AMANDA GONÇALVES BENDIA

**A VIDA MICROBIANA EM UM VULCÃO ANTÁRTICO:
DIVERSIDADE E ADAPTAÇÃO PROCARIÓTICA
NA ILHA *DECEPTION***

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

São Paulo
2016

AMANDA GONÇALVES BENDIA

**A VIDA MICROBIANA EM UM VULCÃO ANTÁRTICO:
DIVERSIDADE E ADAPTAÇÃO PROCARIÓTICA
NA ILHA *DECEPTION***

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

Área de concentração: Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia

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

Versão original

São Paulo
2016

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gonçalves Bendia, Amanda

A vida microbiana em um vulcão antártico:
diversidade e adaptação procariótica na Ilha
Deception / Amanda Gonçalves Bendia; orientadora
Vivian Pellizari. -- São Paulo, 2016.
184 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Extremófilos. 2. Antártica. 3. Ambientes
geotermiais. 4. Diversidade microbiana. 5. Adaptação
microbiana . I. Pellizari, Vivian , orientador. II.
Título.

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

Candidato(a): Amanda Gonçalves Bendia

Título da Tese: A vida microbiana em um vulcão antártico: diversidade e adaptação procariótica na Ilha *Deception*

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a / / 2016, considerou

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

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **843/2016** referente ao projeto intitulado: ***"Diversidade Microbiana em sítios geotermiais da Ilha vulcânica Deception, Antártica"*** sob a responsabilidade de ***Amanda Gonçalves Bendia*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Vivian Helena Pellizari***, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 03 de novembro de 2016.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Vice-coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora 3 CEPSH ICB/USP

Ao meu avô, Carlos Augusto
Gonçalves. Seu amor e ensinamentos
estarão sempre comigo.
(In memoriam)

AGRADECIMENTOS

Durante os últimos quatro anos obtive aprendizados que carregarei durante toda a vida, e talvez o principal deles seja que nenhum trabalho é construído sozinho. Por este motivo, gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos às inúmeras contribuições sem as quais este trabalho jamais teria sido finalizado:

Ao povo brasileiro, que com muita dificuldade financia a ciência em nosso país.

À Universidade de São Paulo, pela oportunidade e formação.

À minha orientadora, Dra. Vivian Helena Pellizari, por todas as oportunidades incríveis e aprendizados valiosos transmitidos ao longo dos últimos anos. Muito obrigada por toda a ajuda, incentivo, confiança, amizade, e por aguçar ainda mais o meu fascínio pelo incrível mundo da Microbiologia.

Ao Dr. Rubens Duarte, meu “co-orientador não oficial”, por todos os conhecimentos pacientemente transmitidos, pela constante ajuda e amizade. Obrigada por iniciar a ideia deste trabalho e por muitas vezes me trazer de volta à realidade quando eu queria abraçar o mundo.

À Rosa Gamba, que nunca mediu esforços para me ajudar ao longo desses anos, “salvando a minha vida” incontáveis vezes. Sem você este trabalho jamais seria possível. Muito obrigada pela valiosíssima amizade e pelo exemplo de força e dedicação.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana, Adriana, Natascha, Felipe, Diego, Luciano, Fran, Luana, Célio, Renato, Camila, Vitor, Juliana, Dra. Cristina Nakayama, por todo o companheirismo, ajuda e amizade. Foi um prazer compartilhar os últimos anos com vocês. Em especial, à “Equipe Illumina”, pelo apoio mútuo, discussões científico-filosófico-existenciais, e por fazer das muitas madrugadas sombrias de experimentos momentos tão agradáveis e divertidos.

Ao Dr. Douglas Galante e Dr. Fábio Rodrigues, por todas as oportunidades astrobiológicas e amizade ao longo dos últimos anos.

Aos meus professores da graduação que tanto me inspiraram, especialmente ao Dr. André Lima, que me iniciou na carreira científica, transmitindo ensinamentos indispensáveis à minha formação, e ao Dr. Marcus Adonai, que ao comentar sobre Astrobiologia e extremófilos em suas aulas, direcionou os rumos da minha vida acadêmica.

À Dra. Claudia Lage, que me iniciou nas pesquisas astrobiológicas durante o Mestrado.

À tripulação do Navio Polar Almirante Maximiano durante a Operação Antártica XXXII, em especial ao Comandante Benoni e ao Chefe de Operações Gizo Sampaio, pelo incrível apoio logístico durante as coletas realizadas neste trabalho.

Ao Programa Antártico Brasileiro, ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), à Marinha do Brasil e à Força Aérea Brasileira, pelo apoio financeiro e logístico durante a Operação Antártica XXXII.

Ao Dr. Jefferson Simões, coordenador no Projeto Criosfera (CNPq-Proantar), da qual este trabalho fez parte, e ao Dr. Luiz Rosa, coordenador do grupo de Microbiologia Polar, pelo apoio durante as coletas em *Deception*.

Ao Dr. Antônio Carlos Rocha Campos, coordenador do projeto “Registro paleoclimático da transição (*greenhouse-icehouse*) Eoceno-Oligoceno na Antártica Ocidental”, e à Dra. Wânia Duleba, pelo apoio durante as coletas em *Deception*.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de Doutorado concedida.

À minha mãe, por todo o amor e dedicação incondicional para a minha educação desde os meus primeiros anos de vida. Obrigada por estar sempre ao meu lado me incentivando e vibrando a cada conquista.

Ao meu avô, Carlos Augusto Gonçalves (*in memoriam*) por sempre ter me apoiado incondicionalmente, sem nunca medir esforços para proporcionar todas as oportunidades que me fizeram chegar até aqui. Seu amor e ensinamentos estarão sempre comigo, me dando forças para continuar.

Aos melhores padrinhos que eu poderia ter: Claudia Müller e Alexandre Bittencourt, e aos demais familiares, Vó, Tia Cris, Tio Xande, Sabrina, Lucas, Matheus, Tia Sandra, Thomaz, Thiago, Pri, Isa e Ceci, obrigada pelo constante amor, carinho e apoio.

Às “melhores amigas”, Lola, Nah, Beth e Lucy, obrigada pela grande amizade construída nos últimos anos. Admiro cada uma de vocês e é um prazer acompanhar as suas jornadas. Contem sempre comigo.

