



Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

**Cultivo e Filogenia Molecular de *Archaea* a partir de Amostras de
Aquário de Água Doce**

Helena Raíra Magaldi Ribeiro

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

Orientadora: Cynthia Maria Kyaw

Brasília, 2015

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Cynthia M. Kyaw pelo seu exemplo como professora e pesquisadora. Sou grata não apenas pela orientação, didática e paciência, mas por todo o conhecimento compartilhado ao longo de todos esses anos. Muito obrigada por me receber em seu laboratório e em sua sala de aula, me oferecendo a chance de amar a cada dia mais o nosso campo de pesquisa. Mais uma vez, obrigada.

À Elisa Catão: Eu nunca poderia ter atingido nada deste trabalho sem os ensinamentos, a paciência e, acima de tudo, a amizade dedicada a mim por todos esses anos. Lembro-me de entrar no laboratório sem saber segurar uma pipeta corretamente; o que sei e sou nunca seriam atingidos sem a sua ajuda. Muito obrigada.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular pela infraestrutura proporcionada para o desenvolvimento desse trabalho. Também gostaria de agradecer ao financiamento concedido a mim pela CAPES durante esses dois anos de pesquisa.

A todos os membros do laboratório de microbiologia ao longo desses anos, eu agradeço por tudo que me foi ensinado. Agradeço ao Thiago Rodrigues por seus ensinamentos e ajuda ao longo dessa pesquisa. Agradeço também à Ana Carolina Arcanjo por sua assistência e por todo o aprendizado que me foi passado. Gostaria de agradecer especialmente às amigas que conheci durante esses anos, Cecília Kosmann e Julianna Peixoto. Momentos com vocês sempre valerão a pena.

Gostaria também de agradecer aos professores Ricardo Krüger, Cristine Barreto, e Marlene Teixeira De-Souza por toda a ajuda na condução dos experimentos.

Obrigada à professora Silviene Fabiana pela disponibilização do aparelho Nanovue para quantificação das amostras de DNA desse trabalho.

Obrigada à professora Sônia Bão pela disponibilização dos microscópios eletrônicos que geraram as imagens que podemos observar nesse trabalho. Assim sendo, eu nunca poderia deixar de agradecer à Ingrid, que sempre teve toda a paciência do mundo comigo, mesmo quando tudo de errado estava acontecendo.

Obrigada ao Fabyano pelas opiniões sinceras acerca das minhas árvores filogenéticas e por me ajudar sempre que precisei, mesmo que com perguntas básicas (muitas vezes básicas demais).

Dona Maria, o meu trabalho nunca teria rendido sem a sua ajuda. Muito obrigada pela sua boa vontade e pelo seu bom humor diário.

Eu não poderia me esquecer de agradecer à Adriana Moretzson e ao Dr. Augusto César. A única coisa que eu posso dizer é: não são as drogas, são vocês. Obrigada.

Amigos de verdade são uma parte essencial em nossas vidas. Por isso, não poderia deixar de agradecer aos meus amigos Paula Felix, Izis Moraes, Leonardo Dias, Karla Tepedino, Cris Vieira e Luciana Reynaud. Obrigada por todos os momentos de companhia. Cada um de vocês me ajudou de uma maneira distinta e inequívoca, e eu não poderia ser mais grata por ter pessoas como vocês na minha vida.

Depois de mais de 11 anos de amizade, eu não acho que conseguiria agradecer à altura, Patrícia Gusmão. Eu não creio que algum dia consiga escrever tudo o que você significa para mim; muito obrigada por ter sido aquela que se manteve comigo diariamente quando eu mais precisava. Eu não poderia pedir uma amiga melhor.

À Tamires Zepon, que mesmo depois de tantos anos de amizade – surpreendentemente - ainda consegue ter toda a paciência do mundo comigo, ao ponto de considerar – e de fato, resolver - se mudar para Brasília. Eu só tenho a te agradecer por absolutamente tudo. Obrigada, nêga.

À Ana Cecília Dias Ferreira (vulgo Pato C.), que esteve ao meu lado durante todo o caminho relativo a esse mestrado. Eu não sei o que eu teria feito sem a sua ajuda, seus conselhos, seus cuidados, seu carinho, sua dedicação e seu amor. Muito obrigada por ser exatamente quem é e me ajudar a todo instante a ser quem eu sou.

Eu não poderia me esquecer de agradecer à Cassimira Rosa de Araújo, que ajudou na minha criação e cuidado desde antes de eu nascer. Mimi, você foi essencial por todo o caminho da minha vida.

Com tudo o que passamos juntos, eu nunca poderei agradecer o suficiente à minha família como um todo. Não apenas à minha mãe, Elayne, e meu pai, Walter, mas também à minha avó Janice e tia Rosângela. Ao longo de todos esses anos, não importa a dificuldade, não importa em qual canto do Brasil, todos vocês estiveram ao meu lado. Muito obrigada por sempre acreditarem em mim - mesmo quando todos os outros diziam o contrário, inclusive eu mesma.

Também parte dessa família, agradeço aos amores felinos da minha vida: a companhia e amor de vocês sempre me foi como ar fresco em todos os momentos sufocantes. Mingau, Louis, Pedro Leopoldo, Mika, Chanel, Guinness, Bilbo, Chicó: muito obrigada.

“We must not forget that when radium was discovered no one knew that it would prove useful in hospitals. The work was one of pure science. And this is a proof that scientific work must not be considered from the point of view of the direct usefulness of it. It must be done for itself, for the beauty of science, and then there is always the chance that a scientific discovery may become like the radium a benefit for mankind.”

— *Marie Curie*

Índice

Resumo	VIII
Abstract	IX
1. Referencial Teórico	10
1.1. O Domínio <i>Archaea</i> : Características gerais	10
1.2. Ecologia e Taxonomia de <i>Archaea</i>	14
1.3. Archaeas e o ciclo do Nitrogênio	18
1.4. Importância do Cultivo de membros do Domínio <i>Archaea</i>	21
1.5. Potencial Biotecnológico do Domínio <i>Archaea</i>	24
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo Geral	26
2.2. Objetivos Específicos	26
3. Materiais e Métodos	27
3.1. Coleta das amostras.....	27
3.2. Preparo dos meios e condições de cultivo	27
3.3. Caracterização Morfológica das Amostras Cultivadas	29
3.3.1. Microscopia óptica.....	29
3.3.2. Microscopia eletrônica de varredura - MEV	29
3.3.3. Microscopia eletrônica de transmissão - MET	30
3.3.4. Microscopia de força atômica - MFA	30
3.4. Análises de filogenia molecular	31
3.4.1. Extração de DNA das colônias obtidas	31
3.4.2. Extração de DNA da amostra do aquário	31
3.4.3. Experimentos de PCR e Iniciadores utilizados	31
3.4.4. Purificação dos produtos de PCR.....	35
3.4.5. Clonagem dos produtos amplificados em vetor pGEM-T Easy e transformação de células de <i>Escherichia coli</i>	35
3.4.5.1. Preparação de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α para transformação por choque térmico	35
3.4.6. Extração de DNA plasmidial por lise alcalina (adaptado de Dagert & Ehrlich, 1979)	36
3.4.7. Sequenciamento de DNA.....	37
3.4.8. Análises de Bioinformática	37
4. Resultados e Discussão	39
4.1. Coleta das amostras e cultivo de <i>Archaea</i> em meios artificiais	39
4.2. Caracterização morfológica das colônias obtidas	42
4.3. Caracterização microscópica das colônias obtidas.....	47
4.3.1. Microscopia óptica.....	47
4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura - MEV	49
4.3.3. Microscopia eletrônica de transmissão - MET	52
4.3.4. Microscopia de força atômica - MFA.....	54
4.4. Filogenia Molecular das colônias obtidas.....	55
4.4.1. Extração de DNA.....	55
4.4.2. PCR dirigidas aos genes de rRNA 16S de <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i> e <i>amoA</i>	57
4.4.3. Análises de Bioinformática	59
4.4.4. Análise de qualidade das sequências de DNA	59
4.4.5. Classificação taxonômica preliminar das colônias, segundo o Ribossomal Database Project (RDP)	59

4.4.6. Construção da Árvore Filogenética das culturas de <i>Archaea</i> , com base no gene de rRNA 16S	62
4.4.7. Filogenia dos tipos coloniais, com base no gene amoA 4.5.	64
4.5. Filogenia Molecular da Amostra do Aquário.....	66
4.5.1. Extração de DNA.....	66
4.5.2. PCR dirigida ao gene de rRNA 16S.....	66
4.5.3. Transformação de células de <i>Escherichia coli</i> DH5 α e seleção de clones recombinantes.....	67
4.5.4. Extração de DNA plasmidial por lise alcalina dos clones recombinantes	67
4.5.5. Análises de Bioinformática	68
4.5.6. Classificação taxonômica preliminar da biblioteca genômica, segundo o Ribossomal Database Project (RDP)	68
4.5.7. Análise de α -diversidade da comunidade do aquário.....	69
4.5.8. Construção da Árvore Filogenética da biblioteca genômica do aquário, baseada no gene de rRNA 16S	71
5. Conclusões	74
6. Perspectivas	75
7. Referências Bibliográficas	76

Resumo

Membros do domínio *Archaea* encontram-se amplamente distribuídos na natureza, sendo frequentemente detectados em sedimentos, solos e ambientes aquáticos. Por outro lado, estudos recentes evidenciam a necessidade do cultivo laboratorial desses organismos, especialmente daqueles de ambientes não extremos, já que muitos aspectos de sua biologia permanecem ainda desconhecidos. Por esta razão, neste trabalho aprimoramos metodologias visando a obtenção de culturas de archaeas a partir de amostras de aquário de água doce residencial, utilizando a água deste aquário para a confecção dos meios de cultura. Visando favorecer o crescimento de archaeas oxidantes de amônia (AOAs), os meios de cultura foram adicionados de cloreto de amônio e suplementados com diversos antibióticos e antifúngicos, a fim de torná-los altamente seletivos para archaeas. Onze tipos coloniais foram selecionados e caracterizados quanto à morfologia celular por diferentes técnicas de microscopia, revelando a presença de células cocóides diminutas, com diâmetro médio de 1 μM , algumas vezes apresentando projeções celulares provavelmente envolvidas na adesão. Para as análises de filogenia molecular, DNA destas colônias foram utilizados em ensaios de PCR específicos para os genes de rRNA 16S dos Domínios *Archaea* e *Bacteria* e também o gene *amoA*, específico de AOAs, seguidos de sequenciamento de DNA. Os resultados revelaram que todas as colônias correspondiam a co-cultivos de archaeas pertencentes ao Filo Thaumarchaeota e bactérias dos gêneros *Pandorea* ou *Cupriavidus*. Foi também verificado o potencial nitrificante de algumas amostras, uma vez que foram detectadas sequências do gene *amoA* em alguns dos tipos coloniais selecionados. Paralelamente, foi construída uma biblioteca de genes de rRNA16S de *Archaea*, a partir do DNA total extraído de uma amostra de água e elementos do aquário. As análises filogenéticas desta biblioteca sugerem que o aquário consiste em um ambiente pouco diverso em termos da comunidade de *Archaea* presente.

Abstract

Members of *Archaea* are found on a vast range of environments, including soils, sediments, and aquatic habitats. Recent studies stress the need of cultivation of mesophilic *Archaea*, since several physiological and biochemical aspects of these organisms remain unknown due to cultivation-independent techniques intrinsic limitations. In this work, we refined methodologies in order to obtain archaeal cultures from a freshwater aquarium, using the water from the aquarium to prepare the culture media. In order to favor the growth of ammonia oxidizing archaea (AOAs), the media were supplemented with ammonium chloride, and a number of antibiotics and antifungals. Eleven colonies were selected and characterized microscopically, revealing the presence of small coccoid cells, with an average diameter of 1 μM , sometimes presenting cell appendages probably involved in cell adhesion. Molecular phylogeny analyses were performed by PCR experiments specifically directed to the 16S rRNA genes of *Archaea* and *Bacteria*, as well as to the *amoA* gene, found only on AOAs, followed by automated DNA sequencing. The results revealed that all colonies consisted of co-cultures of archaeal cells belonging to phylum Thaumarchaeote, with bacteria of the genera *Pandoraea* or *Cupriavidus*. Some colonies were also positive for the presence of *amoA* gene, suggesting a nitrification potential of these samples. A genomic 16S rRNA library was also constructed from a sample consisting of water and other elements of the aquarium. The phylogenetic analyses of this library suggest that probably, the aquarium corresponds to an environment with a small diversity, in terms of the archaeal community.

1. Referencial Teórico

1.1. O Domínio Archaea: Características gerais

O Domínio *Archaea* compreende organismos procarióticos cuja primeira descrição provavelmente corresponda a um relato de 1878, que descrevia a ocorrência de “plantas microscópicas” de pigmentação avermelhada encontradas no sal utilizado no processo de salga de bacalhaus e que conferiam a coloração avermelhada a estes peixes (Farlow, 1878).

Somente um século após este relato foi realizada a primeira proposta de separação dos organismos procarióticos em dois grupos filogenéticos distintos. Tal proposição baseou-se em análises comparativas de sequências de rRNAs 16S e 18S de organismos definidos como bactérias metanogênicas, com aquelas de bactérias bastante conhecidas e de organismos eucarióticos. A análise dos resultados demonstrou uma clara separação de tais organismos em três grupos filogenéticos, que passariam então a ser classificados como Reinos distintos. Devido à hipótese da provável ancestralidade do fenótipo metanogênico, os autores propuseram a denominação *Archaeobacteria* para um novo Reino, composto pelas bactérias metanogênicas, enquanto as bactérias “verdadeiras” seriam classificadas no Reino *Eubacteria* e os eucariotos, no Reino *Urcaryoto* (Woese & Fox, 1977).

Em 1990, Woese e colaboradores publicaram um trabalho onde deixavam evidente que os microrganismos procarióticos apresentavam diferenças muito maiores que aquelas observadas em relação às sequências de rRNA. Esses achados ressaltavam a necessidade de uma reestruturação do sistema de classificação vigente até então, onde os seres vivos eram posicionados em cinco reinos distintos. Por esse motivo, Woese e colaboradores propuseram a criação de um táxon superior a Reino, designado Domínio. A classificação proposta em 1977 se manteria, substituindo-se o termo Reino por Domínio e as denominações inicialmente propostas também sofreriam pequenas alterações. Assim, a partir desta nova proposta, os seres vivos passariam a ser classificados em três Domínios: *Archaea*, *Bacteria* e *Eucaria*, como ilustrado na **Figura 1**.

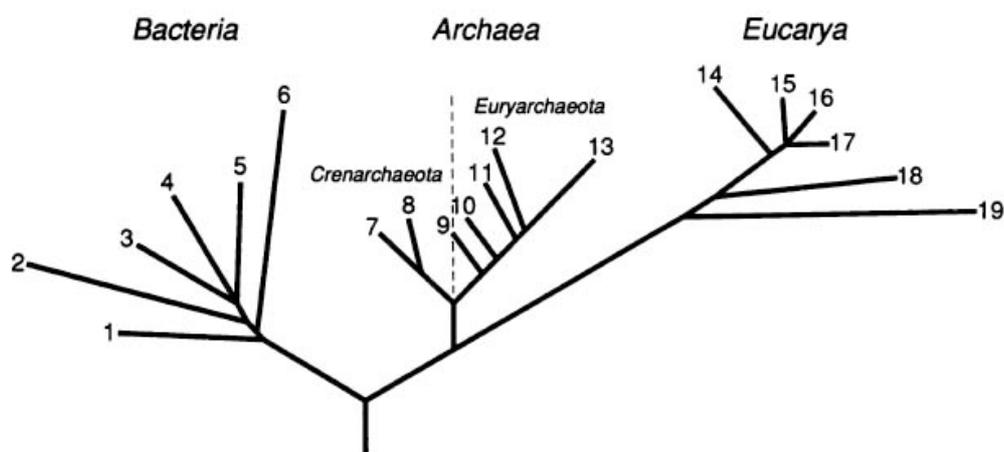


Figura 1. Árvore filogenética representando os três Domínios da vida: *Archaea*, *Bacteria* e *Eucarya*. Os números nos ramos correspondem a grupos específicos de organismos, *Bacteria*: 1, Thermotogales; 2, Flavobactérias e organismos relacionados; 3, Cianobactérias; 4, Bactérias púrpuras; 5, Bactérias Gram-positivas; 6, Bactérias verdes e não sulfurosas. *Archaea*: Filo Crenarchaeota: 7, *Pyrodictium*; 8, *Thermoproteus*; Filo Euryarchaeota: 9, Thermococcales; 10, Methanococcales; 11, Methanobacteriales; 12, Methanomicrobiales; 13, Halófilos extremos. *Eucarya*: 14, Animais; 15, Ciliados; 16, Plantas verdes; 17, Fungos; 18, Flagelados; 19, Microsporídeos (Retirado de Woese *et al.*, 1990).

O Domínio *Archaea* é atualmente considerado um grupo monofilético de microrganismos procarióticos que apresentam características em comum tanto com Domínio *Bacteria*, quanto com *Eucarya*. Entretanto, archaeas também exibem traços que as distinguem dos demais organismos (**Tabela 1**). Sabe-se que sistemas envolvidos no processamento de informação desses microrganismos, como aparatos de replicação, transcrição e tradução, apresentam componentes semelhantes aos encontrados em organismos eucarióticos. O seu aparato metabólico, por sua vez, apresenta maior similaridade com aquele observado em bactérias (Riviera *et al.*, 1998). Contudo, grande parte (~50%) dos genes de *Archaea* persiste sem função esclarecida (Allers & Mevarech, 2005; Graham *et al.*, 2005).

Tabela 1. Comparação de características entre os Domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya* (Adaptado de Cavicchioli, 2011)

Característica	<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Eucarya</i>
Ligação dos lipídeos de membrana	Éster	Éter	Éster
Esqueleto de fosfato associado aos lipídeos	Glicerol-3-fosfato	Glicerol-1-fosfato	Glicerol-3-fosfato
Metabolismo	Bacteriano	Semelhante ao bacteriano	Eucariótico
Fatores de alongação da tradução	Bacterianos	Semelhantes aos eucarióticos	Eucarióticos
Metanogênese	Não	Sim	Não

A membrana plasmática de archaeas apresenta estrutura e composição química distintas daquelas encontradas em células eucarióticas e bacterianas, consistindo em uma mono ou bicamada lipídica composta por cadeias laterais de hidrocarbonetos ramificados do tipo isopreno, unidas à molécula glicerol-1-fosfato por ligações do tipo éter. Células bacterianas e eucarióticas apresentam cadeias não ramificadas, compostas de ácidos graxos, ligadas a moléculas de glicerol-3-fosfato por ligações éster (Kates *et al.*, 1993; Albers & Meyer, 2011).

Archaeas apresentam diversas composições e estruturas relativas à parede celular. Uma estrutura de parede frequentemente encontrada nos representantes desse Domínio corresponde à camada S (**Figura 2**). Essa camada encontra-se adjacente à parede celular do microrganismo e pode apresentar constituição protéica ou glicoprotéica (Sleytr & Sára, 1997). Nesse tipo de estrutura, também observada em muitas bactérias e frequentemente alvo de diversos estudos nanobiotecnológicos, suas unidades monoméricas dispõem-se em arranjos cristalinos regulares, com capacidade de autoarranjo com diferentes simetrias (Pum *et al.*, 2013).

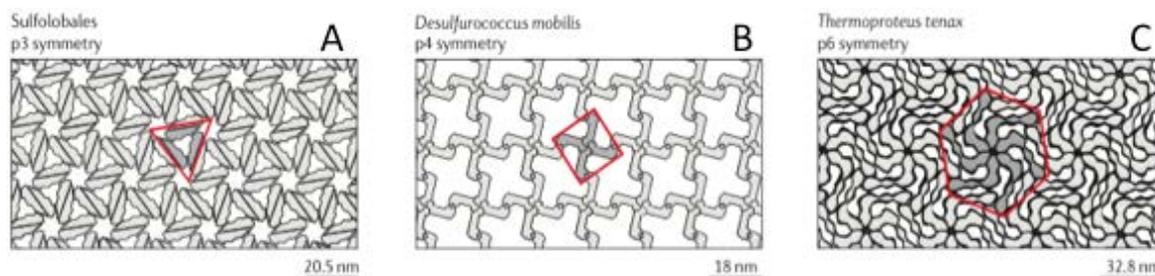


Figura 2. Modelos de camadas S de diferentes representantes do Domínio *Archaea*. Em vermelho as diferentes simetrias (A: hexagonal p3 – *Sulfolobales* -, B: quadrada p4 – *Desulphurococcus mobilis* - e C: hexagonal p6 - *Thermoproteus tenax*). (Adaptado de Albers & Meyer, 2011).

As várias composições de parede celular apresentadas por archaeas podem ser visualizadas na **Figura 3**. Alguns representantes metanogênicos apresentam polímeros similares ao peptidoglicano, encontrado na parede celular de bactérias, denominados pseudomureína. Entretanto, enquanto exemplares bacterianos apresentam ácido N-acetilmurâmico e ligações β -1,4 entre os açúcares, a cadeia oligossacarídica das archaeas contém ligações do tipo β -1,3 e é composta de ácido N-acetiltalosaminurônico. Determinados organismos metanogênicos podem apresentar em sua parede o polímero fibrilar metanocondroitina, similar à condroitina encontrada em tecidos de vertebrados. Outros exemplos de composição de parede celular podem incluir polímeros de glutamílglicano, heteropolisacarídeos sulfatados ou apenas uma membrana externa (Kandler & König, 1998; Albers & Meyer, 2011).

Como citado anteriormente, o processamento de informação em archaeas assemelha-se principalmente àquele apresentado pelo Domínio *Eucarya*. No sistema de transcrição, a holoenzima da RNA polimerase II de archaeas apresenta subunidades extras que possuem homólogos em eucariotos, porém não em bactérias. Da mesma maneira, a enzima requer fatores de reconhecimento de promotor, incluindo proteína de ligação ao TATA-*box* (TBP) e fator de transcrição B (TFB). Para a tradução, são necessários mais de dez fatores de iniciação para archaeas e eucariotos, enquanto bactérias requerem apenas três. Archaeas e bactérias compartilham a estrutura genômica de cromossomos circulares, porém

diferem também na maquinaria de replicação do DNA (Allers & Mevarech, 2005).

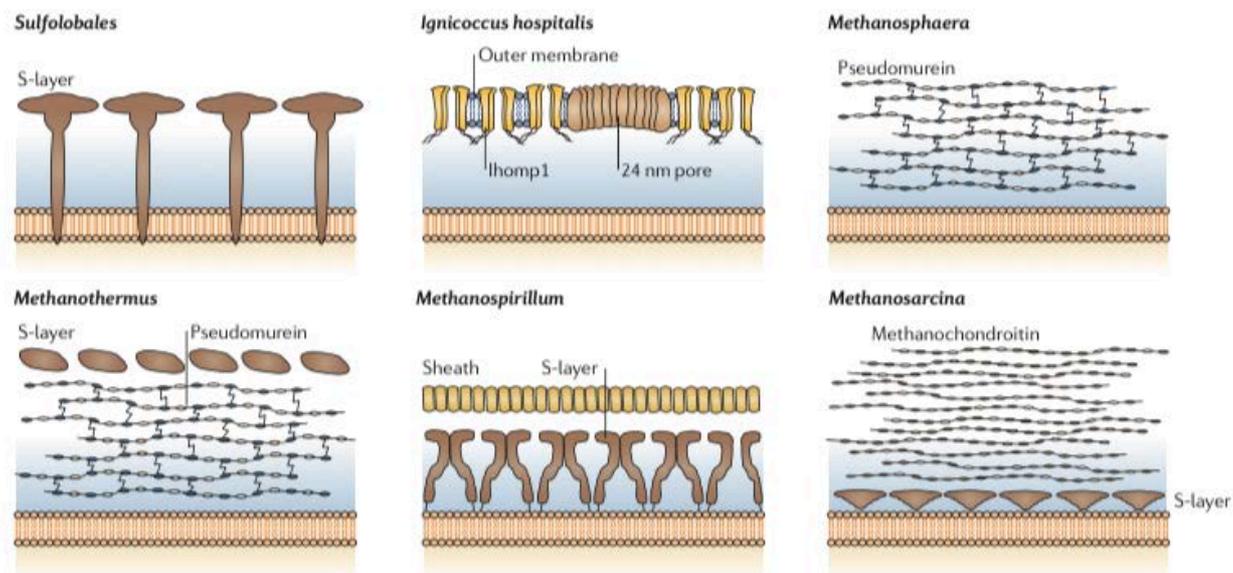


Figura 3. Diferentes composições e estrutura de paredes celulares encontradas em *Archaea*. (Retirado de Albers & Meyer, 2011).

