA from subgingival dental plaque by PCR amplification and sequence analysis." **FEMS Microbiology Letters** 196: 129-133.
- Leep, P.W.; Brinig, M.M.; Ouverney, C.C.; Palm, K.; Armitage, G.C.; Relman, D.A. (2004) Methanogenic Archaea and human periodontal disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 101(16): 6176-6181.
- Llirós, M.; Casamayor, E.O.; Borrego, C. (2008) High archaeal richness in the water column of a freshwater sulfurous karstic lake along an interannual study. **FEMS Microbiology Ecology**, 66: 331-342.
- Lovley, D. R.; Klug, M. J. (1983). Dioxide in the Sediments of a Hydrogen and Carbon and Acetogenesis from Methanol and Methylamines Methanogenesis from Eutrophic Lake. **Applied and Environmental Microbiology** 45(4):1310-1315.
- Lozupone, H.; Knight, R. (2006) Unifrac – an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. **BMC Bioinformatics**, 7: 371.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Dunlap, P.V.; Clark, D.P. (2010). **Microbiologia de Brock**. 12ª Edição – Porto Alegre, Artmed.
- Makarova, K. S.; Yutin, N.; Bell, S. D.; Koonin, E. V. (2010). Evolution of diverse cell division and vesicle formation systems in Archaea. **Nature reviews. Microbiology**, 8(10), 731-41.
- Maranhão, A. (2003). Capítulo VIII: Transformação Bacteriana. In: **Técnicas Básicas em Biologia Molecular** (eds. Azevedo, M.O.; Felipe, M.S.S.; Brígido, M.M.; Maranhão, A.Q.; De-Souza, M.T.) Brasília: Editora UnB, p. 129-141.

- Melo, A.S. (2008) O que ganhamos 'confundindo' riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? **Biota Neotropical**, 8(3):21-27
- Muller, F.; Brissac, T.; Le Bris, N.; Felbeck, h.; Gros, O. (2010) First description of giant Archaea (Thaumarchaeota) associated with putative bacterial ectosymbionts in a sulfidic marine habitat. **Environmental Microbiology**, 12(8): 2371-2383.
- Nunoura, T.; Takaki, Y.; Kakuta, J.; Nishi, S.; Sugahara, J.; Kazama, H.; Chee, G.J.; Hattori, M.; Kanai, A.; Atomi, H.; Takai, K.; Takami, H. (2011) Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. **Nucleic Acids Research**, 39 (8): 3204-3223.
- Nunoura, T.; Hirayama, H.; Takami, H.; Oida, H.; Nishi, S.; Shimamura, S.; Suzuki, Y.; Inagaki, F.; Takai, K.; Nealson, K.H.; Horikoshi, K. (2005) Genetic and functional properties of uncultivated thermophilic crenarchaeotes from a subsurface gold mine as revealed by analysis of genome fragments. **Environmental Microbiology**, 7(12):1967-1984.
- Ogram, A.; Sayler, G.S.; Barkay, T. (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **Journal of Microbiological Methods**, 7: 57-66.
- Oliveira, P.S.; Marquis, R.J. (2002). **The cerrados of Brazil : ecology and natural history of a neotropical savanna**. New York, Columbia University Press.
- Olsen, J.G.; Lane, D.J.; Giovannoni, S.J.; Pace, N.R.; Stahl, D.A. (1986) Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. **Annual Review of Microbiology**, 40: 337-365.
- Preston, C.; Wu, K.Y.; Molinski, T.F.; Delong, E.F. (1996) A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp.nov. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 93: 6241-6246
- Rondon, M.R.; August, P.R.; Betterman, A.D.; Brady, S.F.; Grossman, T.H.; Liles, M.R.; *et al.*, (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the

- genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology** 66(6): 2541-2547.
- Roose-Amsaleg, C.L.; Garnier-Sillam, E.; Harry, M. (2001) Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. **Applied Soil Ecology**, 18: 47-60.
- Saitou N.; Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4:406-425.
- Sansone, F.J.; Martens, C.S. (1982) Volatile fatty acid cycling in organic-rich marine sediments. **Geochimica et Cosmochimica Acta** 46 (9), 1575–1589.
- Sara, M.; Sleytr, U. B. (1996) Crystalline bacterial cell surface layers (S-layers): from cell structure to biomimetics. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 65: 83–111
- Schleifer, K.H. (2009). "Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future." **Systematic and Applied Microbiology** 32(8): 533-542.
- Schloss, P. D.; Larget, B. R.; Handelsman, J. 2004. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied Environmental Microbiology**, 70:5485–5492.
- Schloss, P.D.; Handelsman, J. (2004) Status of the Microbial Census. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 68 (4): 686-691.
- Schloss, P.D.; Westcott, S.L.; Ryabin, T.; Hall, R.J.; Hartmann, M.; Hollister, E.B.; Lesniewski, R.A.; Oakley, B.B.; Parks, D.H.; Robinson, C.J.; Sahl, J.W.; Stres, B.; Thallinger, G.G.; Van Horn, D.J.; Weber, C.F. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, 75(23): 7537-7541.
- Shannon, C.E.; Weaver, W. (1949) *The Mathematical Theory of Communication*. **University of Illinois Press**, Urbana, Illinois.