À minha família “emprestada”, Nilda Parisi, Lourdes, Ricardo, Renata, Cacá, Nanda, Ana, Alex e Carlão, obrigada por todo o carinho e apoio constante.

Aos meus amores caninos, Mel (*in memoriam*) e Darth, que trouxeram tanto amor e felicidade à minha vida.

Ao meu amor e companheiro, Roberto Parisi, obrigada por estar sempre ao meu lado, me dando força nos momentos difíceis e compartilhando cada conquista. “*Diante da vastidão do tempo e da imensidão do Universo, é um imenso prazer dividir um planeta e uma época com você*”.

“Todos os seres orgânicos que vivem sobre a Terra descendem provavelmente de uma única forma primordial, na qual a vida foi insuflada pela primeira vez [...] Há grandeza nesta visão da vida [...] que diz que, enquanto este planeta foi girando de acordo com a lei imutável da gravidade, a partir de um princípio tão simples, infinitas formas de grande beleza evoluíram e continuam a evoluir”.

Charles Darwin, A Origem das Espécies, 1859

“Sou atormentado por um desejo constante pelo que é remoto. Eu amo navegar em mares proibidos...”

Hermann Melville, Moby Dick, 1851

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida”.

Carl Sagan

RESUMO

BENDIA, A. G. **A vida microbiana em um vulcão antártico: diversidade e adaptação procariótica na Ilha *Deception***. 2016. 184 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Vulcões ativos na Antártica contrastam com a paisagem predominantemente gelada do continente. Eles fornecem condições únicas capazes de selecionar uma grande variedade de adaptações microbianas, especialmente relacionadas à temperatura e fontes de energia geoquímica. A Ilha *Deception* localiza-se na região da Península Antártica e difere dos outros vulcões antárticos especialmente pela influência marinha e temperaturas mais elevadas. Foram coletadas amostras de sedimentos associados a fumarolas e geleiras em dois sítios geotermiais de *Deception*, com temperaturas variando entre 0 °C a 98 °C. As técnicas de PCR quantitativo, sequenciamento do gene do RNAr 16S e Metagenoma foram empregadas com o intuito de entender como as comunidades microbianas respondem as variações ambientais extremas produzidas pela atividade vulcânica, principalmente quanto a sua composição, diversidade e potencial metabólico e adaptativo. Os perfis taxonômicos e funcionais indicam que as comunidades são fortemente influenciadas pelas variações de temperatura e composição geoquímica. Conforme valores de temperatura acima de 90 °C são atingidos, as comunidades são dominadas por arqueias hipertermófilas relacionadas ao metabolismo do enxofre e à quimiolitotrofia, e por genes relacionados ao estresse oxidativo, reparo de DNA por excisão de bases e mecanismos de adaptação específicos de arqueias hipertermófilas (p. ex. *thermosomus* e *gyrase reversa*). As fumarolas de até 80 °C são compostas por bactérias comuns e incomuns (p. ex. *Caldithrix*) em ambientes antárticos, por arqueias marinhas oxidadoras de amônia, e por genes relacionados ao estresse osmótico, oxidação de enxofre, metabolismo do nitrogênio, fotossíntese e adaptação a altas e baixas temperaturas. As geleiras são compostas por bactérias típicas de ambientes antárticos e arqueias metanogênicas, e por genes envolvidos com o estresse osmótico, fotossíntese, metabolismo do nitrogênio e adaptação a baixas temperaturas. Um conjunto de parâmetros ambientais moldam a composição e diversidade de bactérias e arqueias na Ilha *Deception*, especialmente temperatura e compostos de origem vulcânica e marinha. A co-ocorrência de arqueias hipertermófilas e suas adaptações específicas com micro-organismos metabolicamente diversos adaptados a regiões geladas representa uma estrutura de comunidades única para ecossistemas antárticos, mesmo quando comparados aos vulcões continentais. Esses resultados fornecem dados inéditos sobre questões centrais de diversidade e adaptação microbiana em ambientes geotermiais polares. As possíveis interações entre micro-organismos tão distintos em suas adaptações fazem da Ilha *Deception* um ambiente interessante para estudos envolvendo biogeografia, evolução microbiana e Astrobiologia.

Palavras chave: Extremófilos. Ambientes geotermiais. Fumarolas. Geleiras. Antártica. Diversidade microbiana. Adaptação. Temperatura. Compostos geoquímicos. Gradientes ambientais.

ABSTRACT

BENDIA, A. G. **Microbial life on an antarctic volcano: prokaryotic diversity and adaptation in Deception Island**. 2016. 184 p. PhD Thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Active volcanoes in Antarctica contrast with the predominately icy landscape. They harbor unique conditions capable to select an extreme range of microbial adaptations, especially regarding temperature and geochemical energy sources. Deception Island is located in the Antarctic Peninsula region and differs from other Antarctic volcanoes specially by its higher temperatures and marine influence. We collected sediment samples associated to active fumaroles and glaciers on two geothermal sites of Deception Island, with temperatures ranging from 0 °C to 98 °C. Quantitative PCR, next generation sequencing of 16S rRNA gene and shotgun metagenomics were used to understand how microbial communities respond to extreme environmental variations produced by volcanic activity, especially related to their diversity and metabolic and adaptative potencial. The taxonomic and functional profile show that microbial communities are strongly shaped by temperature and geochemical variations. As temperature increases to values above 90°C, the communities are mainly dominated by hyperthermophilic archaea related to sulfur metabolism and chemolithoautotrophy, and by genes related to oxidative stress, base excision repair, and specific hyperthermophilic adaptation mechanisms (reverse gyrase, thermosomes). Fumaroles with temperatures until 80 °C are dominated by usual and unusual antarctic bacteria (*Calditrix*) and by marine ammonia oxidizing Archaea, and by genes related to osmotic stress, sulfur oxidation, nitrogen metabolism, photosynthesis and adaptations to high and low temperatures. Glaciers are dominated by usual antarctic bacteria and methanogenic archaea, and by genes related to osmotic stress, photosynthesis, nitrogen metabolism and low temperatures adaptations. Different environmental parameters shape archaeal and bacterial composition and diversity, especially temperature and volcanic and marine compounds. The co-occurrence of hyperthermophiles and their specific adaptations with metabolically diverse cold-adapted micro-organisms represents a unique community structure for antarctic habitats, even when compared to the continental volcanoes. These results provide primordial data on central questions about microbial diversity and adaptation to polar geothermal environments. The possible interactions among so differently adapted micro-organisms makes Deception Island an interesting environment to study biogeography, microbial evolution and Astrobiology.