1.2. Ecologia e Taxonomia de Archaea

O Domínio *Archaea*, quando proposto originalmente por Woese e colaboradores em 1990, foi subdividido em dois filos, denominados Euryarchaeota e Crenarchaeota (**Figura 1**). O filo Euryarchaeota representa um grupo com grande diversidade fenotípica, englobando microrganismos metanogênicos (exemplificados pelos gêneros *Methanococcus*, *Methanosarcina*), termoacidófilos (gênero *Picrophilus*), termófilos (ordem Thermococcales) e halófilos extremos (gênero *Halobacterium*). O segundo filo, Crenarchaeota, foi durante muito tempo considerado um grupo monolítico, com representantes termófilos e hipertermófilos (gêneros *Staphylothermus*, *Thermoproteus*, *Thermocladium*).

Durante muito tempo acreditou-se que archaeas estavam restritas a ambientes inóspitos, principalmente pelo fato de os primeiros estudos realizados com estes organismos terem sido realizados apenas em locais com essas características, tais como fontes termais (Brock *et al.*, 1972) e

minas ácidas de carvão (Darland *et al.*, 1970). Embora a grande maioria de exemplares dos microrganismos reconhecidamente extremófilos pertençam ao Domínio *Archaea*, hoje sabe-se que nem todos os membros sobrevivem em locais com condições consideradas extremas, e que nem todos organismos que habitam tais locais são archaeas (Cavicchioli, 2011). O reconhecimento da real distribuição desses microrganismos apresentou mudanças desde o aperfeiçoamento de técnicas independentes de cultivo, o que permitiu a detecção de sequências afiliadas a archaeas antes desconhecidas (Robertson *et al.*, 2005). A descoberta de novas linhagens de archaeas mesófilas a partir de amostras de plâncton marinho (DeLong, 1992) precedeu estudos de descrição de archaeas nos mais variados ambientes. Estabelecida a ubiquidade deste domínio, representantes já foram descritos em uma variedade de ambientes, incluindo solos (Ochsenreiter *et al.*, 2003; Catão *et al.*, 2013), ambientes aquáticos (Francis *et al.*, 2005), esgotos (Sun *et al.*, 2014) e ambientes poluídos (Damashek *et al.*, 2015), sistemas de distribuição e tratamento de água (Van der Wielen *et al.*, 2009) aquários residenciais (Urakawa *et al.*, 2008; Sauder *et al.*, 2011) e em diversas partes do corpo humano.

Uma grande variedade de estudos descrevem a presença de archaeas em diferentes partes do corpo humano, como o trato intestinal (Hoffmann *et al.*, 2013), vagina (Belay *et al.*, 1990) e cavidade oral. No entanto, até o momento, não foram descritas archaeas diretamente associadas a patologias em seres humanos. Um possível papel indireto foi atribuído às archaeas, onde estas poderiam estimular o crescimento de agentes patogênicos, por exemplo, representantes metanogênicos envolvidos em doença periodontal. O consumo metabólico de H₂ pelos metanogênicos poderia agir promovendo a multiplicação de patógenos fermentadores, favorecendo a proliferação de biofilmes periodontais (Vianna *et al.*, 2008).

Da mesma maneira que a ecologia e distribuição deste domínio apresentou modificações profundas, a sua subdivisão em apenas dois filos vem sofrendo sugestões de alterações a partir da descrição de novas sequências de rDNA 16S de isolados encontrados em amostras ambientais.

Dentre os grupos propostos, encontram-se os filos Korarchaeota, Nanoarchaeota, Thaumarchaeota, Aigarchaeota e Geoarchaeota. A proposta

da criação do filo Korarchaeota (Barns *et al.*, 1996) deu-se a partir de sequências ambientais obtidas em fontes hidrotermais no Parque Nacional de Yellowstone (EUA). O filo Nanoarchaeota (Huber *et al.*, 2002) foi proposto após o isolamento de um organismo termofílico denominado *Nanoarchaeum equitans*, obtido a partir de fendas hidrotermais marinhas na Islândia. Este organismo apresenta-se obrigatoriamente em associação a células da archaea *Ignicoccus hospitalis* e não possui mais do que 500kb em seu genoma. Um dos filo propostos e já adotado por uma série de autores e que será melhor abordado adiante por tratar-se de um dos tópicos desse trabalho consiste no filo Thaumarchaeota, o qual é composto por organismos predominantemente mesófilos que, em análises filogenéticas, formam um grupo irmão de crenarchaeotas hipertermófilas (Brochier-Armanet *et al.*, 2008) (**Figura 4**). O filo Aigarchaeota é representado pela archaea *Caldiarchaeum subterraneum*, cuja sequência foi obtida em minas de ouro no Japão (Nunoura *et al.*, 2011). Porém, existe a proposição da sua inserção no filo Thaumarchaeota, dada a tendência à formação de clados robustos com organismos desse filo em análises filogenéticas e à presença de características normalmente encontradas em thaumarchaeotas (Brochier-Armanet *et al.*, 2008; Brochier-Armanet *et al.*, 2011). Geoarchaeota (Kozubal *et al.*, 2012) foi proposto a partir da análise de sequências obtidas em sistemas geotermiais, também localizados no Parque Nacional de Yellowstone. Assim como em Aigarchaeota, análises filogenéticas mais refinadas e análises genômicas comparativas de um maior número de sequências indicam a inserção destes organismos como uma ramificação antiga de Crenarchaeota (Spang *et al.*, 2013).

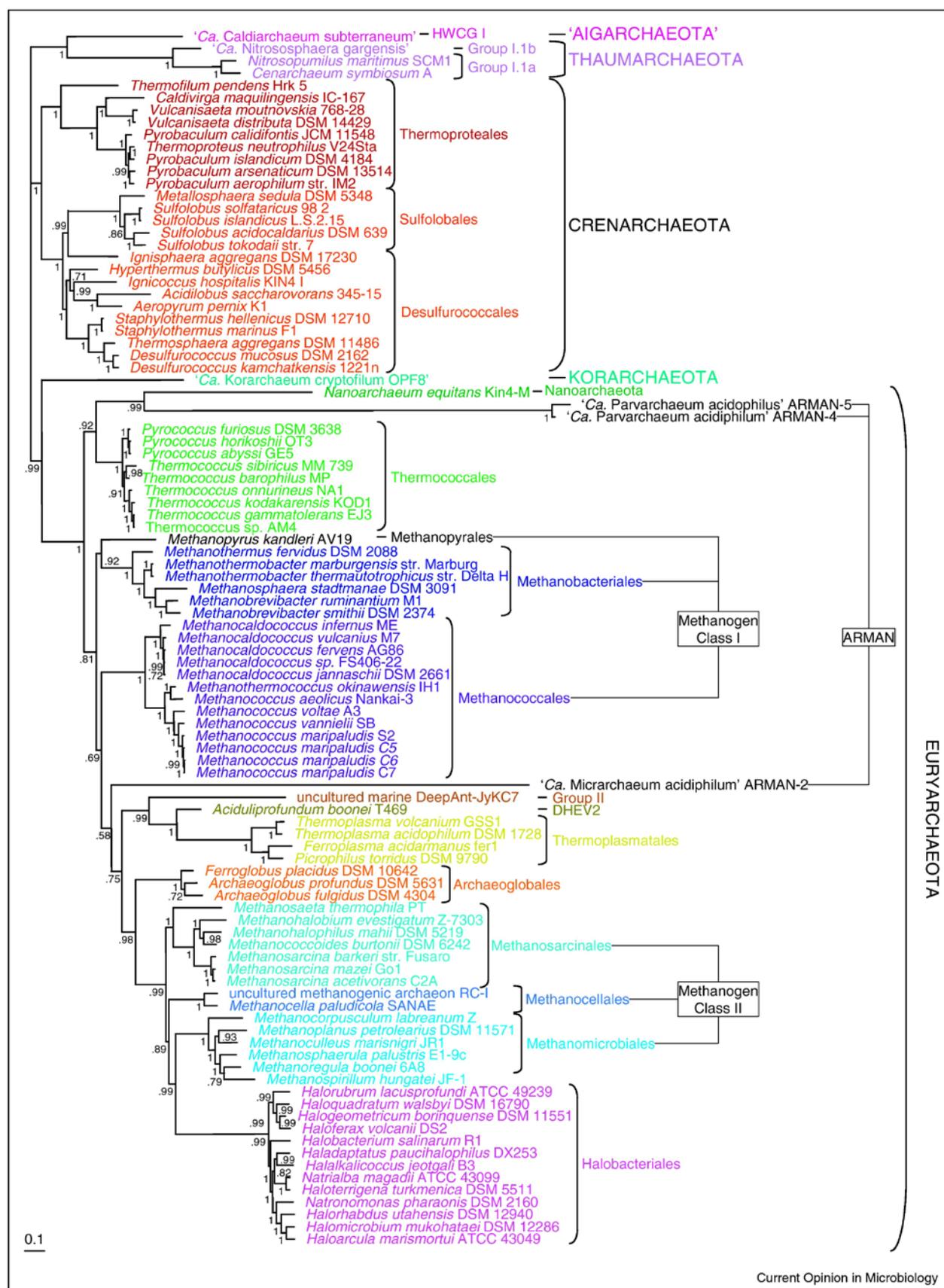


Figura 4. Árvore filoproteômica construída a partir de sequências de proteínas ribossômicas, apresentando os vários filios propostos e aceitos do Domínio Archaea (Retirado de Brochier-Armanet *et al.*, 2011).

Proposições recentes sugerem a criação de um novo táxon, denominado superfilo. A primeira destas envolve o superfilo TACK, que englobaria os filios Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota e Korarchaeota. De acordo com essa proposta, existiria maior parentesco evolutivo entre eucariotos e o superfilo TACK, devido às características em comum encontradas apenas entre os dois grupos, tais como a presença nestas archaeas de ortólogos de genes de proteínas ribossomais e fatores de alongação de transcrição eucarióticos. (Guy & Ettema, 2011). Um segundo superfilo sugerido, denominado DPANN (Rinke *et al.*, 2013), conteria os filios Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanohaloarchaeota e Nanoarchaeota. Os organismos desse superfilo possuiriam em comum tamanho celular e genoma diminutos.

O filo Thaumarchaeota, mencionado anteriormente, engloba organismos antes classificados como um grupo mesófilo do filo Crenarchaeota, cuja importância ecológica vem sendo crescentemente reconhecida, uma vez que compreende todas as archaeas oxidantes de amônia conhecidas (Pester *et al.*, 2011). Hoje acredita-se que os membros de Thaumarchaeota desempenhem papel fundamental em ciclos biogeoquímicos como do carbono, nitrogênio e enxofre (Cavicchioli, 2011). Estudos vem evidenciando a importância desses microrganismos no ciclo do nitrogênio não apenas em ambientes terrestres, mas também em ambientes aquáticos (Sauder *et al.*, 2011; Hatzenpichler, 2012), e sugerem a obtenção de culturas laboratoriais destes organismos como instrumento chave para elucidação de aspectos fisiológicos, entre outros.

1.3. Archaeas e o ciclo do Nitrogênio

Todos os organismos vivos necessitam de nitrogênio para a síntese de biomoléculas, como aminoácidos e nucleotídeos. Mesmo sendo extremamente abundante na atmosfera, o nitrogênio encontra-se inacessível para a grande maioria dos microrganismos, vegetais e animais. Apenas determinados microrganismos são capazes de transformar o nitrogênio disponível na atmosfera em compostos nitrogenados assimiláveis por produtores primários. A essa assimilação dá-se o nome de fixação, que

consiste em uma das etapas básicas do ciclo do nitrogênio (**Figura 5**), que incluem a fixação, nitrificação, desnitrificação e anammox (Nelson & Cox, 2011).

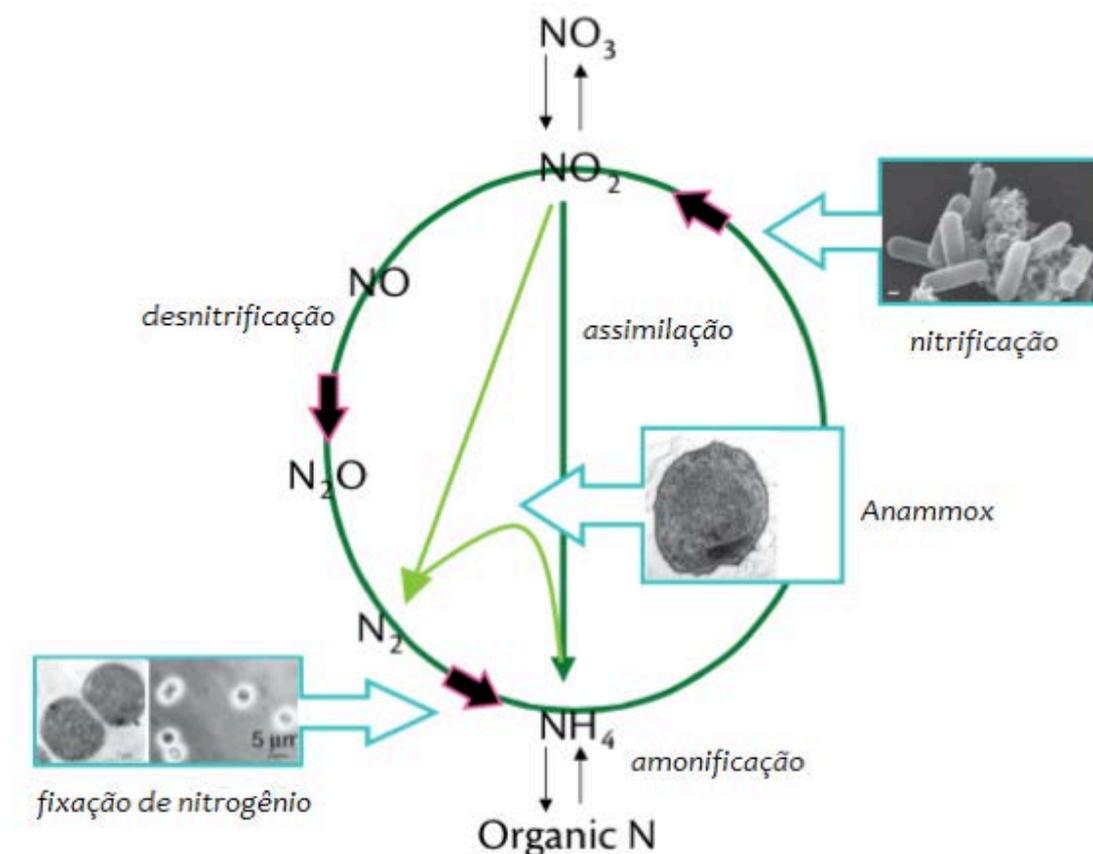


Figura 5. Ciclo do nitrogênio (Adaptado de Ward et al., 2007).

Durante a etapa de fixação, o gás nitrogênio (N_2) disponível na atmosfera é assimilado em amônia (NH_3), com alto gasto de energia, dada a forte ligação entre os átomos da molécula de dinitrogênio. A nitrificação é dividida em duas etapas: na primeira, correspondente à etapa limitante do processo, a amônia (NH_3), é oxidada em nitrito (NO_2^-) pela ação de organismos oxidantes de amônia; na segunda etapa, o nitrito é oxidado a nitrato (NO_3^-), por organismos oxidantes de nitrito. A desnitrificação é o processo onde o nitrato é convertido novamente a gás atmosférico inerte (Bernhard, 2010). Na reação de anammox, a amônia (NH_3) é oxidada

anaerobicamente, utilizando nitrito (NO_2^-) como aceptor de elétrons para formação de nitrogênio atmosférico (Strous *et al.*, 1999).

Os organismos responsáveis pelas reações do ciclo do nitrogênio variam de acordo com as etapas, porém em todas encontramos representantes do Domínio *Bacteria*. As archaeas apresentam papel importante na oxidação de amônia a nitrito, mas também podem realizar a fixação de nitrogênio atmosférico (Leigh, 2000) e processos de desnitrificação (Philippot, 2002; Offre *et al.*, 2013).

Durante muito tempo acreditou-se que a oxidação de amônia era realizada somente por bactérias oxidantes de amônia (AOB). No entanto, após o isolamento e sequenciamento do genoma do organismo *Nitrosopumilus maritimus* (Könneke *et al.*, 2005), a contribuição de archaeas passou a ser considerada nos ciclos de carbono e nitrogênio. Desde então, várias pesquisas visando a descrição de comunidades de archaeas oxidantes de amônia (AOAs), assim como o isolamento desses microrganismos, têm sido realizadas, tanto em solos (Stempfhuber *et al.*, 2014) como em ambientes aquáticos (Francis *et al.*, 2005). Os resultados obtidos até o momento indicam que AOAs apresentam maior abundância que AOB's em uma variedade de ambientes, tais como pântanos (Herrmann *et al.* 2012), solos ácidos (Zhang *et al.*, 2012) e outros ambientes aquáticos (Hong *et al.*, 2013).

O gene *amoA*, também utilizado como marcador filogenético para AOAs, codifica a α -subunidade ativa da enzima amônia monooxigenase, responsável pela etapa na qual a amônia é oxidada a nitrito (Francis *et al.*, 2005). Por tratar-se de um segmento gênico conservado, foi escolhido como um dos marcadores moleculares para estudos de diversidade em microrganismos procariotos nitrificantes de amônia, paralelamente ao uso do gene *amoB* para estudos de AOB (Calvo *et al.*, 2005).

Existem poucos estudos com o objetivo de investigar os microrganismos envolvidos no processo de nitrificação em filtros de aquários (Sauder *et al.*, 2011; Urakawa *et al.*, 2008), sendo a maioria realizados com organismos do Domínio *Bacteria* (DeLong & Hovanec, 1996; Grommen *et al.*, 2005; Bagchi *et al.*, 2014).

A dificuldade na obtenção de culturas de AOAs em meios artificiais é evidenciada pelo pequeno número de isolados descritos até o momento. Em 2005 foi descrita a primeira cultura laboratorial de uma AOA, *Nitrosopumilus maritimus* (Könneke *et al.*, 2005), adquirida a partir de um aquário de água salobra. Até hoje, esse isolamento ainda representa uma das três únicas culturas puras de AOAs obtidas, visto que a vasta maioria das culturas de archaeas mesófilas consistem em co-cultivos de archaeas e bactérias.

Desde o isolamento desse microrganismo, foram descritos apenas outros cinco gêneros cujo crescimento foi obtido com sucesso: *Nitrosocaldus*, *Nitrososphaera*, *Nitrosotalea*, *Nitrosoarchaeum* e *Nitrosotenus*.

Nitrosocaldus yellowstonii (De la Torre *et al.*, 2008), *Nitrososphaera gargensis* (Hatzenpichler *et al.*, 2008) e *Nitrosotenuis uzonensis* (Lebedeva *et al.*, 2013) são representantes termófilos, obtidos em co-culturas contendo bactérias, a partir de amostras de fontes termais do parque Yellowstone, da Sibéria e da Península Kamchatka – Rússia, respectivamente.

Em 2011, foram descritas duas linhagens do gênero *Nitrososphaera* obtidas a partir de solos de jardins da Universidade de Viena. Uma dessas linhagens, EN76, tornou-se a segunda das três culturas puras de AOAs reconhecidas, denominada *Nitrososphaera viennensis* (Tourna *et al.*, 2011). Neste mesmo ano foi descrito o co-cultivo de *Nitrosoarchaeum koreensis* (Jung *et al.*, 2011) e bactérias, a partir de amostras de ambientes estuarinos.

A terceira AOA obtida em cultura pura corresponde à acidófila *Nitrosotalea devanaterre* (Lehtovirta-Morley *et al.*, 2014), isolada primeiramente em co-cultivo (Lehtovirta-Morley *et al.*, 2011) a partir de um solo agricultável na Escócia.

1.4. Importância do Cultivo de membros do Domínio Archaea

O termo “grande anomalia da contagem em placa”, refere-se à discrepância entre o número de organismos visualizados ao microscópio e o número de organismos cultivados em meios artificiais, quando se analisa uma amostra natural (Staley & Konopka, 1985). Dadas as dificuldades de cultivo de organismos em meios artificiais, a utilização de técnicas moleculares independentes de cultivo resultou na descrição de diversas comunidades

ambientais em termos de riqueza, abundância e relações filogenéticas nunca antes imaginadas (Pace, 1997; Rinke *et al.*, 2013). Para tanto, foram empregadas diversas metodologias DNA-dependentes, tais como metagenômica, PCR quantitativa, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), microarranjo de DNA, eletroforese em gel desnaturante com gradiente (DGGE) e sequenciamento *shotgun* de DNA (McInerney *et al.*, 2001; Schleper *et al.*, 2005). As sequências geradas revelam que o número de microrganismos cultivados em laboratório representa uma parcela ínfima da riqueza e abundância de espécies encontradas em comunidades microbianas naturais (Wintzingerode *et al.*, 1997; Handelsman, 2004), como ilustrado na **Figura 6**.

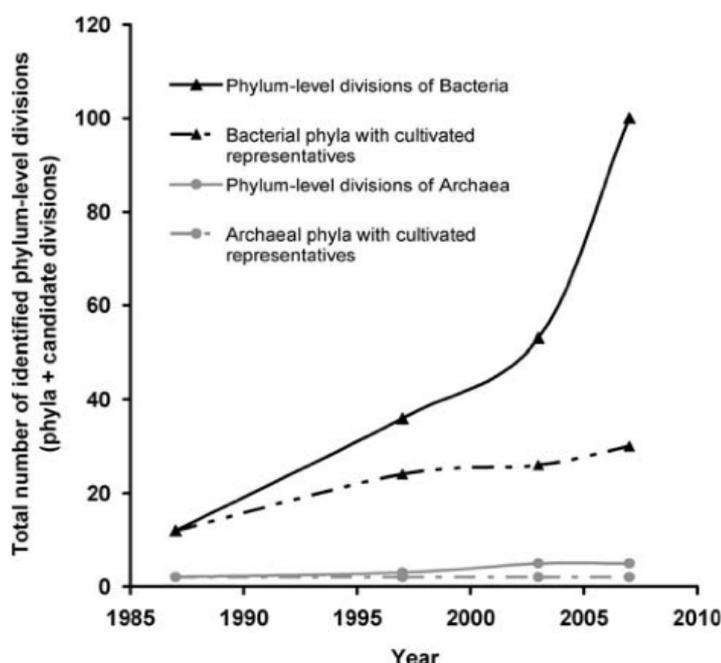


Figura 6. Número de filós, considerando-se representantes cultivados e não cultivados dos Domínios *Bacteria* e *Archaea*, identificados desde 1987 (Retirado de Allain & Querellou, 2009).

Ainda hoje, grande parte do conhecimento acerca da totalidade de microrganismos advém de técnicas independentes de cultivo. Entretanto, existem limites para a interpretação dos dados gerados em estudos envolvendo sequências gênicas de rRNA 16S ou metagenômica (Rappé &

Giovannoni, 2003). Por vezes, o resultado consiste na deposição de sequências de DNA com função desconhecida ou anotação incorreta de genes em bancos de dados (Allers & Mevarech, 2005; Graham *et al.*, 2005; Allain & Querellou, 2009). Com isso, criou-se um novo cenário: a retomada de técnicas que possibilitem o cultivo de microrganismos até então descritos apenas por técnicas metagenômicas, a fim de suprir as lacunas geradas pelas mesmas.

Mesmo considerando novas proposições metodológicas, o estabelecimento de cultivo de microrganismos em meios artificiais ainda ocorre de forma extremamente lenta. Fatores como a ausência de comunicação intercelular, composição e seletividade dos meios de cultura utilizados e qualidade das fontes de carbono e nitrogênio afetam diretamente a eficiência do cultivo.

Em relação ao cultivo de *Archaea*, a grande maioria dos isolados obtidos com sucesso em meios artificiais consiste em espécies naturalmente encontradas em condições ambientais extremas, tais como fontes sulfurosas, lagoas hipersalinas ou fendas hidrotermais (DeLong, 2003). De modo geral, o estabelecimento de culturas de archaeas extremófilas é considerado relativamente simples devido à potencial ausência de organismos considerados “contaminantes” nestes ambientes. Archaeas metanogênicas formam outro grupo de *Archaea* cujo cultivo em meios artificiais vem sendo realizado há várias décadas (Widdel, 1986). Por outro lado, o cultivo de archaeas de ambientes mesófilos ainda consiste em um grande desafio, especialmente devido à complexidade das comunidades microbianas presentes em tais ambientes, bem como a ausência de informações sobre a Biologia destes organismos.