- Silva, M.R.S.S. (2004) **Produção de serrapilheira, biomassa e diversidade de comunidades bacterianas do solo em áreas de Cerrado sob diferentes usos e manejos**. Dissertação de mestrado, Departamento de Ecologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.
- Simpson, E.H. (1949). Measurement of diversity. **Nature**, 163: 688-688.
- Spang, A.; Hatzenpichler, R.; Brochier-Armanet, C.; Rattei, T.; Tischler, P.; Spieck, E.; Streit, W.; Stahl, D.A; Wagner, M.; Schleper, C. (2010). "Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota." **Trends in Microbiology** 18(8): 331-340.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28: 2731—2739.
- Thauer, R.K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. **Microbiology** 144: 2377-2406.
- Timonen, S.; Bomberg, M. (2009). "Archaea in dry soil environments." **Phytochemistry Reviews**, 8(3): 505-518.
- Thomaz, S.M.; Pereira, G.; Pagioro T.A. (2001). Microbial respiration and chemical composition of different sediment fractions in waterbodies of the upper Paraná river floodplain, Brazil. **Brazilian Journal of Biology** 61(2): 277-286.
- Tourna, M.; Stieglmeier, M.; Spang, A.; Konneke, M.; Schintlmeister, A.; Urich, T.; Engel, M.; Schloter, M.; Wagner, M.; Richter, A.; Schleper, C. (2011) Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 108(20): 8420-8425.
- Vetriani, C.; Jannasch, H.W.; MacGregor, B. J.; Stahl, D.A.; Reysenbach, A. (1999). Characterization of Marine Benthic Archaea Population Structure and Phylogenetic in Deep-Sea Sediments. **Applied and Environmental Microbiology** 65(10):4375-4384.

- Walter, B.M.T.; Carvalho, A.M. de; Ribeiro, J.F. **O conceito de savana e de seu componente Cerrado, In: Cerrado: ecologia e flora - Volume 1.** (SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P.; RIBEIRO, J.F.; eds) Embrapa Cerrados, Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, capítulo 1, 21-45.
- Wang, Q.; Garrity, G. M.; Tiedje, J. M.; Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology** 73(16):5261-5267
- Wetzel, R.G. (2001). Sediments and Microflora. **Limnology Lake and River Ecosystems.** 3ª Edição – Elsevier, San Diego, p. 631-664.
- Whittaker, R.H. (1969) New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, 163:150-160.
- Woese, C. R.; Fox, G.E. (1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 74(11): 5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990). "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eukarya." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 87(12), 4576-4579.
- Yassin, A.F.; Kroppenstedt, R.M.; Ludwig W (2003) *Corynebacterium glaucum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53:705-709.
- Zardo, D.C.; Maas, G.C.B.; Baia, S.; Weber, O.L.S. (2011) Características físico-químicas e microbiológicas do sedimento da microbacia Samamnaia – MT, Brasil. **Revista Ciências do Ambiente On-Line**, 7:2.
- Zhu, D.-L., Sun, C., & He, H. (2012). Detection Methanogens in Newly Settled Sediments from Xuanwu Lake in Nanjing, China. **Current microbiology**.
- Zuckerlandl, E.; Pauling, L. (1965) Molecules as documents of evolutionary history. **Journal of Theoretical Biology**, 8(2): 357-366.

ANEXO I. Trabalhos apresentados em congresso

Trabalho apresentado na forma de pôster no XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM) realizado em Santos entre 28 de outubro e 1º de novembro de 2012.

Estudo da riqueza de membros do domínio Archaea em sedimentos de lagoas do cerrado por caracterização de genes de rRNA 16S.

Rodrigues, T.O., Catão, E.C.P., Bustamente, M., Kyaw, C.M.

O domínio Archaea possui características em comum com os domínios Bacteria e Eukarya, e ao mesmo tempo apresenta características próprias. Atualmente, são raros os estudos sobre a filogenia e diversidade de archaeas de ambientes naturais do Brasil e, por esta razão, este trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade de Archaea em sedimentos de lagoas do cerrado, por meio da caracterização de genes de rRNA 16S. Amostras de sedimentos lacustres foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit PowerSoil e o DNA foi utilizado em experimentos de PCR empregando o par de iniciadores 340f e 1000r, específicos para o domínio Archaea. Os fragmentos amplificados foram ligados ao vetor pGEM-T Easy e transformados em *E. coli*. O DNA plasmidial de clones recombinantes foi extraído utilizando-se fenol e clorofórmio, quantificado e submetido ao sequenciamento automático. Ao analisar as seqüências obtidas e ao compará-las com o banco de dados online Ribosomal Database Project, observamos um grande predomínio de membros do filo Euryarchaeota no sedimento analisado. As seqüências de membros do filo Crenarchaeota foram todas classificadas na classe Thermoprotei. Não foi possível uma identificação de membros do filo Crenarchaeota em um nível taxonômico mais específico do que classe. O fato de a maioria dos bancos de dados possuírem mais seqüências de membros do filo Euryarchaeota pode ter contribuído para isso, de forma que o banco ainda não é tão rico em seqüências de organismos do filo Crenarchaeota. Foi possível, no entanto, classificar as seqüências de membros do filo Euryarchaeota até o grau taxonômico de gênero. Nesse filo, encontramos representantes das classes Thermoplasmata e Methanomicrobia. A primeira apresenta muitos representantes acidófilos, algo coerente com o baixo pH do sedimento analisado. Encontramos uma alta diversidade de gêneros dentre os representantes de Methanomicrobia. Essa classe é caracterizada pela capacidade de produzir metano, metanogênese, uma via metabólica exclusiva de Archaea. Dentre as duas classes de Euryarchaeota encontradas, observamos um alto predomínio de metanogênicas. Obtivemos uma série de seqüências de Archaea ainda não classificadas, o que é esperado, devido ao baixo número de estudos em ecossistemas brasileiros. Assim, esses resultados contribuem para um melhor entendimento desse domínio e sua diversidade no Brasil.