Keywords: Extremophiles. Geothermal environment. Fumaroles. Glaciers. Antarctica. Microbial diversity. Adaptation. Temperature. Geochemical compounds. Environmental gradients.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Distribuição dos vulcões ativos (vermelho) e inativos (verde) do continente e da Península Antártica 28
- Figura 2** - Visão geral (B) e mapa da Ilha *Deception*, Ilhas Shetland do Sul, Antártica, e suas zonas geotermicamente ativas (A). As setas vermelhas indicam a localização aproximada dos sítios de estudo deste trabalho 30
- Figura 3** - Temperaturas ótimas e pH mínimos requeridos para o crescimento de bactérias e arqueias termofílicas 35
- Figura 4** - Adaptações celulares comuns em micro-organismos psicrófilos 42
- Figura 5** - Visão geral dos pontos de coleta nos sítios geotermiais de *Whalers Bay* e *Fumarole Bay*, na Ilha *Deception*. 51
- Figura 6** - Esquema correspondente a combinação de diferentes primers que irão criar “códigos” para a identificação de 96 amostras. Em A: conjunto de primers índices 1, B: conjunto de primers índices 2 e C: placa contendo os amplicons do gene do rRNA 16S. Fonte: Protocolo Illumina – 16S *Metagenomic Sequencing Library Preparation*. 55
- Figura 7** - Número de cópias do gene RNAr 16S em Archaea por grama de solo/sedimento das diferentes temperaturas ambientais. Não foi obtida a amplificação do gene para as amostras FBA1, FBA2 e FBA3, nas condições analisadas. 66
- Figura 8** - Número de cópias do gene RNAr 16S em Bacteria por grama de solo/sedimento das diferentes temperaturas ambientais. Não foi obtida a amplificação do gene para as amostras FBA1, FBA2 e FBA3, nas condições analisadas. 66
- Figura 9** - Proporção entre o número de células de bactérias e arqueias, estimada através de PCRq do gene RNAr 16S. O número de cópias do gene RNAr 16S foi convertido para número de células assumindo 2 e 3,8 cópias do gene por célula de arqueia e bactéria, respectivamente. Não foi detectada a amplificação do gene para as amostras FBA1, FBA2 e FBA3, nas condições analisadas. 67
- Figura 10** - Análise de componentes principais (PCA) correlacionando o número de cópias do gene do RNAr 16S e os parâmetros físico-químicos ambientais. CEC: capacidade de troca de cátions; EC: condutividade elétrica; OM: matéria orgânica; Temp: temperatura ambiental. CP 1: 63,7%; CP 2: 36,3%. 68
- Figura 11** - Observação dos produtos de PCR de algumas amostras correspondentes ao primeiro passo para a elaboração das bibliotecas do gene RNAr 16S para a plataforma Illumina MiSeq. M: marcador; C-: controle negativo; C+: controle positivo. 70

Figura 12 - Análise em equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent) das bibliotecas do gene RNAr 16S de bactérias, purificadas por *beads* magnéticas. A numeração nos gráficos corresponde às amostras: B1: FBC1, B2: FBC2, B3: FBC3, B4: WBA1, B5:WBA2, B6: WBA3, B7: WBB1, B8:WBB2, B9: WBB3, B10:WBC1, B11:WBC2, B12, WBC3... 71

Figura 13 - Abundância relativa dos Filos do Domínio Bacteria considerando todas as amostras de Deception. Estão representados os Filos que apresentaram valores maiores que 1%. Para Proteobacteria estão representadas as Classes deste Filo. 73

Figura 14 - Abundância relativa dos Filos de Bacteria que exibiram valores maiores que 0,1%. 75

Figura 15 - Classificação taxonômica das OTUs com abundância relativa maior que 0,1%, ao nível de gênero. O tamanho das bolhas indica o número de sequências classificadas em cada gênero ou não classificadas (Unclassified)..... 80

Figura 16 - Abundância relativa dos Filos e Ordens do Domínio Archaea, considerando todas as amostras de *Deception*. 88

Figura 17 - Abundância relativa dos grupos taxonômicos ao nível de Filo para o Domínio Archaea. 89

Figura 18 - Abundância relativa dos grupos taxonômicos ao nível de Ordem para o Domínio Archaea. 89

Figura 19 - Abundância relativa dos gêneros detectados na Ilha *Deception* para o Domínio Archaea. 96

Figura 20 - Classificação das sequências ao nível de gênero para o Domínio Archaea. O tamanho das bolhas é equivalente ao número de sequências detectadas. 97

Figura 21 - Curva de rarefação estimada para as amostras analisadas do Domínio Bacteria. O segundo gráfico agrupa as amostras associadas à fumarolas e associadas às geleiras. 102

Figura 22 - Índices de riqueza e diversidade calculados para o Domínio Bacteria. As triplicatas de coleta foram agrupadas para a construção dos *boxplots*..... 104

Figura 23 - Modelo de regressão linear a partir dos índices de diversidade empregados para Bacteria *versus* temperatura ambiental. Os valores de R^2 e p estão destacados na figura. 105

Figura 24 - Dendrograma gerado através do índice de UNIFRAC quantitativo e clusterização pelo método UPGMA. 107