Dentre as novas propostas visando o cultivo de organismos coletados de amostras naturais, uma das abordagens consiste no preparo de meios de cultura que apresentem composição similar à amostra original, como por exemplo, água marinha ou água doce esterilizadas e adicionadas de suplementos (Könneke *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2010). Outros estudos obtiveram sucesso utilizando meio mineral (Tourna *et al.*, 2011) ou meios com uma quantidade maior de suplementos (Lebedeva *et al.*, 2013). Uma alternativa interessante proposta por Kaeberlein e colaboradores em 2002

consiste na utilização de câmaras de difusão. Tal dispositivo consiste em dois anéis metálicos montados de forma a conter, em seu interior, membranas filtrantes com poros de diâmetro suficiente à passagem dos nutrientes, mas não de microrganismos. Durante sua montagem, é adicionado o inóculo embebido em ágar entre as membranas e o sistema é finalmente vedado e inserido no local da coleta da amostra, onde permanece por períodos variáveis de tempo, sendo examinado quanto ao crescimento microbiano. Esta abordagem tem a vantagem de permitir que o inóculo estabeleça contato com os nutrientes e produtos presentes em seu ambiente natural, sem permitir a entrada de outros organismos na cultura. Este tipo de estratégia mostrou-se especialmente eficiente quando utilizado em ambientes aquáticos.

Outras técnicas vem sendo empregadas com o objetivo de eliminar a população bacteriana, tais como uso de antimicrobianos com alvos moleculares específicos para o Domínio *Bacteria*, processos de filtração, diluição seriada das culturas (Blainey *et al.*, 2011) e citometria de fluxo (De la Torre *et al.*, 2008).

Mesmo apresentando dificuldades, o cultivo de AOAs permanece como uma das figuras centrais nos estudos acerca do filo Thaumarchaeota. O sucesso no cultivo desses organismos em meios artificiais contribuirá para estudos visando elucidar o papel metabólico de archaeas nos ciclos microbianos do nitrogênio e carbono, tanto em ambientes aquáticos quanto em terrestres.

1.5. Potencial Biotecnológico do Domínio Archaea

Abordagens envolvendo o potencial biotecnológico de archaeas até hoje envolvem, em grande maioria, o isolamento de extremoenzimas, obtidas a partir de organismos termófilos. Atualmente, algumas dessas enzimas, como lipases, proteases ou aquelas que hidrolisam glicose, são utilizadas para aperfeiçoamento de processos de manufatura de papel, formação de biomassa e processamento de amido (Cardoso *et al.*, 2003).

Uma das maiores contribuições de archaeas à biologia molecular corresponde à DNA polimerase termoestável *Pfu*, obtida de *Pyrococcus*

furiosus. A *Pfu* é uma DNA polimerase termoestável, extremamente eficiente, com taxa de erro até 10 vezes menor em ensaios de PCR, quando comparada à tradicional *Taq* DNA polimerase, isolada da bactéria *Thermus aquaticus* (Alquères *et al.*, 2007).

Em relação ao Domínio *Bacteria*, vários trabalhos descrevem aplicações biotecnológicas da camada S, devido à sua capacidade de auto-organização homogênea, podendo resultar na obtenção de nanopartículas ou estruturas organizadas, carreadores de moléculas de interesse. Dentre as aplicações já descritas para proteínas S de bactérias podemos citar o desenvolvimento de vacinas, kits diagnósticos, membranas de ultrafiltração, dispositivos de biocatálise e construção de biosensores (Egelseer *et al.*, 2009; Sleytr & Sára, 1997; Ilk *et al.*, 2011). Embora o estudo de proteínas de camada S do Domínio *Archaea* esteja ainda em fase inicial, o mesmo justifica-se pelo fato destas proteínas apresentarem a capacidade de formação de nanoestruturas menores que aquelas obtidas a partir de proteínas bacterianas (Selenska-Pobell *et al.*, 2011). Assim, a detecção dessa estrutura em novas linhagens cultivadas de archaea poderá permitir a caracterização dessas proteínas, além de sua utilização em novas abordagens biotecnológicas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Filogenia e cultivo de membros de Domínio *Archaea* a partir de um aquário residencial de água doce.

2.2. Objetivos Específicos

- Obtenção de culturas de *Archaea* em meios artificiais seletivos;
- Caracterização morfológica dos microrganismos cultivados;
- Caracterização filogenética das culturas obtidas por meio do sequenciamento do gene de rRNA 16S;
- Verificação do potencial nitrificante das archaeas cultivadas;
- Caracterização filogenética da diversidade da comunidade de *Archaea* presente no ambiente do aquário, por meio do sequenciamento do gene de rRNA 16S.

3. *Materiais e Métodos*

3.1. *Coleta das amostras*

A amostra utilizada para a obtenção de culturas em meios artificiais foi obtida a partir de um aquário de água doce de 200 litros, equipado com luz artificial e localizado em uma residência na área urbana do Distrito Federal, Brasil. O aquário possuía em sua composição cerca de 5 variedades de peixes e era mantido em temperatura média de 28°C e pH na faixa de 6,5.

Esta amostra consistiu em uma mistura heterogênea, composta pela água circulante, sedimento próximo às plantas ornamentais, fragmentos de membrana de pré-filtração, água presente no sistema de recirculação e esferas porosas de cerca de 1 cm de diâmetro, utilizadas como substrato para os processos de mineralização de compostos orgânicos e desnitrificação do aquário. Todos os elementos constituintes da amostra foram acondicionados em um mesmo frasco plástico, que imediatamente após a coleta foi transportado ao laboratório.

Uma segunda amostra (denominada amostra do aquário), composta principalmente pela água circulante e esferas porosas, foi coletada em um momento posterior, sendo utilizada diretamente para a extração de DNA e análise da comunidade de *Archaea* presente no aquário.

3.2. *Preparo dos meios e condições de cultivo*

A água circulante do aquário, utilizada como substrato para a preparação do meio de cultura, foi submetida a análises químicas com o objetivo de mensurar compostos orgânicos e inorgânicos presentes no sistema que poderiam influenciar no crescimento dos microrganismos. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Águas do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da UnB.

Os meios de cultura para *Archaea* foram confeccionados utilizando-se a água do aquário submetida à esterilização por filtração e, em seguida, autoclavada. Para a confecção de meios sólidos, foi adicionado ágar, na concentração final de 2% aos meios líquidos.

Visando tornar os meios seletivos para *Archaea*, foram adicionados diversos agentes antimicrobianos, conforme apresentado na **Tabela 2**. Estes agentes foram adicionados de forma sequencial. Inicialmente, foi utilizada apenas ampicilina, seguida dos agentes antifúngicos Anfotericina B e Itraconazol quando houve proliferação de células fúngicas. Em seguida, foram adicionados estreptomicina, polimixina B e cloranfenicol. Visando eliminar as bactérias das culturas, novos antibióticos foram sequencialmente testados em meio sólido, sem a adição dos antibióticos de fluxo contínuo (identificados na **Tabela 2**).

Com o objetivo de enriquecer as culturas com archaeas oxidantes de amônia (AOA), os meios foram adicionados de cloreto de amônio (NH₄Cl), na concentração final de 1mM.

Todas as culturas foram mantidas em estufa a 28°C durante o decorrer o trabalho.

Tabela 2. Agentes adicionados aos meios de cultura

	Concentração Estoque	Concentração de Uso
Ampicilina*	50 mg/ml	100 µg/ml
Estreptomicina*	25 mg/ml	50 µg/ml
Polimixina B*	50 mg/ml	50 µg/ml
Cloranfenicol*	20 mg/ml	20 µg/ml
Doxicilina	50 mg/ml	20 µg/ml
Norfloxacina	30 mg/ml	200 µg/ml
Kanamicina	50 mg/ml	50 µg/ml
Carbenicilina	50 mg/ml	100 µg/ml
Anfotericina B*	30 mg/ml	20 µg/ml
Itraconazol*	4 mg/ml	0,25 µg/ml

*Antimicrobianos de uso contínuo

Visando a realização de análises fisiológicas, tais como a determinação dos valores ótimos de pH e temperatura das culturas, amostras de todos os tipos coloniais foram inoculadas em meios de cultura líquidos. As

culturas foram mantidas em tubos de vidro estéreis a 28°C, sob agitação de 150 RPM.

3.3. Caracterização Morfológica das amostras Cultivadas

3.3.1. Microscopia óptica

As análises de microscopia óptica foram realizadas a partir de esfregaços corados pelo método de Gram. Para tanto, 1mL das culturas líquidas foram transferidas para tubos tipo eppendorf. No caso das culturas em meios sólidos, alíquotas das colônias colhidas com palitos estéreis foram adicionadas a tubos contendo 200 µL de PBS 1x (1,37M de NaCl, 27 M de KCl , 81 mM de NaH₂PO₄ e 15 mM de KH₂PO₄ em pH 7,2 e diluído 10 vezes). Os tubos contendo as células foram centrifugados a 3500 g por 5 minutos e o sobrenadante, descartado. Os sedimentos foram ressuspensos em 50 µL, transferidos para lâminas de vidro limpas, sendo os esfregaços secos e fixados pelo calor, em Bico de Bunsen. As lâminas foram então submetidas à coloração de Gram, de acordo com protocolo padrão e observadas ao microscópio óptico comum em aumento de 1000X.

Com o intuito de comparar o tamanho e morfologia celulares, representantes de *Bacillus* sp. e da colônia Delta foram misturadas em um tubo *eppendorf* contendo 300 µL de água destilada. Os tubos foram centrifugados a 3500 g por 5 minutos e o sedimento transferido para uma lâmina de vidro limpa. O esfregaço foi seco e fixado pelo calor, corado com fucsina e analisado ao microscópio.

3.3.2. Microscopia eletrônica de varredura - MEV

Alíquotas das colônias foram retiradas dos meios de cultura com o auxílio de alça de níquel-cromo estéril, sendo então transferidas para tubos tipo eppendorf contendo fixador Karnovsky. A preparação da amostra seguiu protocolo padrão para microscopia de varredura (Castro *et al.*, 2001).

As lamínulas contendo as amostras foram analisadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília, com equipamento Jeol JSM-10001F.

3.3.3. *Microscopia eletrônica de transmissão - MET*

Dois tipos coloniais distintos, denominados Pi e Delta, foram selecionados para protocolo de contrastação negativa, por apresentarem morfologias coloniais distintas. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília, com o equipamento Jeol 1001.

As células foram ressuspensas em tubos *ependorfs* contendo 200 μL de tampão PBS 1x e centrifugadas a 3500 *g* por 5 minutos. Essa etapa foi repetida três vezes e, ao final, o máximo de sobrenadante foi descartado, permanecendo cerca de 50 μL em cada tubo. A suspensão celular foi adicionada a uma grade de cobre de 200 mesh, tratada previamente com filme de poliacetato de vinila (FORMVAR). Após 5 minutos, o excesso de tampão foi retirado da grade para secagem do material.

Cada amostra foi submetida a um tipo de contrastação: com acetato de uranila 1% para a amostra Pi e com tetróxido de ósmio (OsO_4) para a amostra Delta. A grade com a amostra Pi foi banhada com uma gota de acetato de uranila e incubada em ambiente livre de luz por 5 minutos. Em seguida, o excesso do reagente foi retirado com auxílio de uma folha de lenço de papel, para secagem da amostra. A grade de Delta foi incubada durante meia hora em um recipiente fechado e forrado com material absorvivo que continha em uma extremidade uma gota de tetróxido de ósmio e, na extremidade oposta, a grade da amostra.

3.3.4. *Microscopia de força atômica - MFA*

As mesmas amostras Pi e Delta foram selecionadas para análise por microscopia de força atômica, realizada no Laboratório de Espectrometria de Massa (PBI) da Embrapa – Cenargen, de acordo com protocolo padrão realizado naquele laboratório.

3.4. Análises de filogenia molecular

3.4.1. Extração de DNA das colônias obtidas

Os diferentes tipos coloniais obtidos durante o cultivo foram submetidos à extração de DNA com o kit *Wizard® SV 96 GENOMIC DNA Purification System* (Promega™) segundo protocolo do fabricante, com pequenas modificações.

As células foram ressuspensas em tubos tipo *ependorf* estéreis contendo 100 µL de PBS 1x e centrifugadas a 3500 g por 4 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foi adicionada a cada tubo uma Solução de Digestão descrita pelo fabricante no protocolo de extração de DNA de tecido. As células foram então incubadas por 90 minutos a 55°C, em banho seco. As amostras tratadas foram adicionadas de 150 µL de tampão de lise disponibilizado pelo kit. A partir desta etapa, a extração seguiu o protocolo de “Extração de DNA Genômico de Culturas de Células de Tecidos”, disponibilizado no kit.

A qualidade da extração foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (10 mg/ml) e por espectrofotômetro Nanovue®, disponível no Departamento de Genética e Morfologia da UnB.

3.4.2. Extração de DNA da amostra do aquário

A extração de DNA foi realizada utilizando-se *Powersoil DNA Isolation Kit* (MO-Bio Laboratories), de acordo com o protocolo do fabricante. Foram utilizadas 0,5 g da amostra original e a eficiência da extração foi avaliada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (na concentração final de 10 mg/ml) e por espectrofotômetro Nanovue®.

3.4.3. Experimentos de PCR e Iniciadores utilizados

O DNA extraído das colônias obtidas, assim como o DNA da amostra do aquário, foram submetidos a ensaios de PCR dirigidos ao gene de rRNA 16S de *Archaea*, empregando-se os iniciadores 21f - 958r (DeLong *et al.*, 1992) e 519f - 915r (Coolen *et al.*, 2004), como ilustrado na Tabela 3.

Na técnica de *Nested* PCR, após a reação com os iniciadores 21f - 958r, uma alíquota de cada sistema de reação foi utilizada como DNA molde na PCR seguinte, empregando-se os iniciadores 519f - 915r.

Visando analisar se os tipos coloniais obtidos consistiam em culturas puras de *Archaea* ou em co-cultivos, o DNA das colônias também foi submetido a ensaios de PCR com o par de iniciadores 27f - 1492r (**Tabela 3**), específico para sequências do gene de rRNA 16S do Domínio *Bacteria* (Weisburg *et al.*, 1991).

Com o objetivo de verificar a presença de archaeas oxidantes de amônia (AOA) nas culturas obtidas, o DNA dos diferentes tipos coloniais foi também submetido, a ensaios de PCR com iniciadores dirigidos para o gene *amoA* de *Archaea*, *amoAf* - *amoAr* (Francis *et al*, 2005).

Tabela 3. Iniciadores específicos utilizados nos ensaios de PCR

Iniciador	Sequência	Produto esperado
21f – 958r (DeLong <i>et al.</i> , 1992)	21f: 5' TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA 3' 958r: 5' YCC GGC GTT GAM TCC AAT T 3'	937 pb
519f – 915r (Coolen <i>et al</i> , 2004),	519f: 5' CAG CCG CCG CGG TAA 3' 915r: 5' GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT 3'	396 pb
27f – 1492r (Weisburg <i>et al.</i> , 1991)	27f: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' 1492r: 15' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'	1465 pb
<i>amoAf</i> - <i>amoAr</i> (Francis <i>et al</i> , 2005).	amoAF: 5' STA ATG GTC TGG CTT AGA CG 3' amoAR: 5' GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT 3'	635 pb

As concentrações dos reagentes utilizados e as condições empregadas nos ensaios de PCR são apresentadas nas **Tabelas 4 a 8**.

Todos os ensaios de PCR foram realizados em termociclador MJ Research PTC-100 (*Peltier Thermal Cycles*) em reações de 50 µL, contendo 5 ng de DNA. Em todos os experimentos dirigidos ao gene de rRNA 16S de *Archaea*, foram utilizados DNA de *Escherichia coli* ou *Salmonela* sp., como controle negativo. Nessas reações, o DNA extraído da amostra do aquário foi utilizado como controle positivo. Nos ensaios de PCR específicos para o

gene de rRNA 16S de *Bacteria*, o DNA de bactérias foi utilizado como controle positivo.

Tabela 4. Concentração dos reagentes utilizados nos ensaios de PCR

Reagente	Concentração de uso
Tampão de Reação	1 x
MgCl ₂	1,5 mM
BSA	400 ng/μl
Iniciador F	0,5 μM
Iniciador R	0,5 μM
dNTPs	200μM
<i>Taq</i> DNA polimerase	1,25 U

A qualidade dos produtos de amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (na concentração final de 10 mg/mL). O tamanho dos fragmentos foi comparado aos fragmentos dos marcadores de massa molecular *1 kb Plus DNA ladder* e *1 kb DNA ladder* (Invitrogen).

Tabela 5. Condições utilizadas nas PCR com os iniciadores 21f - 958r (Nested 1)

Desnaturação a 94°C/5 minutos
Desnaturação a 94°C/1 minuto
Anelamento a 55°C/1 minuto
Extensão a 72°C/1,30 minuto
Repetição dos passos 2 a 4 por 29 vezes
Extensão final a 72°C/5 minutos
Manutenção a 4°C

Tabela 6. Condições utilizadas nas PCR com os iniciadores 519f – 915r (Nested 2)

Desnaturação a 94°C/30 segundos
Desnaturação a 94°C/30 segundos
Anelamento a 57°C/40 segundos
Extensão a 72°C/50 segundos
Repetição dos passos 2 a 4 por 29 vezes
Extensão final a 72°C/5 minutos
Manutenção a 4°C

Tabela 7. Condições utilizadas nas PCR específicas para o Domínio *Bacteria*

Desnaturação a 94°C/5 minutos
Desnaturação a 94°C/1 minuto
Anelamento a 55°C/1 minuto
Extensão a 72°C/2 minuto
Repetição dos passos 2 a 4 por 29 vezes
Extensão final a 72°C/10 minutos
Manutenção a 4°C

Tabela 8. Condições utilizadas nas PCR para o gene *amoA*

Desnaturação a 95°C/5 minutos
Desnaturação a 95°C/45 segundos
Anelamento a 53°C/1 minuto
Extensão a 72°C/1 minuto
Repetição dos passos 2 a 4 por 29 vezes
Extensão final a 72°C/15 minutos
Manutenção a 4°C

3.4.4. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos amplificados a partir do DNA das colônias foram purificados utilizando-se o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante, e enviados diretamente ao sequenciamento de DNA, sem qualquer etapa prévia de clonagem e transformação.

3.4.5. Clonagem dos produtos amplificados em vetor *pGEM-T Easy* e transformação de células de *Escherichia coli*

Os produtos de PCR obtidos a partir do DNA da amostra do aquário foram ligados ao vetor *pGEM-T Easy* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Os sistemas de ligação foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente e armazenados em geladeira por aproximadamente 18 horas.

3.4.5.1. Preparação de células competentes de *E. coli DH5 α* para transformação por choque térmico

Uma colônia de *E. coli* DH5- α foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido e incubada em estufa, a 37°C, por uma noite. Após esse período, 300 μ L desta cultura foram inoculados em um frasco contendo 30 mL de meio LB, incubado sob agitação de 220 rpm a 37°C até que a cultura atingisse uma OD₆₀₀ entre 0,2 e 0,3. A cultura foi então transferida para tubos de plástico estéreis e centrifugada a 1250 *g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas delicadamente em 15 mL de solução de CaCl₂ 100 mM gelada e incubadas em gelo, por um período de 20 a 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 *g* por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de solução de CaCl₂ 100 mM gelada. Os sistemas de transformação foram então incubados em gelo por um período mínimo de 1 hora. Após esse período, alíquotas de 100 μ l das células tratadas foram adicionadas a tubos contendo de 5 ou 10 μ L dos sistemas de ligação, que foram incubados em gelo por 30 minutos. Ao término deste tempo, os tubos foram transferidos para um banho a 37°C e incubados por 5 minutos. Em seguida, 1 mL de meio

LB foi adicionado a cada sistema, os quais foram incubados em estufa a 37°C, por 1 hora. Após o período de incubação, alíquotas de 25 a 150 µL de cada sistema de transformação foram inoculados com auxílio de pérolas de vidro estéreis em placas com ágar LB, adicionado de IPTG (0,5 mM), Xgal (0,00625%) e ampicilina (150 µg/mL). As placas foram então incubadas em estufa a 37°C por uma noite.

3.4.6. *Extração de DNA plasmidial por lise alcalina (adaptado de Dagert & Ehrlich, 1979)*

Alíquotas das colônias recombinantes foram transferidas para tubos de vidro estéreis contendo 5 mL de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e incubados a 37°C por uma noite. Nesta etapa foram também preparados estoques dos clones recombinantes em glicerol, na concentração final de 35%.

As culturas resultantes foram transferidas para tubos tipo *ependorf* e centrifugadas a 3500 *g* por 5 minutos à temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado. Quando necessário, tal procedimento foi repetido, a fim de promover um maior acúmulo de células.

Os sedimentos foram ressuspensos em 100 µL de Solução I (50 mM de Glicose, 25 mM de Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8) e incubados à temperatura ambiente por 5 minutos. Foram então adicionados 200 µL de Solução II (0,2 NaOH, 1% SDS - preparada no momento de uso) e os tubos incubados em gelo por 5 minutos. Findo o tempo, foram adicionados 150 µL de Solução III (3 M Acetato de Potássio, 2 M Ácido Acético glacial, pH 4,8) e os sistemas novamente incubados por 5 minutos em gelo. Os tubos foram então centrifugados a 12000 *g* por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos tipo *ependorf*, adicionados de 6 µL de RNase A (20 mg/mL) e incubados a 37°C por 1 hora. Em seguida, foi adicionado 1 volume de clorofane (25 fenol : 24 clorofórmio : 1 álcool iso-amílico) a cada tubo e os mesmos foram homogeneizados e centrifugados a 7000 *g* por 3 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionada de 3 volumes de etanol 100% gelado. Os tubos foram mantidos por uma noite a -20°C e centrifugados a 12000 *g* por 5 minutos a

4°C. O etanol 100% foi descartado, 300 µL de etanol 70% gelado foram adicionados aos tubos, que foram então novamente centrifugados a 12000 g por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os tubos invertidos, para secagem do sedimento, à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensão em 50 µL de H₂O milli-Q e analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

3.4.7. Sequenciamento de DNA

Os fragmentos amplificados a partir do DNA das colônias foram diretamente sequenciados, em placas de 96 poços, no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, no sequenciador automático ABI B730 da *Applied Biosystems*, e no Laboratório de Biotecnologia da Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília (UCB). Na UCB, foi utilizado sequenciador automático ABI 3130 XL da *Applied Biosystems*. Para estes fragmentos foram empregados tanto o iniciador 519f quanto o iniciador 27f, dependendo do sequenciamento em questão.

O sequenciamento do DNA da biblioteca originada a partir da amostra do aquário foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, em placas de 96 poços. Para estes fragmentos foi empregado o iniciador 519f.

O sequenciamento dos amplicons gerados nos ensaios de PCR com iniciadores dirigidos ao gene *amoA* foram realizados por meio dos serviços da empresa MacroGen®, com o sequenciador automático ABI 3730 XL da *Applied Biosystems*. No caso desses fragmentos, foram enviados dois tubos de cada amostra, de modo que fosse realizado o sequenciamento com ambos os iniciadores, tanto amoAf quanto amoAr.

3.4.8. Análises de Bioinformática

As sequências de DNA foram selecionadas de acordo com a qualidade com o algoritmo PHRED (Ewing, 1998). A análise foi realizada *online*, com a ferramenta *Electropherogram quality analysis* (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>), onde foram selecionadas

sequências com valor de PHRED superior a 20. Essa ferramenta também possibilitou a remoção das sequências relativas ao vetor de clonagem utilizado. As sequências da biblioteca de clones referentes à amostra do aquário foram também analisadas pelo programa Bellerophon (Huber *et al.*, 2004), disponível em <http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>, em busca de quimeras.

As sequências consideradas de boa qualidade foram submetidas a análises comparativas empregando-se a ferramenta *BLASTN* contra o banco de dado não redundante do *National Center for Biotechnology Information - NCBI* (Altschul *et al.*, 1990) e o banco de dados do *Ribosomal Database Project - RDP*, por meio da ferramenta *Classifier* (Wang *et al.*, 2007). Todas as sequências que apresentaram identidade igual ou superior a 90% com sequências previamente depositadas nos bancos de dados foram consideradas válidas para este trabalho.

As sequências válidas foram alinhadas por meio do algoritmo NAST (DeSantis *et al.*, 2006), disponibilizado no site Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>). Este algoritmo gera colunas formadas por lacunas, que foram filtradas por meio do programa MOTHUR (Schloss *et al.*, 2009). As sequências foram então editadas manualmente pelo programa Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

No caso das sequências geradas pela biblioteca de clones, o programa MOTHUR também foi utilizado para estimar a riqueza de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) por meio dos índices de Ace e Chao, relacionados à diversidade alfa da comunidade do aquário. Para a construção de curvas de rarefação, os limites considerados foram de 80% para nível taxonômico de filo, 90% para classe, 95% para gênero e 97% para espécie.

As árvores filogenéticas foram construídas por meio do programa MEGA (Tamura *et al.*, 2013), empregando-se os métodos de *Neighbor joining* e de Máxima Verossimilhança, dependendo da árvore construída. Todas as árvores tiveram a sua robustez verificada com bootstrap de 1000 réplicas. Em todas as árvores construídas a partir do método de máxima verossimilhança foram utilizadas sequências de exemplares bacterianos como grupo externo.

4. Resultados e Discussão

4.1. Coleta das amostras e cultivo de Archaea em meios artificiais

A coleta das amostras foi realizada em um aquário de água doce residencial, estabilizado, de aproximadamente 20 anos. Aquários novos regularmente apresentam picos de amônia associados à falta de organismos nitrificantes no sistema. A coleta foi realizada aproximadamente 15 dias depois do mesmo ter passado por procedimentos de limpeza periódica de manutenção. Entre dois processos de limpeza consecutivos, o aquário passa por um ciclo de estabelecimento de equilíbrio. Determinado tempo após esse período, devido à constante reciclagem da água e ao acúmulo de excretas tóxicos, o ecossistema encontra-se novamente em desequilíbrio, o que demanda a limpeza periódica. Por esse motivo, tanto as amostras como os volumes adicionais de água utilizados para a confecção dos meios de cultura foram coletados em períodos intermediários entre os procedimentos de limpeza.

A água circulante do aquário, quando submetida às análises químicas, gerou os dados presentes na **Tabela 9**. Para fins comparativos, foram também incluídos nesta tabela os valores considerados normais para os padrões de potabilidade. As análises revelaram pequenas quantidades de amônia, resíduo nitrogenado excretado por peixes e outros organismos aquáticos, considerado um fator limitante na criação de peixes (Tomasso, 1994). Em soluções aquosas encontramos amônia dissolvida não ionizada (NH_3) e a sua forma ionizada (íon amônio, NH_4^+), sendo que os efeitos tóxicos desse excreta na água podem ser relacionados principalmente à sua forma não ionizada (Martínez *et al.*, 2006). A quantificação da amônia nessa forma apresentou valor de 0,22mg/L, considerado alto para alguns sistemas aquáticos (Bianco, 2011). O ciclo do nitrogênio envolve a oxidação da amônia a nitrito e, posteriormente, de nitrito a nitrato. As leituras indicam altos valores de nitrato (155,57mg/mL), considerado mediano para a criação de peixes em aquários de água doce (Bianco, 2011). Não foram verificados níveis mensuráveis de nitrito na água livre analisada. Esses resultados são condizentes com a origem da amostra, que consistiu na água circulante do

tanque, e não na água de recirculação do biofiltro. Durante o ciclo do nitrogênio, o nitrito corresponde à forma mais tóxica presente na água. Por esse motivo, os valores de referência limítrofes desse composto são extremamente baixos quando comparados aos limites de nitrato. Todavia, trata-se de um forma altamente volátil, sendo facilmente eliminada na forma de gás. Por essa razão, espera-se uma maior fração de nitrato, composto nitrogenado menos tóxico, na água circulante, dado confirmado pelas análises.

Tabela 9. Análise das propriedades físico-químicas da água do aquário

Parâmetro Analisado	Resultado	VMP Port. 2914/11***
Alcalinidade (mg/L CaCO ₃)	5	-
Amônia (mg/L NH ₃)	0,22	1,5
Cloreto (mg/L)	22,48	250
Condutividade (µS/cm)	625	-
Cor aparente (UH)	-	15
Nitrato (mg/L como NO ₃ ⁻)	155,57	10
pH	5,01	6,0 a 9,5
Nitrito (mg/L como NO ₂ ⁻)	-	1
Fluoreto (mg/L como F ⁻)	0,37	1,5
Nitrogênio total (mg/L TKN*)	13	-
Fosfato (mg/L como PO ₄ ³⁻)	27,26	-
Sulfato (mg/L como SO ₄ ²⁻)	74,13	250
Alumínio (mg/L Al ECR**)	13	0,2

*TKN: Refere-se ao Método de análise de nitrogênio total (Kjeldahl).

**ECR: Refere-se ao Método de análise de determinação de alumínio em água (*Rapid Modified Eriochrome Cyanine R*).

***VMP Port. 2914/11: Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Portaria 2914, publicada pelo Ministério da Saúde, em 12/12/2011.

Visando a obtenção de culturas de diferentes archaeas e, devido ao desconhecimento de suas necessidades nutricionais, foi estabelecida uma metodologia baseada no uso de um meio de cultura com características similares ao ambiente de onde a amostra foi retirada. Este tipo de abordagem

foi empregado com sucesso, pelo uso de câmaras de difusão, mencionadas anteriormente (Kaeberlein *et al.*, 2002). Outras abordagens de mimetismo envolvem o uso direto do ambiente original da amostra. No caso de ambientes aquáticos, a água é filtrada e utilizada como o próprio meio de cultivo. Essa técnica, além de mais simples, já havia sido testada com sucesso para archaeas nitrificantes (Könneke *et al.*, 2005).

Assim, a água do aquário esterilizada por filtração em membranas com diâmetro de poros de 0,22 µm foi utilizada como meio de cultura. Como fonte adicional de nitrogênio, o cloreto de amônio (NH₄Cl) foi utilizado por já ter sido descrito no cultivo de archaeas nitrificantes, como *Nitrosopumilus maritimus* (Könneke *et al.*, 2005) e *Nitrosotalea devanaterre* (Lehtovirta-Morley *et al.*, 2011).

Diversos agentes antimicrobianos foram utilizados de forma contínua com o intuito de evitar a proliferação de células bacterianas (**Tabela 10**). Inicialmente, a amostra destinada ao cultivo foi mantida sem a adição de antimicrobianos. Após quatro dias, foi adicionada ampicilina, e em seguida, Anfotericina B, para conter a proliferação de leveduras. Após cerca de 20 dias foi também adicionado de itraconazol, cloranfenicol, polimixina B e estreptomicina.

No entanto, mesmo após a adição destes antimicrobianos, foi ainda constatada a presença de bactérias nas culturas e, por esse motivo, foram preparadas placas contendo novos antibióticos (Norfloxacina, Doxiciclina, Carbenicilina, Kanamicina), em substituição àqueles de fluxo contínuo. Após a extração de DNA das colônias e ensaios de PCR com iniciadores específicos para o Domínio *Bacteria*, todas apresentaram-se positivas para tais organismos, indicando a manutenção das culturas como co-cultivos com *Bacteria*.

Tendo em vista que, dentre as colônias obtidas, foram detectadas archaeas potencialmente oxidantes de amônia, é possível que a adição do cloreto de amônio aos meios tenha facilitado o crescimento de tais organismos.

Tabela 10. Agentes antimicrobianos utilizados e mecanismos de ação.

Antimicrobiano	Mecanismo de ação
Ampicilina	Inibição da síntese da PC (B)
Anfotericina B	Permeabilidade da MC (E)
Itraconazol	Permeabilidade da MC (E)
Estreptomicina	Inibição da síntese protéica (B)
Polimixina B	Permeabilidade da MC (B)
Cloranfenicol	Inibição da síntese proteica (B)
Norfloxacina	Inibição da síntese de DNA (B)
Doxiciclina	Inibição da síntese protéica (B)
Carbenicilina	Inibição da síntese da PC (B)
Kanamicina	Inibição da síntese protéica (B)

(PC): Parede Celular; (MC): Membrana citoplasmática; (B): Domínio *Bacteria*; (E): Domínio *Eucarya*.

O monitoramento das culturas por meio de exames microscópicos de preparações coradas com método de GRAM foi de grande importância no controle do crescimento. O estágio inicial de estabelecimento das culturas foi marcado pela presença de grande quantidade de células fúngicas que, devido à adição dos primeiros antimicrobianos serem voltados ao Domínio *Bacteria*, viram-se sob baixa pressão seletiva (Thiele-Bruhn & Beck, 2005; Dollive *et al*, 2013) A partir de então, a adição de Anfotericina B e Itraconazol, facilitou a seleção de células procarióticas em todas as culturas.

4.2. Caracterização morfológica das colônias obtidas

Após cerca de 50 dias de cultivo da amostra inicial, alíquotas de 20 µL da cultura foram inoculadas em meios sólidos. Após longos períodos de incubação, cerca de 30 dias, foi possível selecionar tipos coloniais com características macroscópicas distintas. Este longo tempo de desenvolvimento mostrou-se condizente com aquele descrito para alguns tipos de *Archaea* já cultivadas, inclusive em trabalhos envolvendo co-culturas, como no caso de *N. devanaterria* (Krüger *et al*, 2008; Lehtovirta-Morley *et al*, 2011). Em seu trabalho de 2011, Lehtovirta-Morley e colaboradores

descrevem a presença de células maiores nas culturas, observadas por análises de MEV em fases iniciais de crescimento, porém praticamente inexistentes na fase estacionária, quando os campos eram dominados por células claramente menores, quase imperceptíveis nas análises iniciais. Experimentos de FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*) com sondas específicas para o Domínio *Archaea* e *Bacteria* durante os diferentes estágios de crescimento das culturas demonstraram que as células pequenas e de crescimento lento tratavam-se de exemplares de *Archaea*, enquanto as células de maior tamanho pertenciam ao Domínio *Bacteria*.

Dessa maneira, após 5 meses de repiques sucessivos, foram obtidos 11 tipos coloniais que apresentavam características morfológicas macro e microscópicas sugestivas de *Archaea*, que foram nomeados de acordo com o alfabeto grego (Alfa, Beta, Delta, Eta, Kappa, Lambda, Mi, Pi, Psi, Rho e Ômega). Embora algumas colônias apresentassem aspectos macroscópico e microscópico similares, estas foram mantidas até a caracterização final por sequenciamento de DNA.

As amostras denominadas Eta e Pi apresentavam colônias achatadas, esbranquiçadas e de aspecto rizóide. O tempo para a visualização destas colônias dava-se entre 7 ou 8 dias após a semeadura, sendo seu crescimento quase imperceptível. As colônias das demais amostras apresentavam aspecto arredondado, brilhantes, convexas, de coloração esbranquiçada, com até 3mm de diâmetro (**Figura 7**).

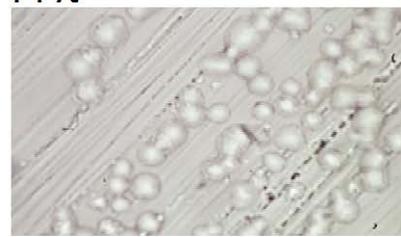
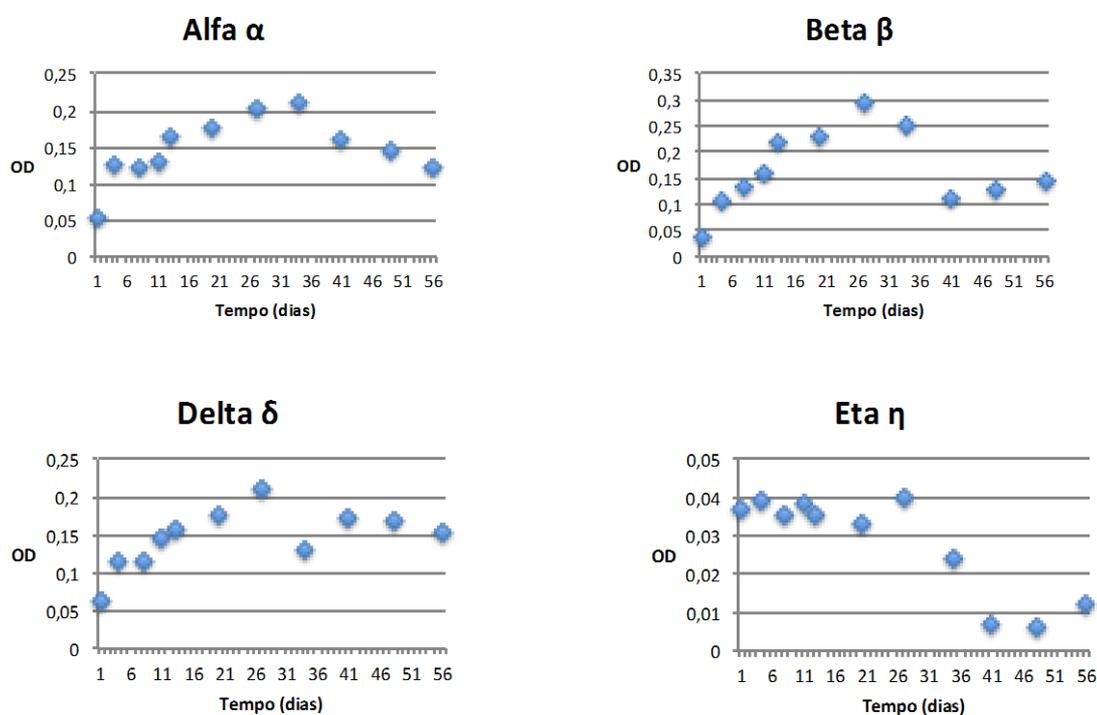
Alfa α Delta δ Kappa κ Mi μ Psi ψ Ômega ω Beta β Eta η Lambda λ Pi π Rho ρ

Figura 7. Aspecto macroscópico dos tipos coloniais obtidos. As imagens foram obtidas por visualização das placas ao microscópio óptico comum, com aumento de 400 vezes.

A maioria das culturas laboratoriais de *Archaea* mesófilas foi obtida a partir da inoculação e manutenção das amostras em meios líquidos, o que facilita sobremaneira análises das características fisiológicas destes organismos tais como, tempo de geração, temperatura ótima de crescimento e efeito da adição de diferentes substratos no crescimento da cultura (Könneke *et al.*, 2005; Lehtovirta-Morley *et al.*, 2011; Tournia *et al.*, 2011).

Todavia, os ensaios preliminares de inoculação das amostras em meios líquidos revelaram que as culturas apresentavam crescimento extremamente lento e com pequeno número de células, impossibilitando as análises fisiológicas pretendidas.

A turvação não foi aparente em qualquer momento para os frascos de Eta e Pi, enquanto para o restante das amostras foi observada discreta turvação somente a partir da terceira semana de incubação. O crescimento dessas culturas foi analisado em espectrofotômetro ($\lambda = 600\text{nm}$), com o objetivo de estimar o crescimento das populações em meio líquido, conforme ilustrado na **Figura 8**.



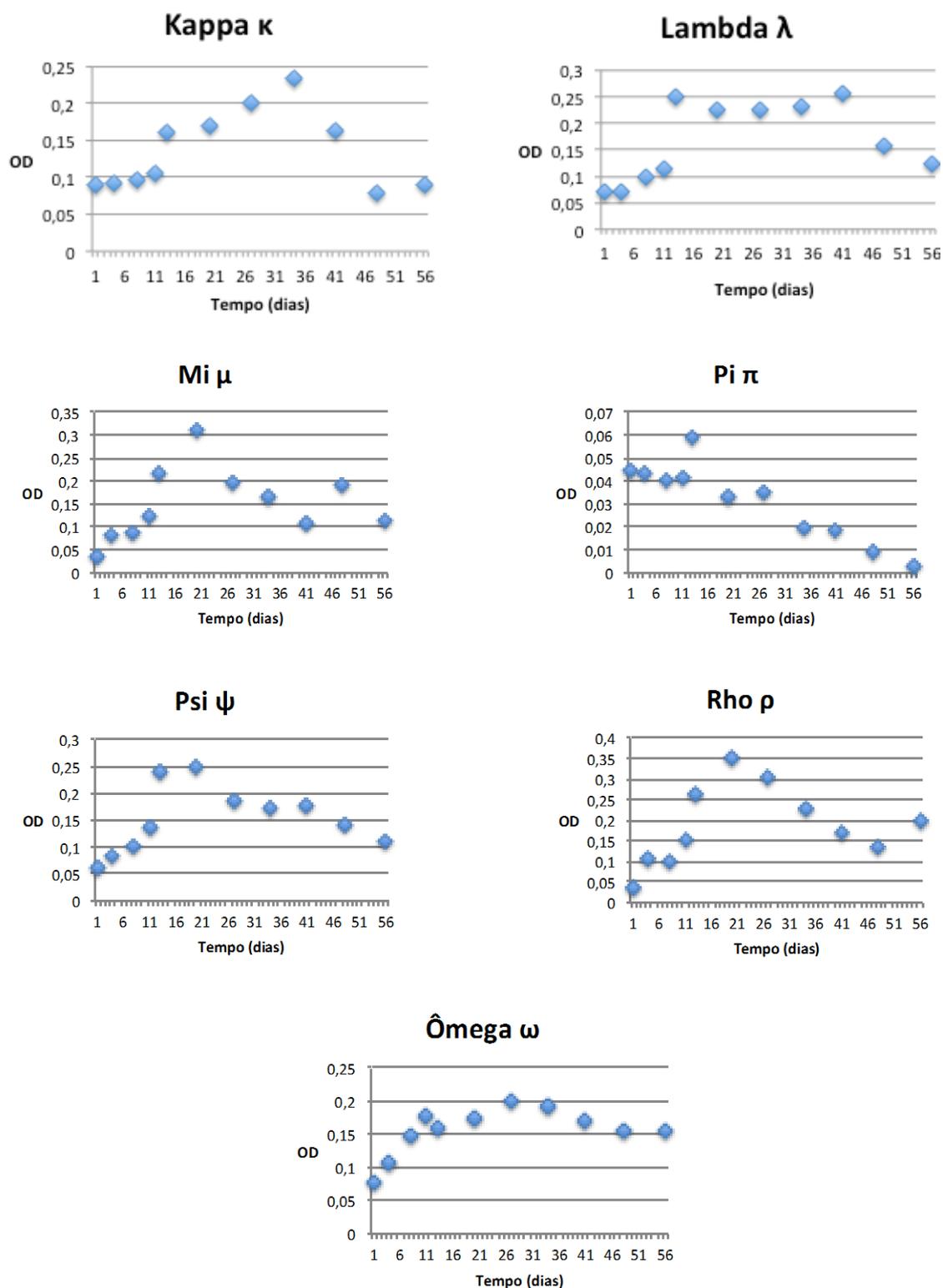


Figura 8. Curvas de crescimento das culturas em meios líquidos.

A análise dos gráficos revela que para nenhuma das amostras foi obtida uma curva de crescimento padrão, uma vez que o crescimento foi

limitado e lento em todas as amostras, não sendo possível a determinação das fases de crescimento das culturas. Apenas a amostra Rho atingiu valor de OD₆₀₀ de 0,35 após 20 dias de incubação. Por outro lado, o crescimento de Eta e Pi não ultrapassou os valores de 0,04 e 0,06, respectivamente. Observa-se também que a maioria das culturas apresentou pico de crescimento no intervalo de 20 a 30 dias de incubação, seguido do decréscimo dos valores de absorvância, exceto no caso das amostras Beta, Eta, Rho e Mi. Tais análises devem ser novamente realizadas, em triplicata, a fim de verificar-se sua reprodutibilidade. Uma possível explicação para o padrão de crescimento observado pode também estar associada à presença de mais de um tipo de organismo nas culturas.

As culturas líquidas foram utilizadas para a produção de estoques das culturas em glicerol (concentração final de 35%), os quais apresentaram baixa viabilidade, de aproximadamente 6 meses.

4.3. Caracterização microscópica das colônias obtidas

4.3.1. Microscopia óptica

Os diferentes tipos coloniais foram analisados por microscopia óptica a partir de esfregaços corados pelo método de Gram.

Todos os tipos coloniais consistiam em pequenas células cocóides Gram negativas, de difícil visualização e distinção (**Figura 9**). Em algumas amostras, foram observadas regiões de coloração mais intensa, sugerindo a presença de matriz extracelular, embora a observação de outros campos permitisse distinguir diferentes camadas celulares, sem a presença de matriz.

A análise de um esfregaço corado, preparado a partir de células de *Bacillus* sp. e da colônia delta revelou a significativa diferença de tamanho entre as amostras utilizadas (**Figura 10**), com as células bacterianas exibindo dimensões consideravelmente maiores e mais intensamente coradas que aquelas da colônia Delta, diminutas e fracamente coradas.

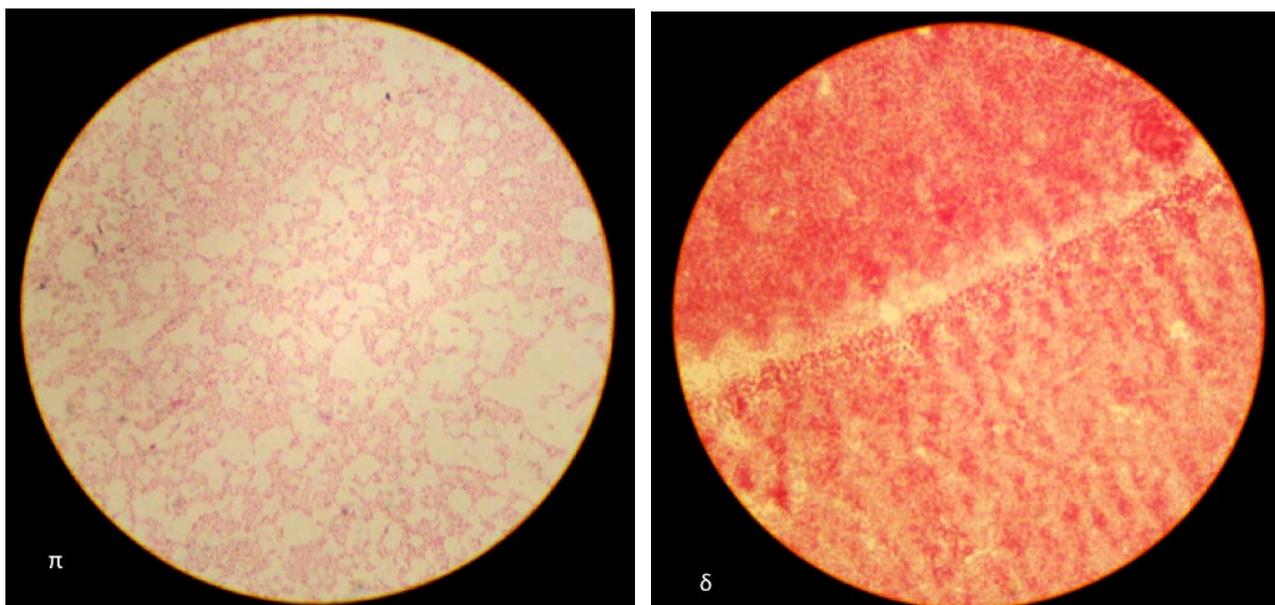


Figura 9. Preparações coradas pelo método de Gram das colônias Pi e Delta, observadas ao microscópio óptico comum. Fotos realizadas com câmera semi-profissional Nikon D50, 6.2 megapixel.

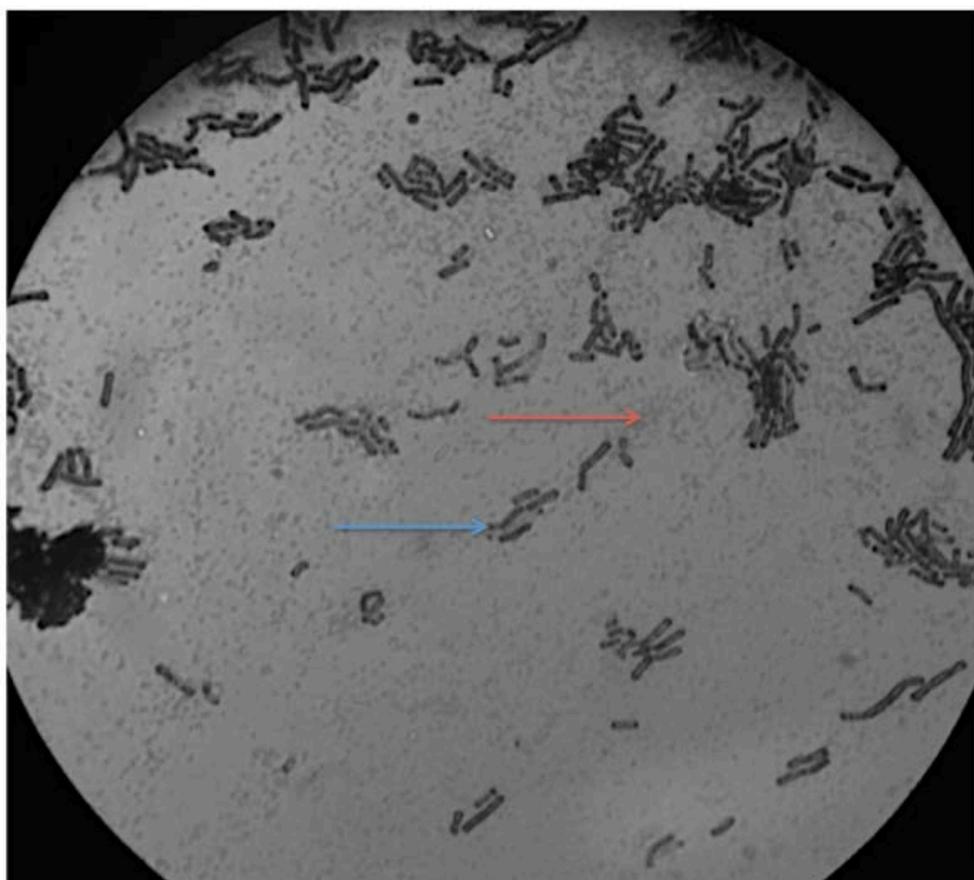


Figura 10. Preparação de células de *Bacillus* sp. e da colônia Delta, analisadas ao microscópio óptico comum. Seta azul: células de *Bacillus* sp.; Seta vermelha: células da colônia Delta. Foto realizada com câmera profissional Canon T1i 18 megapixel.