Figura 25 - PcoA construído a partir de matriz de distância contendo os índices de UNIFRAC quantitativo para o Domínio Bacteria. PC1: 57,19%, PC2: 20,31%.....	107
Figura 26 - Número de OTUs compartilhadas entre fumarolas e geleiras da Ilha <i>Deception</i> , para o Domínio Bacteria.....	109
Figura 27 - Número de OTUs que compõem o microbioma central da Ilha <i>Deception</i> quanto ao Domínio Bacteria. A abundância relativa das 7 OTUs presentes em todas as amostras analisadas e sua classificação taxonômica estão destacadas na parte inferior à direita.	110
Figura 28 - Distribuição e abundância das 7 OTUs presentes em todas as amostras analisadas da Ilha <i>Deception</i> . O tamanho das bolhas corresponde ao número de sequências classificadas para cada OTU. G: Gênero, O: Ordem, F: Família.	110
Figura 29 - Diagrama de cordas exibindo a distribuição das 3 OTUs mais abundantes em cada amostra analisada. As amostras foram agrupadas em triplicatas de coleta. As OTUs estão classificadas ao nível de Ordem.	112
Figura 30 - Curva de rarefação estimada para as amostras analisadas do Domínio Archaea. O segundo gráfico agrupa as amostras associadas a fumarola de 98 °C, demais fumarolas (< 80 °C) e geleiras.....	113
Figura 31 - Índices de riqueza e diversidade calculados para o Domínio Archaea. As triplicatas de coleta foram agrupadas para a construção dos <i>boxplots</i>	115
Figura 32 - Modelo de regressão linear a partir dos índices de diversidade empregados para Archaea versus temperatura ambiental. Os valores de R^2 e p estão destacados na figura.	117
Figura 33 - Dendrograma gerado através do índice de UNIFRAC quantitativo e clusterização pelo método UPGMA, para o Domínio Archaea.....	118
Figura 34 - PcoA construído a partir de matriz de distância contendo os índices de UNIFRAC para o Domínio Archaea. PC1: 39,53%, PC2: 24,15%.....	118
Figura 35 - Número de OTUs compartilhadas entre fumarolas e geleiras da Ilha <i>Deception</i> , para o Domínio Archaea.....	120
Figura 36 - Número de OTUs que compõem o microbioma central da Ilha <i>Deception</i> quanto ao Domínio Archaea. A abundância relativa das OTUs compartilhadas e sua classificação taxonômica estão destacadas na figura.....	121
Figura 37 - Diagrama de cordas exibindo a distribuição das 2 OTUs mais abundantes em cada amostra analisada, para o Domínio Archaea. As amostras foram agrupadas em triplicatas de coleta. As OTUs estão classificadas ao nível de Ordem.	122

Figura 38 - Análise de dbRDA relacionando os parâmetros ambientais com as OTUs de Bacteria com > 1% de abundância. Só foram exibidos os parâmetros ambientais que apresentaram valores significativos na análise de ANOVA ($p < 0,05$). dbRDA1: 49,2%; dbRDA2: 22,2%. OC: Carbono orgânico; OM: Matéria orgânica. 124

Figura 39 - Análise de dbRDA relacionando os parâmetros ambientais com as OTUs de Archaea com > 1% de abundância. Só foram exibidos os parâmetros ambientais que apresentaram valores significativos na análise de ANOVA ($p < 0,05$). dbRDA1: 40,3%; dbRDA2: 23,7%. OM: Matéria orgânica. 125

Figura 40 - Correlação de Pearson entre as OTUs de Bacteria mais abundantes (> 1%) e os parâmetros ambientais. As OTUs estão identificadas por Filo (Proteobacteria em Classe) e Gênero (as não classificadas em gênero, estão assinaladas em Família - F). Em preenchimento azul, estão destacadas as OTUs mais abundantes nas geleiras e, em laranja, as mais abundantes nas fumarolas. Temp: temperatura; EC: condutividade elétrica; OM: matéria orgânica; OC: carbono orgânico. 126

Figura 41 - Correlação de Pearson entre as OTUs de Archaea mais abundantes (> 1%) e os parâmetros ambientais. As OTUs estão identificadas por Gênero. Em preenchimento azul, estão destacadas as OTUs mais abundantes nas geleiras, em laranja, as mais abundantes nas fumarolas até 80 °C, e em vermelho, na fumarola de 98 °C. Temp: temperatura; EC: condutividade elétrica; OM: matéria orgânica; OC: carbono orgânico. 127

Figura 42 - Modelos de regressão linear entre os parâmetros temperatura, pH, amônia, nitrato, sódio e sulfato e o índice de diversidade Shannon, para o Domínio Bacteria. Os valores de p e R^2 estão descritos acima de cada modelo. 129

Figura 43 - Modelos de regressão linear entre os parâmetros temperatura, pH, amônia, nitrato, sódio e sulfato e o índice de diversidade Shannon, para o Domínio Archaea. Os valores de p e R^2 estão descritos acima de cada modelo. 130

Figura 44 - *Heatmap* exibindo os grupos taxonômicos do Domínio Bacteria (Filos) detectados através dos dados de Metagenoma *shotgun*, utilizando ferramentas do MG-RAST e banco de dados do M5NR. 134

Figura 45 - *Heatmap* exibindo os grupos taxonômicos do Domínio Archaea (Ordem) detectados através dos dados de Metagenoma *shotgun*, utilizando ferramentas do MG-RAST e banco de dados do M5NR. 136

Figura 46 - *Heatmap* exibindo os perfis funcionais das comunidades microbianas de *Deception*, detectados através dos dados de Metagenoma Funcional, utilizando ferramentas do MG-RAST e nível I do SEED *Subsystem*. 137

Figura 47 - Análise de componentes principais (PCA) através dos perfis funcionais das comunidades microbianas de *Deception*, detectados através dos dados de Metagenoma Funcional, utilizando ferramentas do MG-RAST e nível I do SEED *Subsystem*. PC1: 72,7%, PC2: 16%. 138