4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura - MEV

Para a realização dessas análises, foram selecionadas as colônias Alfa, Delta e Psi, com base nos resultados preliminares observados em análises de microscopia e sequenciamento de DNA.

A análise das imagens obtidas confirmaram o tamanho e morfologia das células, quando observadas ao microscópio óptico. Todas as amostras consistiam em células cocóides, ligeiramente alongadas, de tamanho inferior a 1 μm , como ilustrado nas **Figuras 11 a 14**.

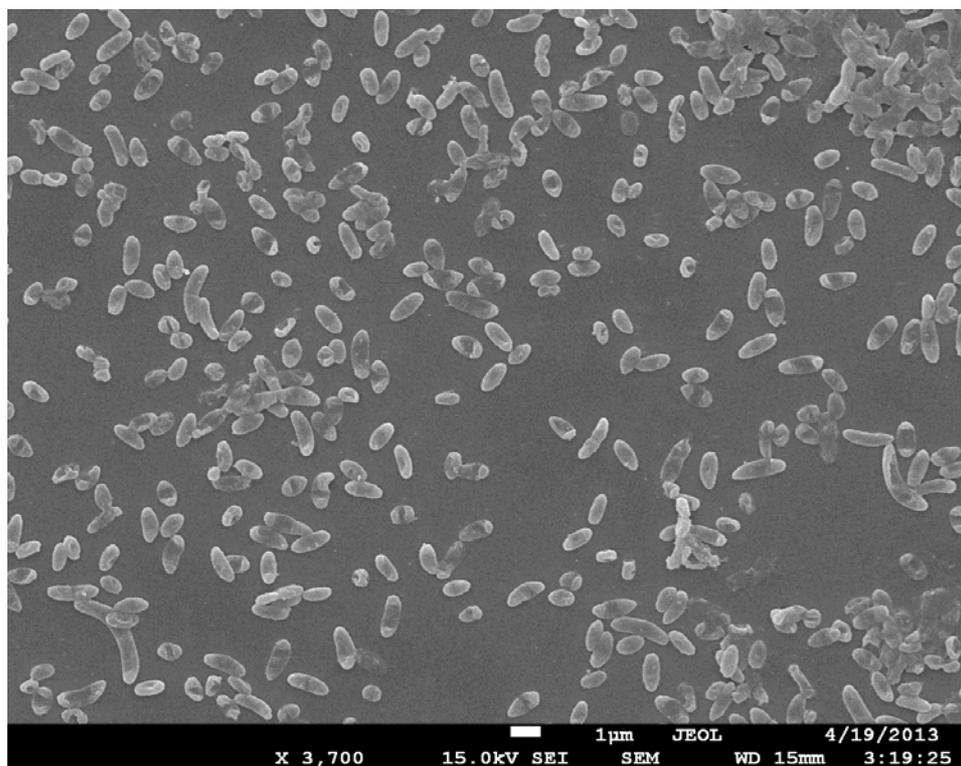


Figura 11. Microscopia Eletrônica de Varredura de células da colônia Alfa.

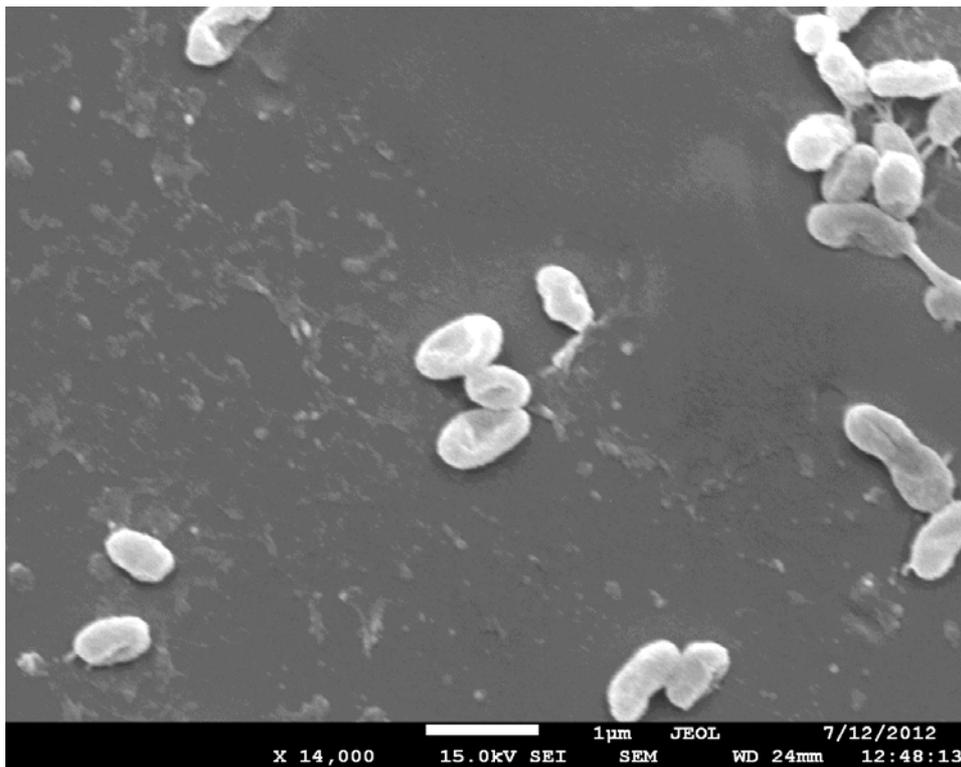


Figura 12. Microscopia Eletrônica de Varredura de células da colônia Delta.

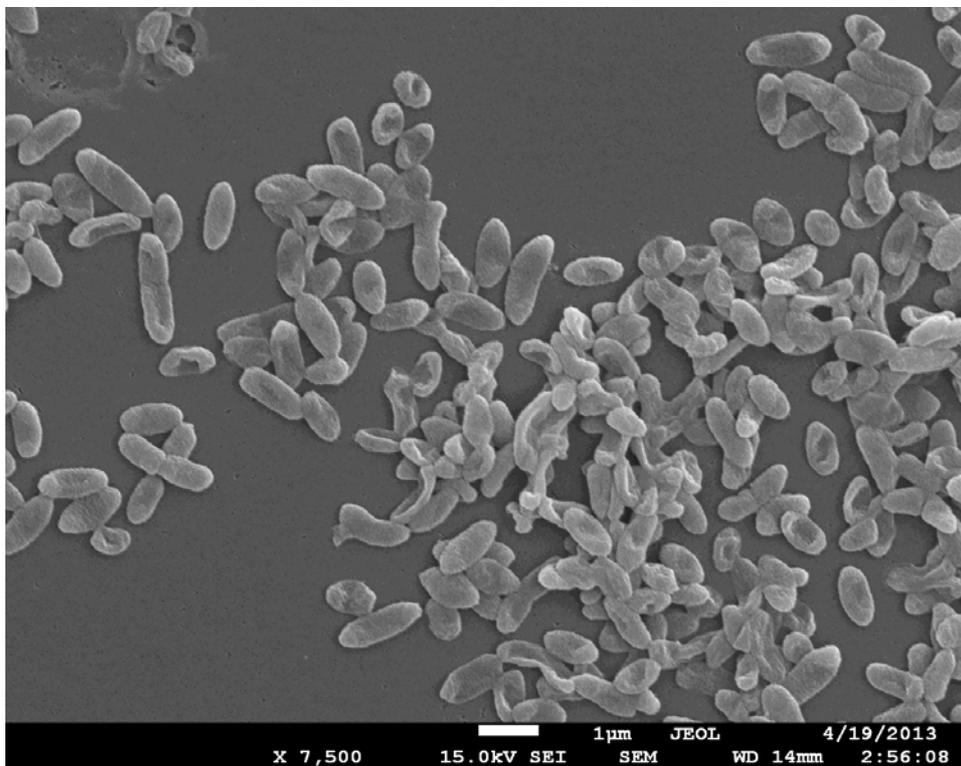


Figura 13. Microscopia Eletrônica de Varredura de células da colônia Psi.

Em um dos campos da amostra Delta foi possível observar a presença de células com características distintas (**Figura 14**). Estas células possuíam morfologia bacilar e tamanho de aproximadamente 3 μm , consideravelmente maior que as observadas nos demais campos, evidenciando a ocorrência de co-cultura.

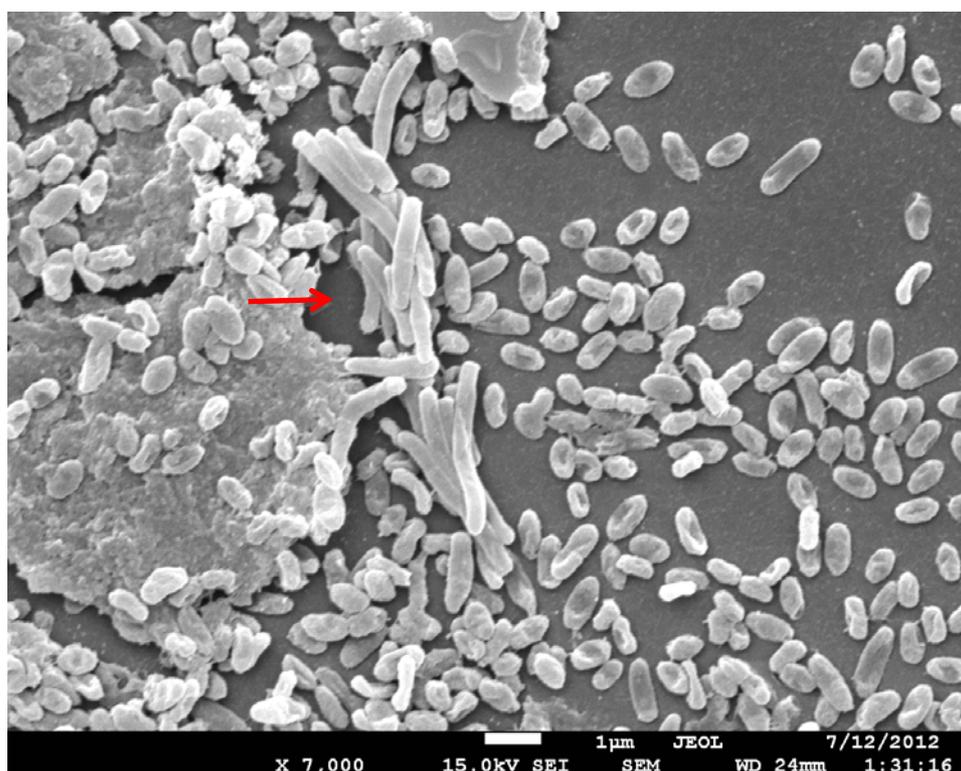


Figura 14. Microscopia Eletrônica de Varredura da amostra Delta. A seta vermelha destaca as células bacilares de maior tamanho.

As células de Delta e Psi ainda revelaram uma característica interessante, que consistia na presença de projeções celulares de aspecto filamentosos, aparentemente promovendo a conexão intercelular ou adesão das células ao substrato (**Figura 15**). Projeções semelhantes, envolvidas na adesão das células ao substrato ou até mesmo em processos de comunicação intercelular foram descritas em *Pyrococcus furiosus* (Näther *et al.*, 2006) e *Methanococcus maripaludis* (Jarrell *et al.*, 2011).

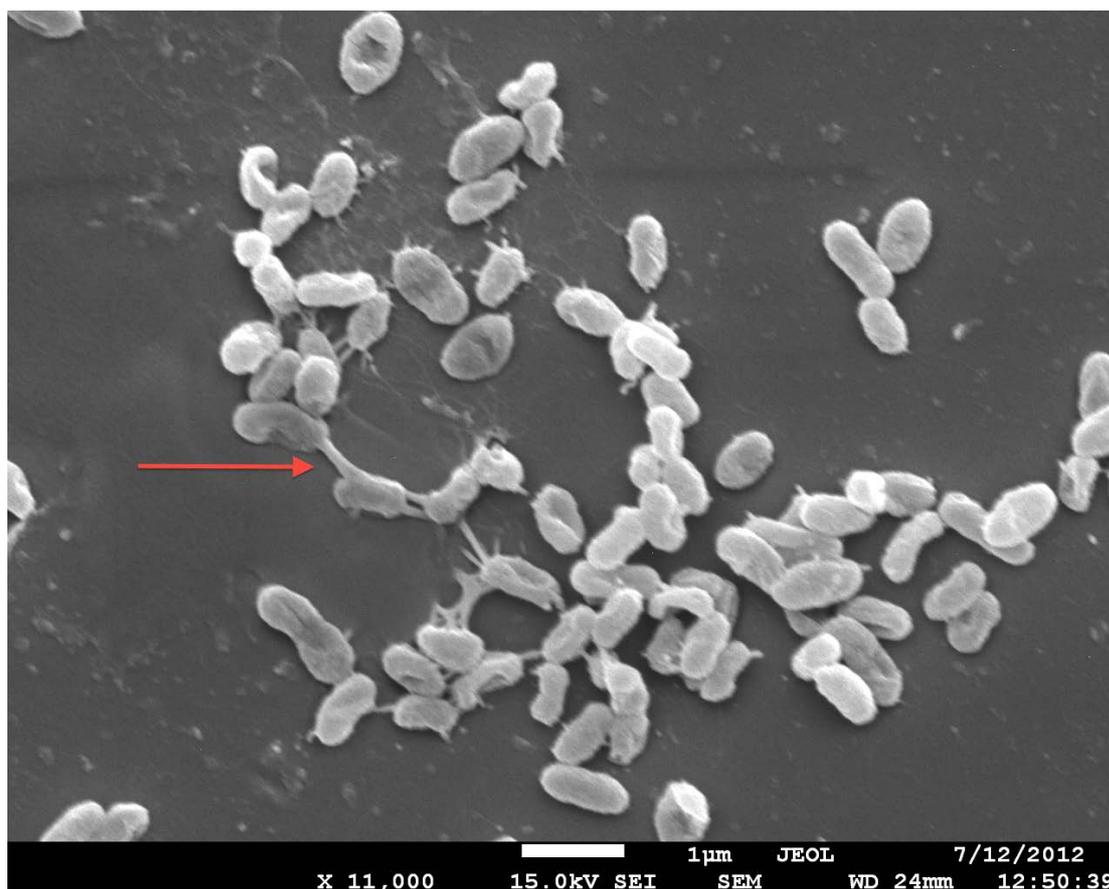


Figura 15. Microscopia Eletrônica de Varredura da amostra Delta. A seta vermelha destaca as conexões intercelulares presentes em algumas das amostras analisadas.

Análises microscópicas destas culturas em momentos posteriores não revelaram a presença dos apêndices na cultura Psi, enquanto em Delta ainda foi possível detectá-las, porém em número consideravelmente menor.

Estudos adicionais são necessários, a fim de se verificar a contínua presença, além da natureza, composição e função de tais projeções celulares.

4.3.3. Microscopia eletrônica de transmissão - MET

O método de contrastação negativa para a microscopia eletrônica de transmissão é recomendado para lisados celulares ou para amostras com espécimes de pequeno tamanho (Baldani *et al.*, 1998). Aliado a isso, a pequena disponibilidade de células cultivadas impossibilitou os protocolos de contrastação positiva, tornando a negativa uma melhor opção para o estudo

das amostras. Nesse caso, a contrastação ocorre quanto os metais pesados utilizados, como acetato de uranila, vapor de ósmio, ouro ou ácido fosfotungístico (PTA), são depositados sobre a amostra.

As amostras utilizadas nesses experimentos foram escolhidas segundo resultados preliminares de sequenciamento de DNA e também como complementação das análises de MEV, no caso da amostra Delta. No período de realização das análises por MET, havia sido obtido o sequenciamento da amostra Pi, que sugeria ser esta amostra um bom candidato para análises posteriores, apesar de seu difícil manuseio.

Na amostra Delta (**Figura 16**), foram observadas células de tamanho e forma similares aos observados na microscopia eletrônica de varredura. Em áreas internas das células foram detectados campos de menor eletrodensidade, enquanto nas áreas periféricas, foi possível observar-se regiões mais eletrondensas. Os cristais ao redor das células correspondem à precipitação de cristais de tetróxido de ósmio.

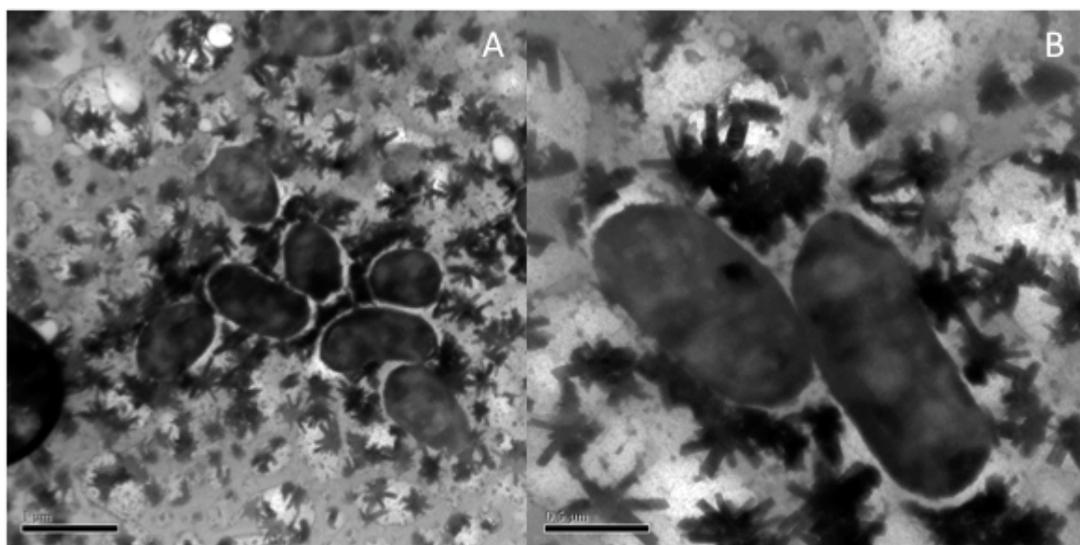


Figura 16. Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra Delta, contrastada com tetróxido de ósmio. Campo (A) com aumento de 25000x, e (B) de 50000x.

O acetato de uranila é comumente utilizado em protocolos de preparação de amostra para microscopia eletrônica pela sua capacidade de interação com lipídeos e proteínas, permitindo a fixação do material biológico

e, ao mesmo tempo a contrastação da amostra, por tratar-se de um metal pesado (Pandithage, 2013). A amostra Pi revelou a presença de células arredondadas, com a parte central menos eletrodensa envolta por um halo de maior eletrodensidade. Embora o tempo de secagem das amostras tenha sido de aproximadamente 24 horas, recomendado para contrastações negativas com acetato de uranila, quando a amostra foi submetida ao feixe de elétrons do microscópio, regiões menos eletrodensas das células foram rompidas pelos feixes, indicando a presença de água na amostra (**Figura 17**).

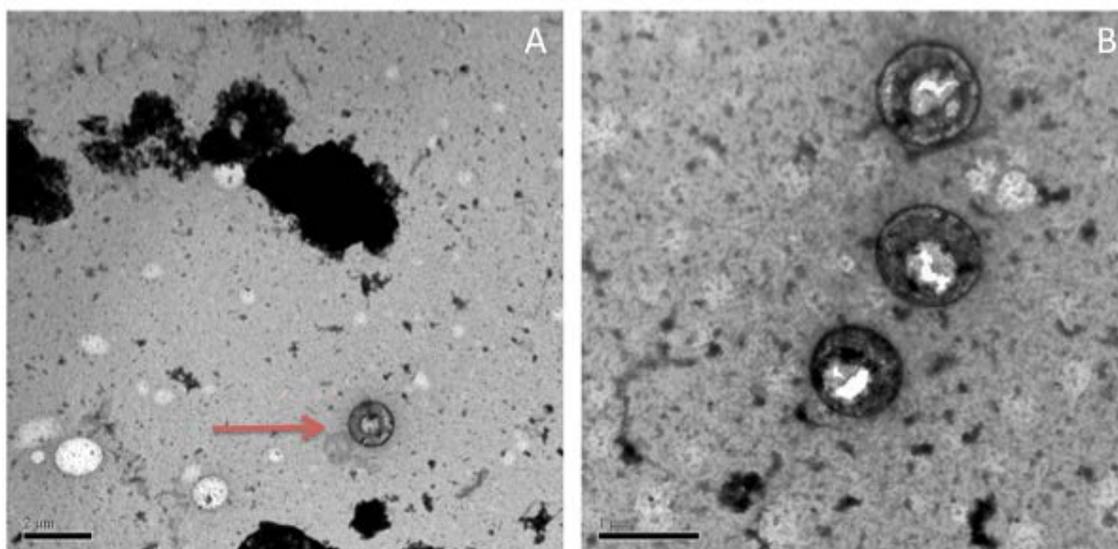


Figura 17. Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra Pi, contrastada com acetato de uranila. Campo (A) com aumento de 8000x, e (B) de 25000x. A seta vermelha indica a célula de Pi.

4.3.4. Microscopia de força atômica - MFA

A escolha das amostras seguiu os mesmos critérios anteriormente utilizados, com base no aspecto macroscópico das colônias e sequenciamento de DNA. Por esta razão, novamente as amostras Delta e Pi foram selecionadas para tal análise, mas apenas a amostra Pi resultou em imagens de qualidade.

As análises realizadas por MFA da amostra Pi confirmaram as características anteriormente verificadas, revelando células de tamanho diminuto e morfologia cocóide. Foi também possível verificar que as células

apresentavam superfície relativamente lisa e homogênea, como ilustrado na **Figura 18**.

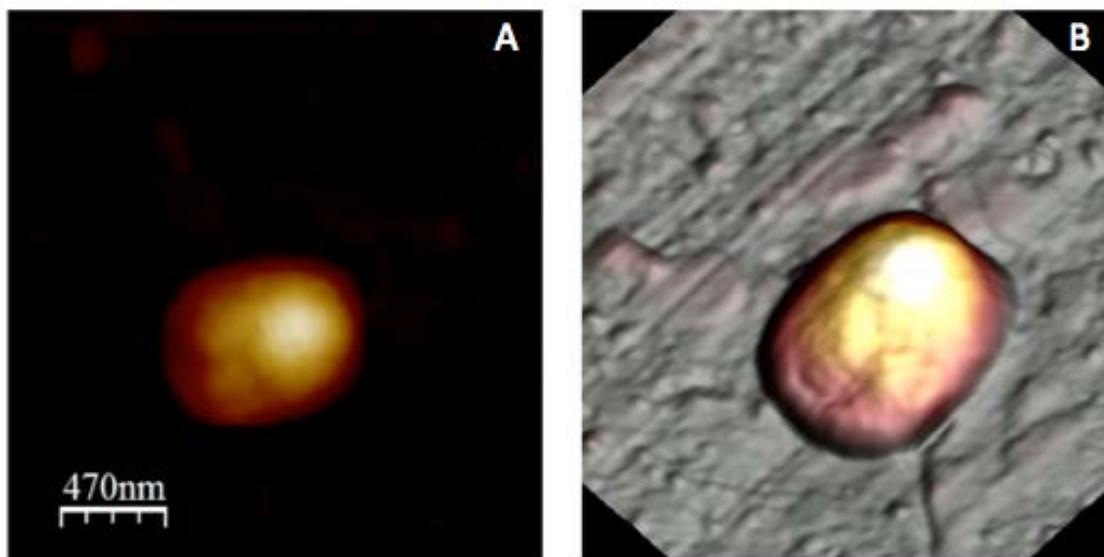


Figura 18. Microscopia de Força Atômica da amostra Pi. O campo (A) consiste em uma imagem bidimensional, enquanto o campo (B) corresponde a uma imagem tridimensional.