Figura 48 - Perfis funcionais das comunidades microbianas de <i>Deception</i> quanto ao metabolismo de DNA, nível II SEED <i>subsystems</i> . Foram selecionadas as funções mais relevantes para a discussão dos resultados e que apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos analisados.	139
Figura 49 - Perfis funcionais das comunidades microbianas de <i>Deception</i> quanto ao metabolismo energético, níveis II e III SEED <i>subsystems</i> . Foram selecionados as funções mais relevantes para a discussão dos resultados e que apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos analisados.	142
Figura 50 - Genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo e osmótico, detectados nas amostras de <i>Deception</i> através de ferramentas do MG-RAST e SEED <i>Subsystem</i> (níveis II e III). Foram selecionadas as funções mais relevantes para a discussão dos resultados.	147
Figura 51 - Genes relacionados à resposta à altas e baixas temperaturas ambientais, detectados nas amostras de <i>Deception</i> através de ferramentas do MG-RAST e SEED <i>Subsystem</i> (níveis II e III). Foram selecionadas as funções mais relevantes para a discussão dos resultados.	149
Figura 52 - Síntese dos principais resultados obtidos através das técnicas de qPCR, sequenciamento 16S e Metagenoma, para as amostras da fumarola de 98 °C.	150
Figura 53 - Síntese dos principais resultados obtidos através das técnicas de qPCR, sequenciamento 16S e Metagenoma, para as amostras das fumarolas de até 80 °C.....	151
Figura 54 - Síntese dos principais resultados obtidos através das técnicas de qPCR, sequenciamento 16S e Metagenoma, para as amostras das geleiras.....	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos extremófilos quanto aos parâmetros físico-químicos ambientais	34
Tabela 2 - Descrição das dezoito amostras coletadas na Ilha Deception durante a Operantar XXXII (2013-2014).	50
Tabela 3 - Condições meteorológicas e propriedades da água do mar superficial durante a coleta no sítio de <i>Fumarole Bay</i>	60
Tabela 4 - Valores obtidos através das análises físico-químicas dos sedimentos quanto aos micronutrientes, nas dezoito amostras coletadas nos sítios geotermiais da Ilha <i>Deception</i>	61
Tabela 5 - Valores obtidos através das análises físico-químicas do sedimento quanto aos compostos de nitrogênio, sulfato, matéria orgânica e carbono orgânico.	62
Tabela 6 - Valores obtidos através das análises físico-químicas do solo/sedimento quanto aos elementos P, Si, Na, K, Ca, Mg e Al, ao pH, condutividade elétrica, soma de bases trocáveis e capacidade de troca iônica.	63
Tabela 7 - Valores obtidos através das análises físico-químicas quanto à granulometria, umidade e densidade do sedimento.	64
Tabela 8 - Valores de DNA total extraído, purificado e concentrado 20X, quantificados por Qubit 1.0.	65
Tabela 9 - Número de células por grama de amostra ambiental estimado através de PCRq.	67
Tabela 10 - Resultados obtidos após a análise dos dados de sequenciamento do gene do rRNA 16S para Bacteria e Archaea, quanto ao número de reads totais, número de reads após o filtro de qualidade e número de OTUs, em cada amostra analisada.	72
Tabela 11 - Classificação taxonômica até gênero das 50 OTUs mais abundantes em <i>Deception</i>	81
Tabela 12 - Índices de riqueza e diversidade para Bacteria, calculados através das ferramentas do Qiime.	103
Tabela 13 - Resultado do teste de significância Adonis a partir dos valores de UNIFRAC quantitativo, calculado através de 999 permutações.	108

Tabela 14 - Índices de riqueza e diversidade para Archaea, calculados através das ferramentas do *Qiime*. 114

Tabela 15 - Resultado do teste de significância Adonis a partir dos valores de UNIFRAC quantitativo, calculado através de 999 permutações. 119

Tabela 16 - Resultados do Metagenoma shotgun quanto ao número de reads totais obtidos no sequenciamento pela plataforma Illumina HiSeq e número de reads após os filtros de qualidade. 132

Tabela 17 - Fatores ambientais que mostraram influenciar significativamente ($p < 0,05$) a composição e diversidade de bactérias e arqueias na Ilha *Deception*. 152

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Objetivos	24
1.1.1	<i>Objetivo Geral</i>	24
1.1.2	<i>Objetivos Específicos</i>	24
2	REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1	Ambientes geotermais como habitats microbianos	26
2.2	Ambientes geotermais antárticos	27
2.2.1	<i>Ilha Deception</i>	29
2.3	Ecossistemas antárticos e ecologia microbiana	30
2.3.1	<i>Ecologia microbiana em ecossistemas geotermais na Antártica</i>	32
2.4	Micro-organismos extremófilos	33
2.4.1	<i>Adaptações celulares e metabólicas de termófilos e hipertermófilos</i>	36
2.4.2	<i>Adaptações celulares e metabólicas de psicrófilos</i>	39
2.5	Métodos independentes de cultivo empregados no estudo das comunidades microbianas	43
2.5.1	<i>Técnicas baseadas na amplificação do gene do RNAr 16S</i>	43
2.5.2	<i>Metagenoma shotgun</i>	46
3	MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1	Coleta de amostras ambientais na Ilha <i>Deception</i> , Antártica	49
3.2	Análises físico-químicas do sedimento	52
3.3	Extração de DNA total	52
3.4	PCR em Tempo Real (PCR quantitativo)	52
3.5	Sequenciamento do gene do RNAr 16S por Illumina	53
3.6	Análise dos dados de sequenciamento do gene do rRNA 16S	56
3.7	Metagenoma <i>shotgun</i>	57
3.8	Análise dos dados de Metagenoma <i>shotgun</i>	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	Análises físico-químicas do sedimento	60
4.2	Extração de DNA total	64
4.3	PCR em tempo real (PCR quantitativo)	65

4.4	Sequenciamento do gene do RNAr 16S por Illumina	68
4.4.1	Preparo de bibliotecas do gene do RNAr 16S	69
4.4.2	Resultados gerais do sequenciamento Illumina MiSeq	71
4.4.3	Composição taxonômica das comunidades para o Domínio Bacteria	72
4.4.3.1	<i>Composição taxonômica da Ilha Deception</i>	72
4.4.3.2	<i>Filos distribuídos nas geleiras e fumarolas de Deception</i>	74
4.4.3.3	<i>Filos abundantes nas geleiras de Deception</i>	75
4.4.3.4	<i>Filos abundantes nas fumarolas de Deception</i>	78
4.4.3.5	<i>Classificação das sequências ao nível de gênero</i>	79
4.4.3.6	<i>Comparação entre Deception e outros ambientes geotermais</i>	84
4.4.4	Composição taxonômica das comunidades para o Domínio Archaea	86
4.4.4.1	<i>Composição taxonômica da Ilha Deception</i>	86
4.4.4.2	<i>Filos e Ordens abundantes nas geleiras de Deception</i>	90
4.4.4.3	<i>Filos e Ordens abundantes nas fumarolas de Deception</i>	91
4.4.4.4	<i>Classificação das sequências ao nível de gênero</i>	95
4.4.4.5	<i>Comparação entre Deception e outros ambientes geotermais</i>	98
4.4.5	Diversidade microbiana para o Domínio Bacteria	101
4.4.5.1	<i>Riqueza e alfa diversidade</i>	101
4.4.5.2	<i>Beta diversidade</i>	106
4.4.6	Diversidade microbiana para o Domínio Archaea	112
4.4.6.1	<i>Riqueza e alfa diversidade</i>	112
4.4.6.2	<i>Beta diversidade</i>	117
4.4.7	Correlação da composição e diversidade microbiana com os parâmetros ambientais	123
4.5	Metagenoma shotgun	131
4.5.1	Resultados gerais do sequenciamento	131
4.5.2	Classificação taxonômica dos genes funcionais	132
4.5.3	Classificação dos genes funcionais	136
4.5.3.1	<i>Metabolismo de DNA</i>	138
4.5.3.2	<i>Metabolismo energético</i>	141
4.5.3.3	<i>Genes relacionados a resposta ao estresse ambiental</i>	145
4.6	Síntese dos resultados e perspectivas no estudo das comunidades microbianas de Deception	150
5	CONCLUSÕES	154
5.1	Parâmetros ambientais	154