4.4. Filogenia Molecular das colônias obtidas

4.4.1. Extração de DNA

A extração de DNA das colônias, realizada por meio do kit *Wizard® SV 96 GENOMIC DNA Purification System* (Promega™), apresentou eficiência variável para as diferentes amostras. Quando avaliadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (**Figura 19**), foi possível observar fragmentos de alta massa molecular, com pequeno grau de degradação, em todas as amostras. No entanto, a extração mostrou-se menos eficiente para algumas amostras, como Alfa, Beta, Delta, Eta e Pi.



Figura 19. Perfil eletroforético do DNA extraído das diferentes colônias. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (LM = *Low Mass DNA Ladder*, Invitrogen).

A concentração de DNA dessas amostras foi determinada em espectrofotômetro Nanovue, que revelou razões variáveis entre as concentrações ácidos nucleicos e proteínas obtidos na extração, indicando a presença de contaminantes, provavelmente de natureza protéica, em algumas destas (**Tabela 11**).

Tabela 11. Concentração de DNA extraído das colônias

Amostra	Alfa	Beta	Delta	Eta	Kappa	Lambda
Conc. de DNA (ng/μL)	1,6	1	1,7	1	4,7	5,2
Razão 260/280	0,244	0,05	2,048	2,167	0,0823	0,705

Amostra	Mi	Pi	Rho	Psi	Omega
Conc. de DNA (ng/μL)	10,9	2	4,7	4,2	6,8
Razão 260/280	2,439	0,537	1,175	0,987	1,184

Em virtude da diversidade de paredes celulares presentes no Domínio *Archaea*, não há consenso em relação ao método mais eficiente de extração de DNA para estes organismos. Por esta razão, os protocolos podem empregar procedimentos à base de agentes químicos, tais como álcool,

clorofórmio e fenol para membros da família Halobacteriaceae (Yildiz *et al*, 2012; Jung *et al*, 2014); procedimentos realizados com agentes químicos e físicos (“beads”), como para *Nitrosotalea devanaterria* (Lehtovirta-Morley *et al*, 2011); centrifugação em gradiente de cloreto de cério para *Picrophilus oshimae* (Schleper, 1995) e extrações realizadas com variados kits, como de extração de DNA de plasma sanguíneo (French *et al*, 2012). Embora o kit Wizard® SV 96 GENOMIC DNA Purification System (Promega™) tenha sido desenvolvido para extração de DNA de células eucarióticas, especialmente de tecidos animais, relatos de colaboradores indicavam sucesso na obtenção de DNA bacteriano e, por esta razão, foi adotado como protocolo padrão de extração de DNA neste trabalho. Contudo, outros protocolos deverão ser avaliados, visando a obtenção de DNAs com maior grau de pureza.

4.4.2. PCR dirigidas aos genes de rRNA 16S de Archaea e Bacteria e *amoA*

Com o objetivo de caracterizar filogeneticamente amostras de plâncton de ambientes costeiros, DeLong utilizou, em 1992, o par de iniciadores Arch21f – Arch958r, que amplifica uma região do gene de rRNA 16S de representantes do Domínio *Archaea*. A partir de então, este par passou a ser amplamente utilizado a partir de amostras dos mais variados ambientes, desde gelo da Antártica (Cowie *et al*, 2011) até canais poluídos no Egito (Elsaied, 2014). Além disso, trabalhos realizados por nosso grupo utilizaram com sucesso esse par de iniciadores em estudos de caracterização filogenética de amostras de solo (Catão *et al*, 2013) e de sedimentos lacustres do Cerrado (Rodrigues *et al.*, 2014).

Todavia, o emprego do par 21f – 958r nos ensaios de PCR com DNA extraído das colônias não resultou na amplificação visível de fragmentos de DNA. Por esta razão, um protocolo de *Nested PCR* foi empregado, utilizando-se na primeira amplificação os iniciadores 21f – 958r e, em seguida, os iniciadores 519f – 915r (Vissers *et al*, 2009). Tal procedimento, gerou fragmentos de DNA do tamanho esperado, de aproximadamente 400 pares de bases, em todas as amostras (**Figura 20**).

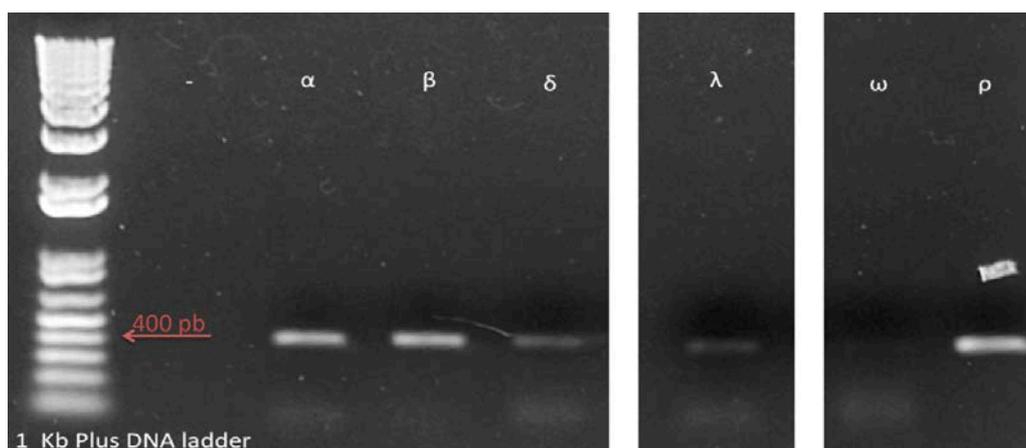


Figura 20. Perfis eletroforéticos de alguns dos amplicons gerados nos ensaios de PCR dirigidos ao gene de rRNA 16S das colônias. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Marcador de massa molecular *1kb plus ladder* (Invitrogen).

O DNA extraído das colônias também foi submetido a ensaios de PCR com os iniciadores 27f – 1492r, específicos o gene de rRNA 16S de *Bacteria*. A análise dos produtos gerados revelou a presença de fragmentos de DNA do tamanho esperado (aproximadamente 1400pb) em todas as amostras.

Os ensaios de PCR dirigidos ao gene *amoA* resultaram na amplificação de fragmentos de DNA de cerca de 635 pares de bases a partir das amostras Eta, Kappa, Lambda, Mi, Pi e Ômega, como ilustrado na **Figura 21**.

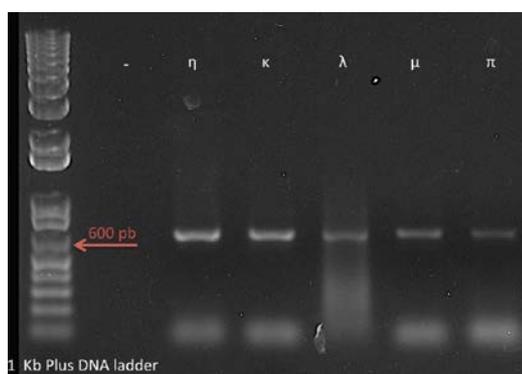


Figura 21. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, com os amplicons gerados nos ensaios de PCR dirigidos ao gene *amoA*. Marcador de massa molecular: *1kb plus ladder* (Invitrogen).

4.4.3. Análises de Bioinformática

Os fragmentos de PCR amplificados nos ensaios dirigidos aos genes de rRNA 16S de *Archaea* e *Bacteria* e *amoA* foram purificados e enviados diretamente ao sequenciamento de DNA, sem qualquer etapa de clonagem prévia.

4.4.4. Análise de qualidade das sequências de DNA

As sequências de DNA relativas aos genes de rRNA 16S de *Archaea* e *Bacteria*, bem como aquelas referentes ao gene *amoA* foram consideradas válidas quando apresentavam valores de PHRED maior que 20 em 250 nucleotídeos. Como a sequência relativa ao gene de rRNA 16S de *Archaea* da colônia Beta não apresentou tal qualidade, foi descartada das análises subsequentes, restando assim 10 tipos coloniais, que foram submetidos às demais análises filogenéticas.

4.4.5. Classificação taxonômica preliminar das colônias, segundo o Ribossomal Database Project (RDP)

As sequências de DNA relativas ao genes de rRNA 16S de *Archaea* obtidas dos 10 tipos coloniais foram analisadas pela ferramenta *Classifier* e apresentaram identidade com o Domínio *Archaea*, com limite de confiança de 90% (**Tabela 12**).

Tabela 12. Valores de confiança obtidos nos alinhamentos das sequências do gene de rRNA 16S de *Archaea*, com a ferramenta *Classifier*.

Alfa: <i>Archaea</i> 100%
Delta: <i>Archaea</i> 99%
Eta: <i>Archaea</i> 100% - Thaumarchaeota 95% - Nitrosopumilales 91% - Nitrosopumilaceaea 91% - <i>Nitrosopumilus</i> 91%
Kappa: <i>Archaea</i> 98% - Thaumarchaeota 90%
Lambda: <i>Archaea</i> 99% - Thaumarchaeota 90% - Nitrososphaerales 90% - Nitrososphaeraceae 90% - <i>Nitrososphaera</i> 90%
Mi: <i>Archaea</i> 100% - Thaumarchaeota 100% - Nitrosopumilales 99% - Nitrosopumilaceae 99% - <i>Nitrosopumilus</i> 99%
Pi: <i>Archaea</i> 100% - Thaumarchaeota 100% - Nitrososphaerales 100% - Nitrososphaeraceae 100% - <i>Nitrososphaera</i> 100%
Psi: <i>Archaea</i> 100%
Rho: <i>Archaea</i> 100% - Crenarchaeota 95% - Thermoprotei 95%
Ômega: <i>Archaea</i> 100% - Thaumarchaeota 100% - Nitrosopumilales 98% - Nitrosopumilaceae 98% - <i>Nitrosopumilus</i> 98%

A colônia Rho foi classificada no filo Crenarchaeota; Eta, Kappa, Lambda, Mi, Pi e Ômega no filo Thaumarchaeota, enquanto Alfa, Delta e Psi foram definidas como *Archaea* não classificadas.

Dentre as seis sequências (Eta, Kappa, Lambda, Mi, Pi e Ômega) que apresentaram identidade com o filo Thaumarchaeota, cinco foram classificadas até o nível de gênero. As amostras Eta, Mi e Ômega foram classificadas como pertencentes ao gênero *Nitrosopumilus*, enquanto Lambda e Pi como *Nitrososphaera*. Como estes dois gêneros consistem em AOAs, os resultados sugerem que a escolha de amostras contendo componentes do sistema de filtração do aquário seja adequada para o cultivo deste tipo de organismos. Este resultado é também condizente com estudos que descrevem a ocorrência de AOAs em aquários de água doce (Hurakawa *et al.*, 2008; Sauder *et al.*, 2011).

A amostra Rho foi classificada como pertencente à classe Thermoprotei, do filo Crenarchaeota. Um ponto a ser considerado a respeito da ferramenta *Classifier* consiste na recente inclusão do filo Thaumarchaeota em suas análises de alinhamento. Archaeas mesófilas eram anteriormente divididas em três grupos, denominados I, II e III, sendo o grupo I associado ao filo Crenarchaeota e os grupos II e III associados ao filo Euryarchaeota (DeLong *et al.*, 1996). O filo Thaumarchaeota foi incluído no banco de dados do RDP apenas recentemente, onde o grupo I seria dividido em sub-grupos 1.1a, que engloba isolados de ambientes predominantemente aquáticos; 1.1b, isolados predominantemente de solos e 1.1c, isolados principalmente de solos ácidos. Uma possível explicação para a classificação de Rho no filo Crenarchaeota poderia ser devido ao número ainda pequeno (cerca de 4000 – em abril de 2015) de sequências de genes de rRNA 16S de Thaumarchaeota depositadas neste banco de dados.

Paralelamente, as sequências relativas ao gene de rRNA 16S de *Bacteria*, obtidas a partir dos 10 tipos coloniais foram submetidas ao mesmo tipo de análise, utilizando-se os mesmos critérios descritos anteriormente (**Tabela 13**).

Tabela 13. Valores de confiança obtidos nos alinhamentos das sequências do gene de rRNA 16S de *Bacteria*, com a ferramenta *Classifier*.

Alfa:	<i>Bacteria</i> 100% - Proteobacteria 100% - Betaproteobacteria 100% - Burkholderiales 100% - Burkholderiaceae 100% - <i>Pandoraea</i> 100%
Delta:	<i>Bacteria</i> 100% - Proteobacteria 100% - Betaproteobacteria 100% - Burkholderiales 100% - Burkholderiaceae 100% - <i>Pandoraea</i> 100%
Eta:	<i>Bacteria</i> 100% - Proteobacteria 100% - Betaproteobacteria 100% - Burkholderiales 100% - Burkholderiaceae 100% - <i>Cupriavidus</i> 100%
Kappa:	<i>Bacteria</i> 100% - Proteobacteria 100% - Betaproteobacteria 100% - Burkholderiales 100% - Burkholderiaceae 100% - <i>Pandoraea</i> 100%
Lambda:	<i>Bacteria</i> 100% - Proteobacteria 100% - Betaproteobacteria 100% - Burkholderiales 100% - Burkholderiaceae 100% - <i>Pandoraea</i> 100%
Mi:	<i>Bacteria</i> 100% - Proteobacteria 100% - Betaproteobacteria 100% - Burkholderiales 100% - Burkholderiaceae 100% - <i>Cupriavidus</i> 100%
Pi:	<i>Bacteria</i> 100% - Proteobacteria 100% - Betaproteobacteria 100% - Burkholderiales 100% - Burkholderiaceae 100% - <i>Pandoraea</i> 100%
Psi:	<i>Bacteria</i> 100% - Proteobacteria 100% - Betaproteobacteria 100% - Burkholderiales 100% - Burkholderiaceae 100% - <i>Pandoraea</i> 100%
Rho:	<i>Bacteria</i> 100% - Proteobacteria 100% - Betaproteobacteria 100% - Burkholderiales 100% - Burkholderiaceae 100% - <i>Pandoraea</i> 100%
Ômega:	<i>Bacteria</i> 100% - Proteobacteria 100% - Betaproteobacteria 100% - Burkholderiales 100% - Burkholderiaceae 100% - <i>Pandoraea</i> 100%

Em todas as amostras foi possível atingir a classificação em nível de gênero, com oito sequências (das colônias Alfa, Delta, Kappa, Lambda, Pi, Psi, Rho e Ômega), caracterizadas como *Pandoraea* e duas (de Eta e Mi) como *Cupriavidus*, confirmando assim a ocorrência de co-cultivos em todas as colônias selecionadas.

O gênero *Pandorea*, é composto por bactérias Gram negativas móveis, com flagelação polar, redutoras de nitrito e nitrato, primeiramente descrito em 2000 (Coenye *et al.*, 2000). Este gênero foi proposto a partir de estudos taxonômicos polifásicos de isolados anteriormente identificados como pertencentes ao complexo *Burkholderia cepacia*, a partir de culturas de amostras de escarro de pacientes de fibrose cística (FC), solo e água. Desde a sua descrição, estes organismos são associados a casos de multirresistência a drogas, principalmente em casos clínicos de FC (Jørgensen, *et al.*, 2003; Martínez-Lamas *et al.*, 2011; Kokcha *et al.*, 2013). O gênero *Cupriavidus* é composto por bactérias Gram negativas móveis, fixadoras de nitrogênio atmosférico, redutoras de nitrato, encontradas em solos e ambientes aquáticos (Balachandar *et al.*, 2007; Coelho *et al.*, 2007;

Mou, 2013), e que também se caracterizam por apresentar multirresistência a agentes antimicrobianos (Karafin *et al.*, 2010; Lehtovirta-Morley *et al.*, 2011; Florentino *et al.*, 2012).

A propriedade de multirresistência destes dois gêneros poderia explicar a impossibilidade de obtenção de culturas puras de Archaea neste trabalho. Tal resultado confirma a dificuldade na obtenção de culturas puras de archaeas não extremas de ambientes mesófilos, uma vez que a grande maioria dos trabalhos nesta área relata a obtenção de co-cultivos (De la Torre *et al.*, 2005; Hatzenpichler *et al.*, 2008; Blainey *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2011; Lebedeva *et al.*, 2013).

No caso do cultivo de *Nitrosocaldus yellowstonii*, mesmo com uso de antibióticos e citometria de fluxo, os isolados ainda encontravam-se associados em co-cultura a mais de quatro diferentes bactérias termófilas (De la Torre *et al.*, 2008). No caso de *Nitrosoarchaeum koreensis*, foi utilizada uma extensa gama de antimicrobianos, sem sucesso (Jung *et al.*, 2011). Assim, a presença de bactérias reconhecidamente multirresistentes (*Burkholderia sp.*, *Cupriavidus sp.*, e *Pseudomonas*) representa ainda um desafio à obtenção de culturas puras de Archaea.

4.4.6. Construção da Árvore Filogenética das culturas de Archaea, com base no gene de rRNA 16S

A árvore filogenética foi construída a partir do alinhamento de sequências do gene de rRNA 16S que, após as edições necessárias, apresentavam 250 nucleotídeos, sendo o resultado apresentado na **Figura 22**.

Uma vez que análises prévias demonstraram que as culturas Mi e Ômega correspondiam a um mesmo organismo, a amostra Ômega foi omitida nesta análise, sendo utilizada apenas a cultura Mi.

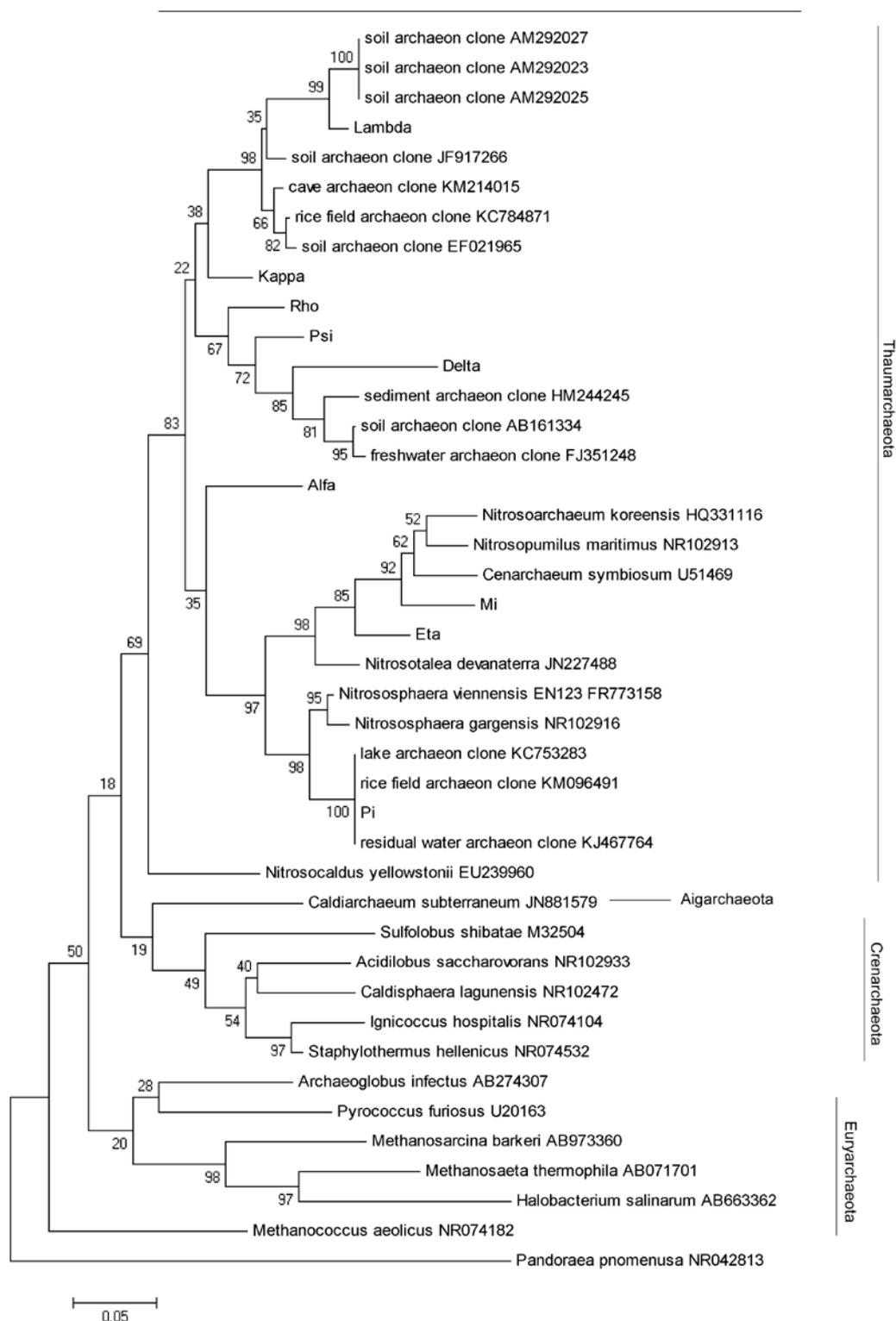


Figura 22. Árvore filogenética das sequências do gene de rRNA 16S a partir das culturas obtidas. A construção utilizou o método de Neighbor Joining e modelo de Jukes-Cantor. A sua robustez foi verificada com bootstrap de 1000 réplicas. A escala indica a distância de similaridade entre os ramos. A bactéria *Pandoraaea pnomenusa* foi utilizada como grupo externo. A escala indica a distância de similaridade entre os ramos.

As colônias Eta e Mi/Ômega agruparam-se próximas a os gêneros *Nitrosopumilus*, *Nitrosoarchaeum* e *Cenarchaeum*, classificadas como Thaumarchaeota do grupo I.1a.

Outro agrupamento foi formado pela amostra Pi e sequências de archaeas não cultivadas de como plantações de arroz (KM096491), águas residuais de áreas construídas (KJ467764) e amostras de lagos de água doce (KC753283). Esta amostra posiciona-se paralelamente ao clado contendo duas espécies de *Nitrososphaera*, que são Thaumarchaeotas do grupo I.1b. Os gêneros *Nitrosopumilus* e *Nitrososphaera* consistem em AOAs e os altos valores de *bootstrap* dos agrupamentos contendo as colônias Eta, Mi/Ômega e Pi corroboram a possível ocorrência de metabolismo de nitrogênio nestas amostras, uma vez que todas foram positivas para o gene *amoA*.

O baixo valor de *bootstrap* não permite qualquer inferência sobre o posicionamento da colônia Alfa, enquanto Rho, Delta e Psi foram agrupadas próximas a sequências de thaumarchaeotas não cultivadas de água (FJ351248), sedimento (HM244245) e solo (AB161334).

As colônias Kappa, e Lambda formaram um grande clado composto apenas por sequências de Thaumarchaeota não cultivadas. Com altos valores de *bootstrap*, Lambda apresenta forte afiliação com sequências isoladas de solos (EF021965 – AM292027/25/23), enquanto Kappa, com valores mais baixos, afilia-se a amostras de plantações de arroz (KC784871), solo (JF917266) e ecossistemas cavernícolas (KM214015).

Vale ressaltar, no entanto, que as colônias Kappa e Lambda também geraram amplicons nos ensaios de PCR dirigidos ao gene *amoA*, cuja identidade foi confirmada após o sequenciamento desses fragmentos.

A distribuição das diferentes colônias em clados que contém organismos mesófilos pertencentes ao filo Thaumarchaeota é esperada, dadas as características não extremófilas do aquário e pelas condições de cultivo utilizadas, com meios de cultura em pH neutro e temperatura a 28°C.

4.4.7. Filogenia dos tipos coloniais, com base no gene *amoA*

Como mencionado anteriormente, seis tipos coloniais (Eta, Mi/Ômega, Pi, Kappa e Lambda) geraram amplicons de tamanho esperado

nos ensaios de PCR dirigidos ao gene *amoA*, cuja identidade foi confirmada após o sequenciamento de DNA, que revelou identidade de cerca de 99% com archaeas não cultivadas. No entanto, quando estas sequências foram alinhadas entre si revelaram ser idênticas.

Tal resultado está totalmente em desacordo com aquele da árvore filogenética baseada no gene de rRNA 16S, uma vez que o gene *amoA* vem sendo utilizado como um marcador filogenético confiável e com grande poder de resolução para *Archaea* (Pester *et al.*, 2012).