5.2	Abundância de bactérias e arqueias na Ilha <i>Deception</i>.....	154
5.3	Composição taxonômica das comunidades microbianas em <i>Deception</i>	155
5.4	Diversidade das comunidades microbianas em <i>Deception</i>.....	156
5.5	Influência dos parâmetros ambientais nas composição e diversidade das comunidades microbianas	156
5.6	Respostas metabólicas e adaptativas das comunidades microbianas ao longo dos gradientes de temperatura	157
REFERÊNCIAS¹		159

1 INTRODUÇÃO

Vulcões ativos na Antártica contrastam com a paisagem predominantemente gelada do continente. Eles fornecem condições únicas capazes de selecionar uma grande variedade de adaptações microbianas, especialmente relacionadas à temperatura e fontes de energia geoquímica. Esses *habitats* são regiões únicas na Terra onde psicrófilos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos coexistem e interagem no mesmo ambiente devido às variações pronunciadas de temperatura. Micro-organismos que habitam vulcões polares têm desafiado o nosso entendimento sobre os limites físicos e químicos da vida e estimulam novas teorias a respeito de sua origem e evolução na Terra, e também, sobre a sua possibilidade de existência em ambientes extraterrestres.

O continente Antártico apresenta características singulares devido à suas condições ambientais severas e seu isolamento dos demais continentes desde o Gondwana há 84 milhões de anos. Devido a este isolamento e as pressões de seleção evolutiva, pesquisadores sugerem que *habitats* antárticos podem hospedar micro-organismos ancestrais e endêmicos. As atividades vulcânicas na Antártica foram um fenômeno constante durante a Era Cenozóica. Atualmente, as zonas geotermicamente ativas localizam-se no continente antártico em três sítios (Monte *Erebus*, Monte *Melbourne* e Monte *Rittmann*) e nas elevações no Estreito de *Bransfield*, especialmente na Ilha *Deception* (Península Antártica).

A Ilha *Deception* difere-se dos sítios geotermiais localizados no continente antártico por sua influência marinha e temperaturas mais elevadas. Enquanto as temperaturas detectadas nos sítios do continente não ultrapassam 65 °C na superfície, nas fumarolas de *Deception* esses valores atingem aproximadamente 100 °C. Ainda, a Ilha foi remodelada pela interação entre gelo, mar e atividade vulcânica, tornando *Deception* um ambiente único na Antártica.

Contrastando com os ambientes termiais, metade da Ilha *Deception* é coberta por geleiras, com temperaturas abaixo do ponto de congelamento, produzindo um gradiente acentuado de temperatura em distâncias muito próximas. Da mesma forma, um gradiente geoquímico é criado devido às emissões constantes de gás sulfídrico, dióxido de carbono e outros compostos vulcânicos. Esses gradientes geram um mosaico de condições ambientais e oportunidades para o crescimento de micro-organismos metabolicamente diversos.

O gradiente ambiental acentuado faz de *Deception* um ambiente único para o estudo dos mecanismos evolutivos e das adaptações microbianas aos extremos ambientais.

Condições extremas de temperatura, salinidade, dessecação e pH desfazem as interações cruciais que mantêm as biomoléculas funcionalmente ativas, destruindo assim, a integridade celular. Contudo, descobertas das últimas décadas mostraram que a vida não é tão sensível como se havia imaginado, e os limites da vida na Terra ainda estão longe de serem definidos. Uma variedade de micro-organismos tem mostrado que podem não só tolerar essas condições extremas, mas as requerem para sobreviver.

Micro-organismos extremófilos, principalmente psicrófilos, já foram amplamente detectados na Antártica, nos mais variados *habitats*, como solo, sedimento, neve e gelo, em virtude de suas adaptações à baixas temperaturas. Os termófilos estão distribuídos principalmente associados aos sítios geotermiais, embora alguns trabalhos os tenha detectado de maneira inativa em solos congelados. Os hipertermófilos são muito raros e foram encontrados até o momento somente na Ilha *Deception*. As respostas fisiológicas, ecológicas e evolutivas desses extremófilos frente às variações ambientais acentuadas, típicas dos vulcões polares, ainda não são totalmente compreendidas.

A diversidade taxonômica e funcional de comunidades microbianas tem sido explorada em uma grande variedade de ambientes antárticos. Contudo, estudos relacionados à diversidade microbiana em sistemas geotermiais antárticos ainda são muito escassos, sobretudo em virtude da complexidade logística de se coletar essas amostras. Ainda, os trabalhos realizados em *Deception*, envolveram essencialmente o uso de técnicas dependentes de cultivo, limitadas para avaliar a diversidade microbiana, principalmente devido à dificuldade em reproduzir a complexidade geoquímica ambiental nos meios de cultura.

O avanço das tecnologias de sequenciamento em larga escala possibilitou o desenvolvimento de métodos independentes de cultivo capazes de revelar uma diversidade microbiana mais fidedigna à encontrada no ambiente. Esses métodos se baseiam tanto na amplificação de genes alvo, como o sequenciamento do gene do RNAr 16S, quanto na fragmentação do DNA total das comunidades, técnica denominada Metagenoma. No primeiro caso é avaliado a diversidade taxonômica e filogenética das comunidades microbianas, e no segundo, a diversidade funcional, incluindo o potencial metabólico e adaptativo. O sequenciamento do gene do RNAr 16S e o Metagenoma são técnicas independentes de cultivo complementares que permitem compreender quais micro-organismos estão presentes no ambiente, como eles respondem às variações ambientais e como interagem entre si e com o ambiente.

O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade taxonômica e funcional das comunidades microbianas que habitam fumarolas e geleiras da Ilha *Deception*, Antártica. A diversidade taxonômica consistiu em avaliar a composição e alfa e beta diversidade das comunidades de *Deception*. A diversidade funcional avaliou os genes funcionais relacionados ao metabolismo e resposta ao estresse ambiental. Foram verificados quais parâmetros ambientais possivelmente influenciam a composição e diversidade das comunidades microbianas, como temperatura, pH, micronutrientes, diferentes metais, matéria e carbono orgânico, sulfato (SO_4^{2-}), nitrogênio total (N), nitrato (NO_3^-) e amônia (NH_3). Este trabalho forneceu informações inéditas sobre a diversidade e potencial adaptativo de micro-organismos em ambientes geotermiais antárticos, bem como dos processos ambientais e ecológicos que os moldam.

Este trabalho foi desenvolvido dentro dos projetos “INCT-CRIOSFERA” (PROANTAR-CNPq Proc. 028306/2009), coordenado pelo Dr. Jefferson Caria Simões, e “Registro paleoclimático da transição (*greenhouse-icehouse*) Eoceno-Oligoceno na Antártica Ocidental” (PROANTAR-CNPq Proc. 55036/2009-7), coordenado pelo Dr. Antônio Carlos Rocha Campos, ambos apoiados pelo Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo entender como as comunidades microbianas em geleiras e fumarolas da Ilha *Deception* respondem às variações extremas ambientais de temperatura e composição geoquímica, sobretudo quanto a sua diversidade taxonômica e seu potencial metabólico e adaptativo.

1.1.2 Objetivos Específicos

Este trabalho visou responder as seguintes perguntas:

- (i) Como os parâmetros físico-químicos se distribuem ao longo do gradiente de temperatura? É possível detectar diferentes composições físico-químicas entre fumarolas e geleiras?

- (ii) Qual a abundância de arqueias e bactérias nos sedimentos associados a fumarolas e a geleiras na Ilha *Deception*? A abundância desses micro-organismos difere em relação aos gradientes ambientais?
- (iii) Qual é a composição taxonômica das comunidades de arqueias e bactérias nas amostras analisadas? Quais grupos são prevalentes nas geleiras e quais nas fumarolas? Quais estão distribuídos ao longo de todo o gradiente ambiental?
- (iv) A composição taxonômica de arqueias e bactérias em *Deception* se assemelha a que outros ambientes geotermiais?
- (v) A diversidade taxonômica (riqueza e alfa e beta diversidade) de bactérias e arqueias difere ao longo dos gradientes ambientais?
- (vi) Quais os principais fatores ambientais que influenciam a composição e diversidade taxonômica das comunidades microbianas?
- (vii) Quais são as respostas metabólicas e adaptativas das comunidades microbianas ao longo dos gradientes de temperatura?

Os objetivos foram alcançados através do uso de métodos de ecologia molecular baseados na extração do DNA total das amostras, amplificação de parte do gene RNAr 16S (Domínios Bacteria e Archaea), PCR quantitativo (PCRq), sequenciamento de nova geração do gene do RNAr 16S (Bacteria e Archaea) e Metagenoma *shotgun*, através das plataformas Illumina MiSeq e HiSeq, respectivamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ambientes geotermiais como *habitats* microbianos

A atividade geotermal é causada pela transferência de calor do interior da Terra em direção à superfície e pode se manifestar de diversas formas, principalmente através da atividade vulcânica. Os ambientes de origem vulcânica são amplamente distribuídos na Terra, mas são concentrados em áreas com alta atividade tectônica resultantes do grande movimento da crosta terrestre. Esses locais incluem Japão, Islândia, Itália, Rússia, Nova Zelândia, região central da América do Norte, costa oeste da América do Sul e Antártica (BOOTHROYD, 2009). Estes vulcões ativos oferecem condições únicas de gradientes geoquímicos e de temperatura que favorecem o crescimento de micro-organismos extremófilos metabolicamente diversos (WARD; CASTENHOLZ, 2000).

Os sítios geotermiais são formados quando materiais magmáticos profundos são forçados em direção à superfície terrestre, aquecendo a água de sub-superfície a temperaturas que podem atingir valores acima do ponto de ebulição. Quando a água atinge temperaturas suficientemente altas, a pressão litostática força sua saída através de poros e fissuras, produzindo solos geotermiais, fumarolas, ventos hidrotermais, *hot springs* ou gêiseres, dependendo do abastecimento de água. Este processo faz com que minerais oriundos de regiões profundas sejam dissolvidos e depositados na superfície terrestre, resultando na mineralização e alteração da composição geoquímica do solo ou sedimentos associados a essas fontes geotermiais (VICKERS, 2012). A deposição desses compostos favorece o crescimento de micro-organismos capazes de metabolizá-los, principalmente quimiolitotróficos. Esses micro-organismos se adaptaram a oxidar ou reduzir compostos de enxofre, manganês e ferro para obter energia e fixar CO₂ para produzir suas moléculas orgânicas, propiciando assim seu crescimento nesses ambientes que são muitas vezes oligotróficos (KING, 2007).

Os ambientes termais (temperaturas acima de 60 °C) são colonizados exclusivamente por micro-organismos, uma vez que até o momento não foi detectado nenhum eucarioto capaz de sobreviver a essas condições (WARD; CASTENHOLZ, 2000). Embora os sítios geotermiais sejam distribuídos globalmente, eles são descontínuos e distantes, e os micro-organismos adaptados às altas temperaturas que os colonizam precisam vencer uma série de barreiras físicas e geográficas durante sua dispersão. Por

esse motivo, muitos trabalhos são realizados em ambientes geotermiais para avaliar os aspectos evolutivos e biogeográficos dos micro-organismos endêmicos desses ecossistemas (BROCK, 2012).

A distribuição dos micro-organismos nos ambientes geotermiais está relacionada diretamente com os parâmetros físico-químicos, como temperatura, pH, salinidade, radiação e pressão. Nesses ambientes, os micro-organismos muitas vezes precisam lidar com vários parâmetros extremos ao mesmo tempo, e por esse motivo exibem uma alta versatilidade metabólica (KING, 2007).