Quando uma análise preliminar foi realizada com o gene *amoA* obtido a partir dos tipos coloniais positivos, os resultados indicaram que possivelmente se trate de uma nova espécie de *Archaea*, uma vez que a sequência não agrupou-se a qualquer das AOA já cultivadas.

Considerando-se que todas as sequências de DNA utilizadas nas análises referentes ao genes de rRNA 16S e *amoA* apresentavam qualidade satisfatória, uma possível explicação para tal resultado poderia ser (excetuando-se qualquer possível erro quando do envio das amostras para o sequenciamento) o tamanho e região amplificada pelos iniciadores dirigidos ao gene de rRNA 16S.

Os iniciadores 519f - 915r geram um fragmento de DNA de aproximadamente 400 pares de bases, que contém duas regiões hipervariáveis (V2 e V3) e uma região conservada do gene de rRNA 16S. Estes iniciadores apresentam baixo poder de resolução, uma vez que sua utilização por nosso grupo em trabalhos anteriores, sem utilizar a técnica de *Nested* PCR, resultou na amplificação de um número expressivo de sequências de DNA bacterianas.

Assim, novos ensaios de PCR dirigidos ao gene de rRNA 16S de *Archaea* deverão ser realizados, empregando-se iniciadores com maior poder de resolução, a fim de permitir que inferências filogenéticas mais robustas sejam realizadas.

4.5. Filogenia Molecular da Amostra do Aquário

4.5.1. Extração de DNA

A extração de DNA total da amostra apresentou baixa eficiência, confirmada pelo perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo (10 mg/ml) (**Figura 23**). No entanto, a moastra obtida apresentava pequeno grau de degradação, característica favorável aos ensaios subsequentes de PCR.

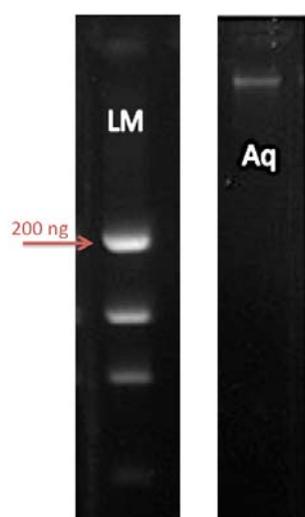


Figura 23. Perfil eletroforético da extração de DNA da amostra do aquário. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (LM = *Low Mass DNA Ladder*, Invitrogen).

A baixa eficiência da extração foi confirmada pelas leituras realizadas em espectrofotômetro Nanovue® (**Tabela 14**).

Tabela 14. Concentração da amostra de DNA total do aquário

Amostra	Aquário
Conc de DNA (ng/μL)	9,3
Razão 260/280*	1,269

4.5.2. PCR dirigida ao gene de rRNA 16S

O DNA extraído foi submetido ao mesmo protocolo de *Nested* PCR descrito para o DNA extraído das colônias e gerou fragmentos do tamanho esperado em todas as amostras (**Figura 24**).

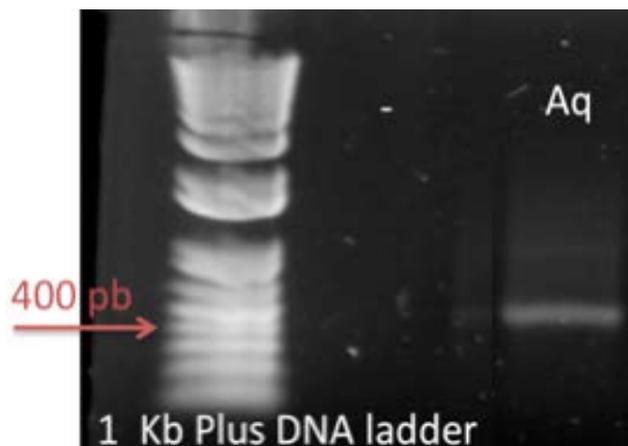


Figura 24. Perfil eletroforético do fragmento gerado no ensaio de PCR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Marcador de massa molecular *1kb plus ladder* (Invitrogen).

4.5.3. Transformação de células de Escherichia coli DH5 α e seleção de clones recombinantes

Os fragmentos de aproximadamente 400 pb amplificados foram ligados ao vetor pGEM-T Easy e utilizados na transformação de células de *E. coli* DH5 α por meio da técnica de choque térmico.

Foram selecionados 96 clones recombinantes, os quais foram cultivados em meios líquidos e posteriormente estocados a -20°C, em glicerol na concentração final de 35%.

4.5.4. Extração de DNA plasmidial por lise alcalina dos clones recombinantes

Os clones recombinantes tiveram o seu DNA plasmidial extraído para posterior sequenciamento. O perfil eletroforético das amostras revelou excelente eficiência na extração destes DNAs plasmidiais, conforme ilustrado para alguns clones, na **Figura 25**.

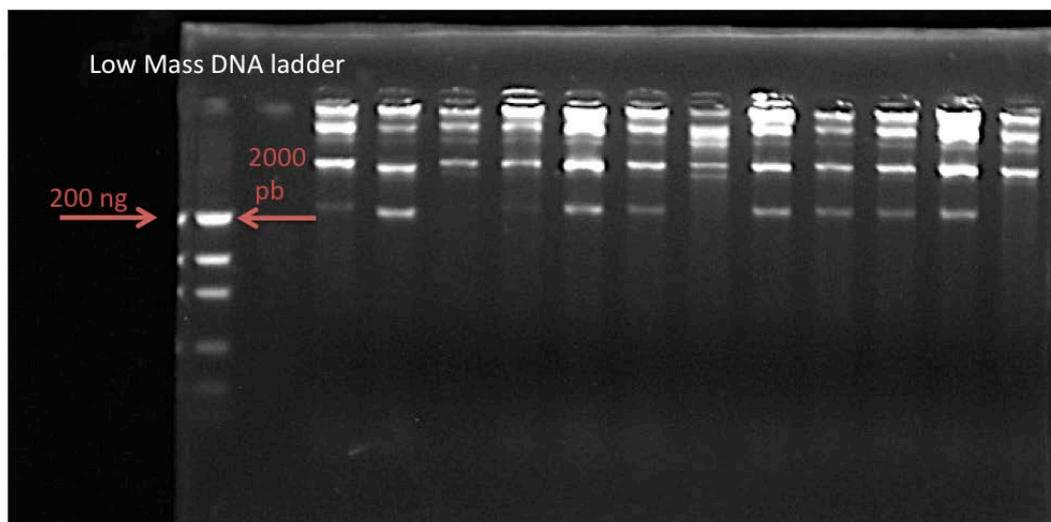


Figura 25. Perfil eletroforético do DNA plasmidial extraído de clones recombinantes aleatórios da biblioteca do gene de rRNA 16S. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (*Low Mass DNA Ladder*: Invitrogen).

4.5.5. Análises de Bioinformática

Os 96 clones recombinantes foram enviados ao sequenciamento automático de DNA e destes, foram selecionadas 74 sequências que apresentavam valor de PHRED maior que 20, em 250 nucleotídeos.

4.5.6. Classificação taxonômica preliminar da biblioteca genômica, segundo o Ribossomal Database Project (RDP)

As 74 sequências geradas a partir da biblioteca de clones do aquário foram também analisadas com a ferramenta *Classifier* do banco de dados do RDP, com limite de confiança de 90%. Foram obtidas 71 (98,6%) sequências classificadas como pertencentes ao Domínio *Archaea*, sendo 70 destas (97,2%) classificadas como Thaumarchaeota e uma como *Archaea* não classificada. Dentre os representantes do filo Thaumarchaeota, seis clones (8,4%) foram classificados no gênero *Nitrososphaera*. As 64 amostras restantes (89,6%) permaneceram como Thaumarchaeota não classificadas.

Estes resultados estão em desacordo com dados de diversidade obtidos em trabalhos envolvendo a análise de comunidades de aquários de água doce e salobra. Bagchi e colaboradores descreveram a comunidade de

sete aquários, revelando afiliações filogenéticas com diversos gêneros nitrificantes, entre eles *Nitrosopumilus*, *Nitrosoarchaeum* e *Nitrososphaera* (Bagchi *et al.*, 2014).

Considerados os vieses intrínsecos à metodologia de PCR e o fato da amostra que deu origem à biblioteca genômica ter sido distinta daquela utilizada como inóculo para obtenção das culturas, poderíamos especular que estas amostras refletiam microhabitats distintos, cujas composições eram qualitativa e quantitativamente distintas.

4.5.7. Análise de α -diversidade da comunidade do aquário

As 71 sequências classificadas como *Archaea* foram utilizadas para análise de α -diversidade do aquário, com o objetivo de estabelecer uma correlação entre os microrganismos cultivados e a diversidade encontrada no aquário. O conceito de diversidade refere-se à riqueza e uniformidade das espécies em uma comunidade (Barros, 2007). Tendo isso em mente, pode-se então definir alfa-diversidade como o parâmetro ecológico utilizado para descrever a riqueza de espécies encontradas em único local (Tuomisto, 2010).

Devido à dificuldade inerente à classificação de organismos procarióticos como “espécie“, o termo unidade taxonômica operacional (OTU) (Coenye *et al.*, 2005) é utilizado, pois refere-se a um conjunto de linhagens que compartilham alto grau de similaridade em várias características independentes. Os graus de similaridade para o gene de rRNA 16S que definem os diferentes táxons empregados nas análises de α -diversidade foram propostos por Scholss e Handelsman, em 2004. Assim, sequências de DNA com 3% de dissimilaridade são consideradas como de uma mesma espécie, enquanto organismos com 5% de dissimilaridade em suas sequências são considerados apenas do mesmo gênero. Caso as sequências apresentem 10% de dissimilaridade, os organismos são agrupados em uma mesma classe/família. Por fim, sequências com 20% de dissimilaridade são consideradas como pertencentes a organismos do mesmo filo.

Foram também calculados, pelo programa MOTHUR, os índices de riqueza CHAO e ACE. O índice CHAO (Barros, 2007) estima a riqueza da amostra a partir do número de OTUs representadas por apenas um e dois indivíduos nas amostras (*singletons* e *doubletons*, respectivamente). O índice ACE (Chao & Lee, 1992), por sua vez, estima a riqueza com base no grau de cobertura da mesma. Curvas representativas de boas coberturas de amostras apresentam a tendência de atingir o platô no gráfico, demonstrando um número suficiente de sequências ambientais. Espera-se que, após esse platô ser atingido, novas sequências não seriam mais encontradas no ambiente. Por se tratarem de índices que estimam valores de riqueza, não é incomum que seus valores excedam os valores de diversidade observados na amostragem.

As 71 sequências geraram 18 OTUs para o índice de dissimilaridade de 3%, 14 *singletons* e 2 *doubletons*. Os valores de riqueza representados pelos índices de CHAO e ACE indicam uma comunidade pouco diversa na amostra analisada (**Tabela 15**).

Tabela 15. Índices de riqueza (Chao e Ace) da amostra do aquário

Índice de dissimilaridade	Sequências	sobs	chao	ace	Cobertura
3%	71	18	50	58	80,28%
5%	71	9	11	15	92,95%
10%	71	5	6	11	95,78%
20%	71	2	2	2	100%

Para se estimar a cobertura da amostragem obtida na comunidade do aquário, foi construída uma curva de rarefação, também por meio do programa MOTHUR. A cobertura de amostragem foi avaliada seguindo os valores de dissimilaridade descritos anteriormente: 3% para espécie, 5% para gênero, 10% para classe e 20% para filo.

A curva de rarefação obtida (**Figura 26**) sugere que as 71 sequências utilizadas tenham sido suficientes para os níveis taxonômicos de gênero, classe e filo, visto que estas curvas parecem próximas de atingir o platô. Em nível de espécie, provavelmente seria necessário um maior número de amostras para que o platô fosse atingido.

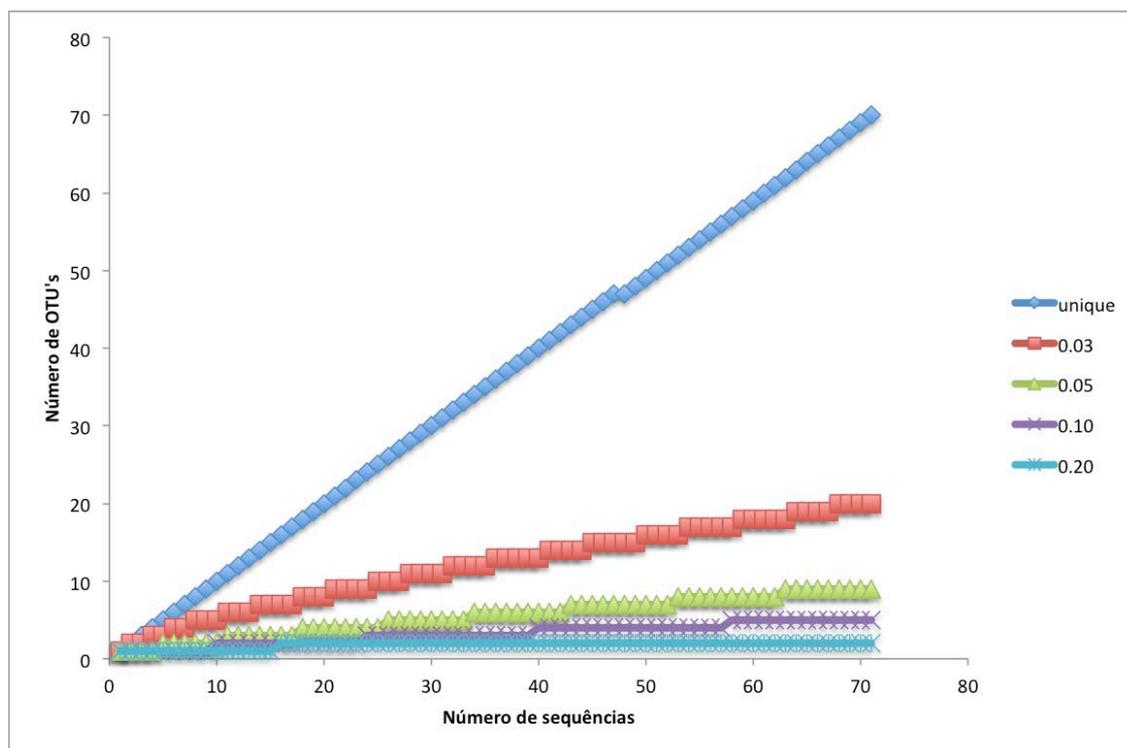


Figura 26. Curva de rarefação relativa aos clones da biblioteca de DNA do aquário. Índices de dissimilaridade de 3%, 5%, 10% e 20%.

4.5.8. Construção da Árvore Filogenética da biblioteca genômica do aquário, baseada no gene de rRNA 16S

Como a construção da biblioteca de clones do aquário teve como objetivo a comparação entre o ecossistema do aquário e as colônias obtidas, foi construída uma árvore filogenética contendo as OTUs representativas do aquário e as sequências de DNA das colônias obtidas, a partir do método de máxima verossimilhança e modelo Tamura 3-parâmetros. Como todas as colônias geraram sequências de Thaumarchaeota, nesta árvore foram utilizadas somente sequências conhecidas deste filo (**Figura 27**).

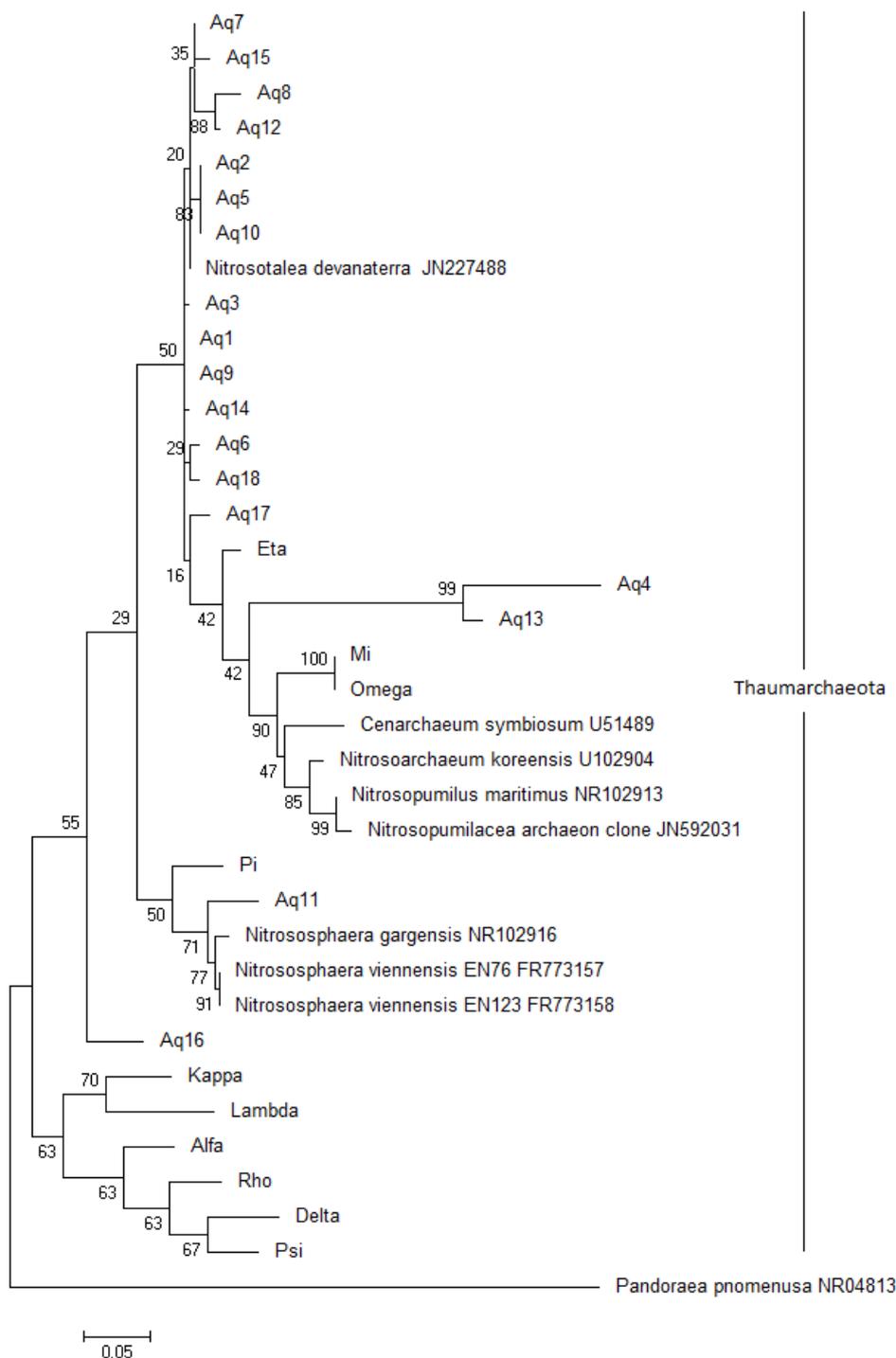


Figura 27. Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene de rRNA 16S das OTUs representativas do aquário e as sequências das colônias cultivadas. As OTUs das amostras Aq1 e Aq2 foram formadas por 37 e 16 sequências, respectivamente. A construção se deu por método de Máxima Verossimilhança e modelo Tamura 3-parâmetros. A sua robustez foi verificada com bootstrap de 1000 réplicas. Um exemplar bacteriano (*Pandoraaea pnomenusa*) foi utilizado como grupo externo. A escala indica a distância de similaridade entre os ramos.

Curiosamente, nenhuma das sequências referentes às colônias foi incluída nas OTUs geradas a partir da biblioteca genômica do aquário. Tal fato pode ser devido às diferenças qualitativas das duas amostras utilizadas, uma vez que foram coletadas a partir de sítios distintos.

Globalmente, as análises revelam uma pequena diversidade encontrada no aquário, com uma grande quantidade das OTUs agrupando-se com sequências de *Nitrosotalea devanaterrea*, uma AOA acidófila, inicialmente descrita a partir de solos de agricultura, considerada modelo para estudos de ecossistemas ácidos. No entanto, sequências de DNA relacionadas a este gênero já foram recuperadas de ambientes aquáticos, como lagos oligotróficos (Auguet *et al.*, 2012) e lagos eutróficos (Zeng *et al.*, 2014), ambos de água doce.

É possível observar o agrupamento das sequências Aq4 e Aq13 com um clado contendo os gêneros *Nitrosopumilus*, *Nitrosoarchaeum* e *Cenarchaeum*, assim como as sequências das colônias Mi/Ômega. Além disso, observa-se o agrupamento da amostra Aq11 com o gênero *Nitrososphaera*, resultado também encontrado quando do uso da ferramenta *Classifier* do *Ribosomal Database Project* (RDP), que indicou a ocorrência de 6 clones deste gênero. Ainda de acordo com o RDP, as demais foram identificadas como *Archaea* não classificadas.

Novamente deve ser ressaltada a provável limitação da sequência de DNA gerada pelos iniciadores utilizados para amplificar os genes de rRNA 16S. Assim, tal resultado também deve ser considerado apenas preliminar, havendo a necessidade de novos experimentos de PCR, com iniciadores mais adequados, a fim de permitir inferências filogenéticas mais precisas.

Considerações Finais

Os resultados obtidos neste trabalho revelam o potencial de cultivo de archaeas em meios artificiais, a partir de amostras de aquários. Nossos resultados sugerem a obtenção de pelo menos dois tipos distintos de *Archaea*, uma vez que foram obtidas colônias contendo organismos potencialmente envolvidos em processos de nitrificação (positivas para o gene *amoA*) e outras colônias sem tal característica.

5. Conclusões

- Foram obtidas culturas de *Archaea* do filo Thaumarchaeota, a partir de uma amostra contendo diferentes componentes de um aquário doméstico.
- As culturas consistem em pelo menos dois tipos metabólicos distintos de *Archaea*, sendo um composto por organismos potencialmente nitrificantes e outro por organismos aparentemente não nitrificantes.
- Todas as colônias obtidas constituíam-se em co-cultivos contendo exemplares bacterianos dos gêneros *Pandorea* ou *Cupriavidus*.
- Análises filogenéticas preliminares sugerem que a comunidade de *Archaea* do aquário é pouco diversa.

6. *Perspectivas*

- Utilização de novos iniciadores dirigidos ao gene de rRNA 16S, visando a obtenção de sequências com maior poder de resolução, para permitir uma caracterização filogenética mais precisa das colônias obtidas.
- A realização de análises de *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH) para avaliar a proporção de *Archaea* e *Bacteria* nas culturas obtidas.
- A construção de novas bibliotecas genômicas do aquário, para os genes de rRNA 16S e *amoA*, visando estudos mais amplos de filogenia molecular.
- Utilização de novos agentes antimicrobianos, ou novas estratégias visando a obtenção de culturas puras de *Archaea*.
- Estabelecimento de condições que permitam um crescimento mais eficiente em meios líquidos, a fim de permitir uma melhor caracterização fisiológica destes organismos.

Referências Bibliográficas

- Albers, S.V. & Meyer, B.H. (2011) "The archaeal cell envelope". *Nature Reviews Microbiology*, 9(6): 414-26.
- Allain, K. & Querellou, J. (2009) "Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges". *Extremophiles*, 13(4): 583-94.
- Allers, T. & Mevarech, M. (2005); "Archaeal genetics – the third way". *Nature Review in Genetics*, 6(1): 58-73.
- Alquères, S.M.C.; Almeida, R.V.; Clementino, M.M.; Vieira, R.P.; Almeida, W.I.; Cardoso, A.M.; Martins, O.B. (2007) "Exploring the biotechnological applications in the archaeal domain". *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 398-405.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool". *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-10.
- Auguet, J.C.; Triadó-Margarit, X.; Nomokonova, N.; Camarero, L.; Casamayor, E.O. (2012) "Vertical segregation and phylogenetic characterization of ammonia-oxidizing *Archaea* in a deep oligotrophic lake" *The ISME Journal*, 6(9): 1786-1797
- Bagchi, S.; Viaeminck, S.; Sauder, L.; Mosquera, M.; Neufeld, J.; Boon, N. (2014) "Temporal and Spatial Stability of ammonia-oxidizing *Archaea* and Bacteria in Aquarium Biofilters". *PLoS One*, 9(12): 1-22
- Balachandar, D.; Raja, P.; Kumar, K.; Sundaram, S.P. (2007) "Non-rhizobial nodulation in legumes". *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2(2): 49-57.
- Baldani, V.L.D.; Olivares, F.L.; Goi, S.R.; Silva, R.A.; Baldani, J.I.; Döbereiner, J. (1998) "Técnicas Microscópicas Aplicadas na Identificação e Localização de bactérias Fixadoras de Nitrogênio e Biomacromoléculas em Tecidos Vegetais" *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, Julho de 1998. 27p. (Documentos) – Embrapa - CNPAB
- 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 the USA*, 93(17): 9188-9193

- Barros, R. (2007) "Medidas de Diversidade Biológica" *PGECOL – Universidade Federal de Juiz de Fora*, Disponível em http://acszanzini.net/DISCIPLINAS_2012/ARDB%202012%20-1%20TXT/MEDIDAS%20DE%20DIVERSIDADE%20BIOLOGICA.pdf. Acessado em 26 de dezembro de 2014
- Belay, N. Mukhopadhyay, B.; De Macario, E.C.; Galask, R.; Daniels, L. (1990) "Methanogenic bacteria in human vaginal samples". *Journal of Clinical Microbiology*, 28(7): 1666-1668.
- Bernhard, A. (2010) "The nitrogen cycle: processes, players and human impact". *Nature Education Knowledge*, 3(10): 25.
- Bianco, C. (2011). "Monitoramento dos parâmetros da água" Publicado em: http://aquabr.com.br/artigos/aquarismo/monitoramento-dos-parametros-da-agua_5 Acessado no dia 14 de dezembro de 2014
- Blainey, P.C.; Mosier, A.C.; Potanina, A.; Francis, C.A.; Quake, S.R. (2011) "Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis". *PLoS One*, 6(2): 1-12.
- Brochier-Armanet, C.; Boussau, B.; Gribaldo, S.; Forterre, P. (2008) "Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota". *Nature Reviews Microbiology*, 6(3): 245-252.
- Brochier-Armanet, C.; Forterre, P.; Gribaldo, S. (2011) "Phylogeny and evolution of the *Archaea*: one hundred genomes later". *Current Opinion in Microbiology*, 14(3): 274-281.
- Brock, T.D.; Brock, K.M.; Belly, R.T.; Weiss, R.L. (1972) "*Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature". *Archives of Microbiology*, 84(1): 54-68.
- Calvó, L.; Cortey, M.; García-Marín, J.; Garcia-Gil, L. (2005) "Polygenic analysis of ammonia-oxidizing bacteria using 16S rDNA, *amoA*, and *amoB* genes". *International Microbiology* 8(2): 103-110.
- Cardoso, A.; Clementino, M.B.; Martins, O.B.; Vieira, R.P.; Almeida, R.V.; Alqueres, S.M.C.; Almeida, W.I. (2003) "Archaea: Potencial Biotecnológico – Utilização e aplicação de arqueas na biotecnologia" *Revista Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento*, 30.
- Castro, L.A.S. (2001) "Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura". *Embrapa Clima Temperado*, 37.

- Catão, E.; Castro, A.; Barreto, C.; Krüger, R.; Kyaw, C. (2013) "Diversity of *Archaea* in Brazilian savanna soils". *Archives of Microbiology*, 195(7): 507-512.
- Cavicchioli, R. (2011) "Archaea - timeline of the third domain". *Nature Reviews Microbiology*, 9: 51-61.
- Chao, A. & Lee, S.M. (1992) "Estimating the number of classes via sample coverage". *Journal of the American Statistical Association*, 87(417): 210-217.
- Coelho, C.; González, P.J.; Trincão, J.; Carvalho, A.L.; Najmudin, S.; Hettman, T.; Dieckman, S.; Moura, S.S.; Moura, I.; Romão, M.J. (2007) "Heterodimeric nitrate reductase (NapAB) from *Cupriavidus necator* H16: purification and preliminary X-ray analysis". *Acta crystallographica*, 1;63 (Pt 6): 516 – 519.
- Coenye, T.; Falsen, E.; Hoste, B.; Ohlén, M.; Johan, G.; Govan, J.; Gillis, M.; Vandamme, P. (2000) "Description of *Pandoraea* gen. Nov with *Pandoraea apista* sp. Nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. Nov., *Pandoraea pnomenusa* sp. Nov., *Pandoraea sputorum* sp. Nov. And *Pandoraea norimbergensis* comb. Nov.". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 887-889
- Coenye, T.; Gevers, D.; Van de Peer, Y.; Vandamme, P.; Swings, J. (2005) "Towards a prokaryotic genomic taxonomy" *FEM Microbiology Reviews*, 29(2): 147-167.
- Coolen M.J.L.; Hopmans, E.C.; Rijpstra, W.I.; Muyzer, G.; Schouten, S.; Volkman, J.K.; Damste (2004) "Evolution of the Methane Cycle in Ace Lake (Antarctica) During the Holocene: Response of the Methanogens and Methanotrophs to Environmental Change" *Organic Geochemistry*, 35(10): 1151-1167.
- Cowie, R.O.M.; Maas, E.W.; Ryan, K.G. (2011) "Archaeal Diversity revealed in Antarctic Sea Ice". *Antarctic Science* 23(6): 531–536.
- Dagert, M. & Ehrlich, S.D. (1979) "Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells". *Gene*, 6: 23-28
- Damashek, J.; Smith, J.M.; Mosier, A.C.; Francis, C.A. (2015) "Benthic ammonia oxidizers differ in community structure and biogeochemical potential across a riverine delta". *Frontiers in Microbiology*, 5(743): 1-18..

- Darland, G.; Brock, T.D.; Samsonoff, W.; Conti, S.F. (1970) "A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile". *Science*, 170(3965) 1416-1418.
- De la Torre, J.; Walker, C.; Ingalls, A.; Könneke, M.; Stahl, D. (2008) "Cultivation of a Thermophilic Ammonia Oxidizing Archaeon Synthesizing Crenarchaeol". *Environmental Microbiology*, 10 (3) 810-818.
- DeLong, E.F. (1992) "Archaea in coastal marine environments". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89(12): 5685-5689.
- DeLong E.F. & Hovanec, T. (1996) "Comparative Analysis of Nitrifying Bacteria Associated with Freshwater and Marine Aquaria". *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8): 2888-2896.
- DeLong, E.F. (2003) "Oceans of *Archaea*: abundant oceanic *Crenarchaeota* appear to derive from thermophilic ancestors that invaded low-temperature marine environments". *ASM News*, 69(10): 503-511.
- 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.
- Dollive, S.; Chen, Y.Y.; Grunberg, S.; Bittinger, K.; Hoffman, C.; Vandivier, L.; Cuff, C.; Lewis, J.D; Wu, G.D.; Bushman, F.D. (2013) "Fungi of the Murine Gut: Episodic Variation and Proliferation during Antibiotic Treatment". *PLoS One*, 8(8) 1-12.
- Egelseer, E. M.; Ilk, N.; Pum, D.; Messner, P.; Schaffer, C.; Schuster, B.; Sleytr, W. B. (2009) "S-layers, microbial, biotechnological applications". *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology*. 1-25
- Elsaied, H.E. (2014) "Genotyping of uncultured archaea in a polluted site of Suez Gulf, Egypt, based on 16S rRNA gene analyses". *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 40(1): 27-33.
- Ewing, B. & Green, P. (1998) "Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities". *Genome Research*, 8: 186-194.
- Farlow, W.G. (1878) "On the nature of the peculiar reddening of the salted codfish during the summer season" *U.S. Fish Commission, Report of the*

Comissioner for 1878, 969-973.

- Florentino, L. A.; Jaramillo, P. M. D.; Silva, K. B.; Silva, J. S.; Oliveira, S. M.; Moreira, F. M. S. (2012) "Physiological and symbiotic diversity of *Cupriavidus necator* strains isolated from nodules of Leguminosae species". *Scientia Agricola*, 69(4): 247-258.
- Francis, C.A.; Roberts, K.J.; Beman, J.M.; Santoro, A.E.; Oakley, B.B. (2005) "Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaeas in water columns and sediments of the ocean". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102(41): 14683-14688.
- French, E.; Kozlowski, J.A.; Mukherjee, M.; Bullerjahn, G.; Bollmann, A. (2012) "Enrichment and characterization of three ammonia-oxidizing Archaea from freshwater environments", *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16): 5773-5780.
- Graham, D.E.; Overbeek, R.; Olsen, G.J.; Woese, C.R. (2005) "An archaeal genomic signature". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97(7): 3304-3308.
- Grommen, R.; Dauw, L.; Verstraete, W.; (2005) "Elevated salinity selects for a less diverse ammonia-oxidizing population in aquarium biofilters". *FEMS Microbiology Ecology*, 52(1): 1-11.
- Guy, L. & Ettema, T.J.G. (2011) "The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes". *Trends in Microbiology*, 19(12): 580-587.
- Handelsman, J. (2004). "Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4): 669-685.
- Hatzenpichler, R.; Lebedeva, E.V.; Spiedck, E.; Stoecker, K.I.; Richeter, A.; Daims, H.; Wagner, M. (2008) "A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105(6): 2134-2139.
- Hatzenpichler, R. (2012) "Diversity, physiology and niche differentiation of ammonia-oxidizing Archaea". *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21): 7501-7510.
- Herrmann M.; Hädrich, A.; Küsel, K.; (2012) "Predominance of thaumarchaeal ammonia oxidizing acidizer abundance and transcriptional activity in an acidic fen". *Environmental Microbiology*, 14(11): 3013-3025.

- Hoffmann, C.; Dollive, S.; Grunberg, S.; Chen, J. Li, H.; Lewis, J.D. (2013) "Archaea and Fungi of the Human Gut Microbiome: correlations with diet and bacterial residents". *PLoS One*, 8(6): 1-12.
- Hong, Y.; Youshao, W.; Chen, F.; (2013) "Archaea dominate ammonia oxidizers in the permian water ecosystem of Midland basin". *Microbes and Environments*, 28(3): 396-199.
- 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(6884): 63-67.
- Huber, T.; Faulkner, G.; Hugenholtz, P. (2004) "Bellerophon: a Program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments". *Bioinformatics*, 20(14): 2317-2319.
- Hurakawa, H.; Tajima, Y. Numata, Y. Tsuneda, S.; (2008) "Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems". *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3): 894-900.
- Ilk, N.; Egelseer, E.M.; Sleytr, U.B. (2011) "S-layer fusion proteins - construction principles and applications". *Current Opinion in Biotechnology*, 22(6): 824-831.
- Jarrell, K.F.; Stark, M.; Nair, D.B.; Chong, J.P.J.; (2011) "Flagella and pili are both necessary for efficient attachment of *Methanococcus maripaludis* to surfaces" *FEMS Microbiology Letters*, 319(1): 44-50
- Jørgensen, I.; Johansen, H.; Frederiksen, B.; Pressler, T.; Hansen, A.; Vandamme, P.; Høiby, N.; Koch, C. (2003) "Epidemic Spread of *Pandoraea apista*, a New Pathogen Causing Severe Lung Disease In Cystic Fibrosis Patients". *Pedriatic Pulmonology*, 36(5): 439-446.
- Jung, M.Y.; Park, S.J.; Min, D.; Kim, J.S.; Rijpstra, WIC.; Sinninghe-Damste, J.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: 8635-8647
- Jung, M.Y.; Park, S.J.; Kima, S.J.; KIMA, J.G.; Sinningh, J.S.; Damstéc; Jeond, C.O.; Rhee, S.K. (2014) "A mesophilic, autotrophic, ammonia-oxidizing archaeon of thaumarchaeal group I.1a cultivated from a deep oligotrophic

- soil horizon". *Applied and Environmental Microbiology*, 80(12): 3645-3655.
- Kaeberlein, T.; Lewis, K.; Epstein, S.S. (2002) "Isolating 'Uncultivable' microorganisms in pure culture in a simulated natural environment". *Science*, 296(5570): 1127-1129.
- Kandler, O. & König, H. (1998) "Cell wall polymers in *Archaea* (Archaeobacteria)". *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54(4): 305-308.
- Karafin, M.; Romagnoli, M.; Fink, D.L.; Howard, T.; R, R.; Milstone, A.M. Carroll, K.C. (2010) "Fatal infection caused by *Cupriavidus gilardii* in a child with aplastic anemia". *Journal of Clinic Microbiology*, 48(3) 1005-1007.
- Kates, M.; Kushner, D.; Matheson, A. (1993) "Membrane lipids of archaea In: The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)". *Amsterdam: Elsevier*, 9: 261-295.
- Kokcha, S.; Bittar, F.; Reynaud-Gaubert, M.; Mely, L.; Gomez, C.; Gaubert, J.; Thomas, P.; Rolain, J. (2013) "*Pandoraea pulmonicola* chronic colonization in a cystic fibrosis patient, France". *New Microbes and New Infections*, 1(2): 27-29.
- Könneke, M.; Bernhard, A.E.; De la Torre, J.R.; Walker, C.B.; Waterbury, J.B.; Stahl, D.A. (2005) "Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon". *Nature*, 437(70758): 543-546.
- Krüger, M.; Wolters, H.; Gehre, M.; Joye, S. Richnow, H. (2008) "Tracing the slow growth of anaerobic methane-oxidizing communities by ¹⁵N-labelling techniques". *FEMS Microbiology Ecology*, 63(3): 401–411.
- 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.
- Lebedeva, E. V.; Hatzenpichler, R.; Pelletier, E.; Schuster, N.; Hauzmayer, S.; Bulaev, A.; Grigoreva, N. V.; Galushko, A.; Schmid, M.; Palatinszky, M.; Le Paslier, D.; Daims, H.; Wagner, M. (2013) "Enrichment and genome sequence of the group I.1a ammonia-oxidizing archaeon "*Ca. Nitrosotenuis uzonensis*" representing a clade globally distributed in thermal habitats". *PloS One*, 8(1): 1-12.

- Lehtovirta-Morley, L. E.; Stoecker, K.; Vilciskas, A.; Prosses, J.; Nicol, G. (2011) "Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acidic soil". *Proceeding of National Academy of Sciences of the USA*, 108(38): 15892-15897.
- Lehtovirta-Morley, L.E.; Ge, C.; Ross, J.; Yao, H.; Nicol, G.W.; Prosser, J.I. (2014) "Characterisation of terrestrial acidophilic archaeal ammonia oxidisers and their inhibition and simulation by organic compounds". *FEMS Microbiology Ecology*, 89(3): 542-552.
- Leigh, J.A. (2000) "Nitrogen fixation in methanogens: the archaeal perspective". *Current Issues in Molecular Biology*, 2(4): 125-131.
- Martínez, C.B.R.; Azevedo, F.; Winkaler, E. (2006) "Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais". *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura*, 81-95.
- Martínez-Lamas, L.; Rabade, C.; Martín, M.; Barbeito, G.; Palacios, A.; Pérez, M.; (2011) "Colonización por *Pandoraea sputorum* en un paciente con fibrosis quística". *Archivos de Bronconeumología*, 47(11) 571-574.
- McInerney, J.O.; Mullarkey, M.; Wernecke, M.E.; Powell, R. (2001) "Bacteria and Archaea: molecular techniques reveal astonishing diversity" *Biodiversity*, 3(2) 3-10
- Mou, X.; Lu, X.; Jacob, J.; Sun, S.; Heath, R. (2013) "Metagenomic identification of bacterioplankton taxa and pathways involved in microcystin degradation in Lake Erie". *PloS One*, 8(4): 1-14.
- Näther, D.J.; Rachel, R.; Wanner, G.; Wirth, R. (2006) "Flagella of *Pyrococcus furiosus*: multifunctional organelles, made for swimming, adhesion to various surfaces and cell-cell contacts". *Journal of Bacteriology*, 188(19) 6915-6923
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2011) "Princípios de Bioquímica de Lehninger" 5ª Edição. São Paulo, Editora Artmed, 2011.
- Nunoura, T.; Tataka, Y.; Kakuta, J.; Nishi, S.; Sugahara, J.; Kazama, H.; Chee, G.; Hattori, M.; Kanao, 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.
- Ochsenreiter, T.; Selezi, D.; Quaiser, A.; Bonch-Osmolovskaya, L.; Chleper, C.

- (2003) "Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR". *Environmental Microbiology*, 5(9): 787-797.
- Offre, P.; Spang, A.; Schleper, C. (2013) "Archaea in Biogeochemical Cycles". *Annual Review of Microbiology*, 67: 437-457.
- Pace, N.R. (1997) "A molecular view of microbial diversity and the biosphere". *Science*, 276(5313): 734-40.
- Pandithage, R. (2013) "Brief Introduction to Contrasting for EM Sample Preparation". Disponível em: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/brief-introduction-to-contrasting-for-em-sample-preparation/> Acessado em: 28 de novembro de 2014.
- Park, B.J.; Park, S.J.; Yoon, D.N.; Schouten, S.; Sinninghe, J.S.; Rhee, S.K. (2010) "Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing Archaea from marine sediments in co-culture with sulfur-oxidizing-bacteria". *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22): 7575-7587.
- Pester, M.; Schleper, C.; Wagner, M. (2011) "The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology". *Current Opinion in Microbiology*, 14(3): 300-306.
- Pester, M.; Rattei, T.; Flechl, S.; Gröngröft, A.; Richter, A.; Overmann, J.; Reinhold-Hurek, B.; Loy, A.; Wagner, M. (2012) "AmoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing Archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions". *Environmental Microbiology*, 14(2): 525-539.
- Philippot, L. (2002) "Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes". *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Structure and Expression*, 1557(3): 355-376.
- Pum, D.; Toca-Herrera, J.L.; Sleytr, U.B. (2013) "S-layer protein self-assembly". *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2): 2484-2501.
- Rappé, M.S. & Giovannoni, S.J. (2003) "The uncultured microbial majority". *Annual Review of Microbiology*, 57: 369-94.
- Rinke, C.; Schwientek, P.; Sczyrba, A.; Ivanova, N.N.; Anderson, I.J.; Cheng, J.F.; Darling, A.; Malfatti, S.; Swan, B.K.; Gies, E.A.; Dodsworth, J.A.; Hedlund, B.P.; Tsiamis, G.; Sievert, S.F.; Liu, W.; Eisen, J.A.; Halm, H.

- S.F.; Kyrpider, N.C.; Stepanauskas, R.; Rubin, E.R.; Hugenholtz, P.; Woyke, T. (2013) "Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter". *Nature*, 499(7459): 431-437.
- Riviera, M.C; Jain, R.; Moore, J.E.; Lake, J.A. (1998) "Genomic evidence for two functionally distinct gene classes". *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 95(11): 6239-6244.
- Robertson, C.E.; Harris, J.K.; Spear, J.R.; Pace, N.R.; (2005) "Phylogenetic diversity and ecology of environmental *Archaea*". *Current Opinion in Microbiology*, 8(6): 638 – 642.
- Rodrigues, T.; Catão, E.; Bustamante, M.C.; Quirino, B.F.; Krüger, R.H.; Kyaw, C.M. (2014) "Seasonal effects in a lake sediment archaeal community of the brazilian savana". *Archaea* 2014:1-9.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees". *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406-425.
- Sauder, L.A.; Engel, K.; Stearns, J.C.; Masella, A.P.; Pawliszyn, R.; Neufeld, J.D. (2011) "Aquarium Nitrification Revisited: Thaumarchaeota are the Dominant Ammonia Oxidizers in Freshwater Aquarium Biofilters". *PLoS One*, 6(8): 1-9.
- Schleper, C.; Puehler, G.; Holz, I.; Gambacorta, A.; Janekovi, D.; Santarius, U.; Klenk, H.; Zillig, W.; (1995) "A Novel Aerobic, Heterotrophic, Thermoacidophilic Genus and Family Comprising *Archaea* Capable of Growth around pH 0". *Journal of Bacteriology*, 177(24): 7050-7059.
- Schleper, C.; Jurgens, G.; Jonuscheit, M. (2005) "Genomic Studies of Uncultivated *Archaea*". *Nature Reviews*, 3(6): 479-488.
- Schloss, P.D.; Westcott, S.L.; Ryabin, T.; Hall, J.R.; 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.
- Selenska-Pobell, S.; Reitz, T.; Schönemann, R.; Herrmansdörfer, T.; Merroun, M.; Geißler, A.; Bartolomé, J.; Bartolomé, F.; García, L.M.; Wilhelm, F.; Rogalev, A. (2011) "Magnetic Au nanoparticles on archaeal S-layer

- ghosts as templates". *Nanomaterials and Nanotechnology*, 1: 8-16.
- Sleytr, U. B. & Sára, M. (1997) "Bacterial and archaeal S-layer proteins: structure-function relationships and their biotechnological applications". *Trends in Biotechnology*, 15(1): 20-6.
- Spang, A.; Martijn, J.; Saw, J.H.; Lind, A.E.; Guy, L.; Ettema, T.J. (2013) "Close encounters of the third domain: the emerging genomic view of archaeal diversity and evolution". *Archaea*, 13 (ID 202358): 12
- Staley, J.T., Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*, 39:321–346.
- Stempfhuber, B.; Engel, M.; Fischer D.; Nesjovic-Prit, G.; Wubet, T.; Schöning, I.; Gubry-Rangin, C.; Kublik, S.; Schloter-Hai, B.; Rattei, T.; Welzl, G.; Nicol, G.W.; Schrumppf, M.; Buscot, F.; Prosser, J.I.; Schloter, M. (2014) "PH as a driver for ammonia-oxidizing archaea in forest soils". *Soil Microbiology*.
- Strous. M.; Fuerst, J.A.; Kramer, E.H.; Logemann, S.; Muyzer, G.; Van de Pas-Schoonen, K.T.; Webb, R. Kuenen, J.G., Jetten, M.S. (1999) "Missing lithotroph identified as new plactomycete". *Nature*, 400(6743): 446-449.
- Sun, J.; Hu, S.; Sharpe, K.R.; Ni, B.; Yuan, Z. (2014) "Stratified microbial structure and activity in sulfide and methane-producing anaerobic sewer biofilms". *Applied and Environmental Microbiology*, 80(22): 7042-7052.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipowski, A.; Kumar, S. (2013) "Mega6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0". *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725-2729.
- Thiele-Bruhn, S. & Beck, I. (2005) "Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass". *Chemosphere*, 59(4): 457–465.
- Tomasso, J. (1994) "Toxicity of nitrogenous wastes of aquaculture animals". *Reviews in Fisheries Science*, 2: 291-341.
- Tourna, M; Stieglmeier, M; Spang, A.; Könneke, M; Schintlmeister, A.; Urich, T.; Engel, M.; Schloter, M.; Wagner, M; Richter, A.; Schleper, C. (2011) "*Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from the soil". *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 108(20): 8420-8425.

- Tuomisto, H. (2010) "A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 1. Degrading beta diversity as a function of alpha and gamma diversity". *Ecography*, 22(1): 2-22.
- Urakawa, H.; Tajima, Y.; Numata, Y.; Tsuneda, S. (2008) "Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems". *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3): 894-900.
- Van der Wielen, P.W.J.J.; Voost, S.; Van der Kooij, D. (2009) "Ammonia-oxidizing bacteria and archaea in groundwater treatment and drinking water distribution systems". *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14): 4687-4695.
- Vianna, M.E. Holtgraewe, S.; Horz, H.P. (2008) "Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic archaea, sulfate-reducing bacteria and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease". *Journal of Bacteriology*, 190(10): 3779-3785.
- Vissers, E.W.; Bodelier, P.L.E.; Muyzer, G.; Laanbroek, H.J. (2009) "A nested PCR approach for improved recovery of archaeal 16S rRNA gene fragments from freshwater samples". *FEMS Microbiology Letters*, 298(2): 193-198.
- 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 Environmental Microbiology*, 73(16): 5261-5267.
- Ward, B.B.; Capone, D.G.; Zehr, J.P. (2007) "What's new in the nitrogen cycle?". *Oceanography*, 20(2): 101-109.
- Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. (1991) "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study". *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697-703.
- Widdel, F. (1986) "Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-Propanol and other alcohols as Hydrogen donors". *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5): 1056-1062.
- Wintzingerode, F.; Göbel, U.; Stackebrandt, E.; (1997) "Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis". *FEMS Microbiology Reviews*, 21(3): 213-229

- Woese, C. & Fox, G. (1977) "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 74(1): 5088-5090.
- Woese, C.; Kandler, O.; Fox, G. (1990) "Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87(2): 4576-4579.
- Yildiz, E.; Ozcan, B.; Caliskan, M. (2012) "Isolation, characterization and phylogenetic analysis of halophilic *Archaea* from a Salt Mine in Central Antolia (Turkey)". *Polish Journal of Microbiology*, 61(2): 11-117.
- Zeng, J.; Zhao, D.; Yu, Z.; Huang, R.; Wu, Q.L. (2014) "Temperature responses of ammonia-oxidizing prokaryotes in freshwater sediment microcosms" *PLoS One*, 9(6)
- Zhang, L.M.; Hu, H.W.; Shen, J.P.; He, J.Z. (2012) "Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils". *ISME Journal*, 6(5): 1032-1045.