Os *habitats* microbianos termais estão distribuídos tanto em regiões de continente, como *hot springs* e gêiseres, quanto no oceano raso (fumarolas) e profundo (fumarolas, ventos hidrotermais). Apesar de terem a característica de altas temperaturas em comum, esses ambientes exibem condições ambientais extremamente distintas, que irão selecionar uma variedade de grupos termófilos ou hipertermófilos filogeneticamente e funcionalmente distintos (BROCK, 2012; MADIGAN et al., 2016; SHARP et al., 2014).

2.2 Ambientes geotermiais antárticos

Ambientes geotermiais na Antártica consistem tipicamente em sedimentos e solos minerais aquecidos pelo calor emitido por fumarolas e/ou fissuras, e são exclusivamente associados a vulcões geologicamente ativos. A maior parte dos vulcões na Antártica não mostram sinais de atividade vulcânica, e somente quatro exibem *habitats* geotermiais ativos. Destes, três estão localizados no continente, em *Victoria Land* (Montes *Erebus*, *Melbourne* e *Rittmann*) e um nas Ilhas *Shetland* do Sul, na Península Antártica (Ilha *Deception*) (HERBOLD et al., 2014) (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição dos vulcões ativos (vermelho) e inativos (verde) do continente e da Península Antártica. Adaptado de Herbold et al., 2014.

O Monte *Erebus* é um estratovulcão localizado na Ilha de *Ross*, a oeste do Mar de *Ross* e está a 3.794 m de altitude. É o vulcão mais austral da Terra, possui um lago de lava fonolítico (rochas raras formadas a partir do resfriamento e cristalização do magma) convectivo e apresenta erupções estrombolianas diariamente. A atividade geotermal é resultado dos processos de rifteamento, que ocasionam o aquecimento do gelo, criando dinâmicas cavernas, chaminés e torres. O principal gás emanado pelas fumarolas do Monte *Erebus* é CO₂, a temperatura atinge 65 °C na superfície e o pH varia do neutro ao levemente alcalino (KYLE et al., 1992).

O Monte *Melbourne* é também um estratovulcão, localizado na região norte de *Victoria Land* e está a 2.732 m de altitude. Da mesma forma que o Monte *Erebus*, a origem da atividade geotermal do Monte *Melbourne* é pela localização na região de rifte. Evidências sugerem que a última erupção ocorreu há 200 anos atrás. As condições de temperatura são semelhantes ao Monte *Erebus*, atingindo no máximo 65 °C na superfície e os valores de pH mensurados foram em torno de 5.0 (NATHAN; SHULTE, 1967).

O Monte *Rittmann* está localizado a 100 km do Monte *Melbourne*, a 2.600 m de altitude e foi o mais recentemente descoberto (ARMIENTI; TRIPODO, 1991). Extensas emissões de fumarolas são observadas na região do Monte *Rittmann*, indicando sua atividade. A origem para esta atividade geotermal é provavelmente também devido aos processos de rifteamento, embora pouco ainda se saiba sobre as características desse vulcão. As temperaturas na superfície atingem 40 °C e cerca de 60 °C a 10 cm de profundidade. Os valores de pH relatados atingem também em torno de 5.0 (BARGAGLI et al., 1996; HERBOLD et al., 2014).

2.2.1 Ilha Deception

A Ilha *Deception* (62°58'S, 60°39'W) é um estratovulcão complexo em forma de ferradura, cuja parte central sofreu um processo de colapso durante uma erupção há aproximadamente 10.000 anos atrás, dando origem a caldeira denominada baía de *Port Foster*, que possui aproximadamente 9 km de diâmetro (Figura 2). *Deception* é o único local do planeta onde é possível entrar de navio em sua caldeira inundada pelo mar (BARBAGLI et al., 1996).

Esta ilha vulcânica polar é um ambiente interessante e singular: por um lado, apresenta atividade geotermal contínua, como é visível através da emissão gasosa constante das fumarolas, que podem atingir até 100 °C de temperatura na superfície; e por outro lado, 60% da ilha é coberta por geleiras, com temperatura do solo abaixo do ponto de congelamento (AMENÁBAR et al., 2013). Ainda, um gradiente geoquímico proeminente é produzido pelas emissões contínuas dos gases vulcânicos, principalmente CO₂ e H₂S. Esses gradientes ambientais em distâncias muito próximas criam um mosaico de condições ambientais e oportunidades para a colonização de micro-organismos muito diversos (HERBOLD et al., 2014; VILA et al., 1992). A Ilha *Deception* difere de todos os outros vulcões da Antártica devido à sua influência marinha e temperaturas mais elevadas (os vulcões do continente atingem até cerca de 65 °C). Ainda, as fumarolas de *Deception* encontram-se ao nível do mar, enquanto as do continente estão a mais de 2.000 m de altitude (COWAN, 2014).

As anomalias geotermais são encontradas principalmente em *Fumarole Bay*, *Whalers Bay* e *Pendulum Cove*, e foram originadas provavelmente durante as últimas erupções entre 1967 e 1970 (HERBOLD et al., 2014). As fumarolas estão distribuídas tanto em regiões submersas, quanto em regiões parcialmente submersas, em uma zona de entremarés. A temperatura do sedimento associado às fumarolas é bastante variável, alcançando valores entre 40-60 °C em *Whalers Bay*, 70 °C em *Pendulum Cove* e de 80-100 °C em *Fumarole Bay* (BLANCO et al., 2012) (Figura 2). A composição química das emanações também varia de acordo com a sua localização: em *Whalers Bay* e *Pendulum Cove* as emanações são compostas especialmente por CO₂, enquanto em *Fumarole Bay* há uma alta concentração de H₂S (AMENÁBAR et al., 2013).

Figura 2 - Visão geral (B) e mapa da Ilha *Deception*, Ilhas Shetland do Sul, Antártica, e suas zonas geotermicamente ativas (A). As setas vermelhas indicam a localização aproximada dos sítios de estudo deste trabalho. Fonte: Adaptado de Caselli et al., 2002.

2.3 Ecossistemas antárticos e ecologia microbiana

A gama de condições extremas presentes no continente antártico torna-o um dos locais mais inóspitos da Terra. Nos ecossistemas antárticos podem ocorrer grandes variações de temperatura e salinidade, dessecação, escassez de nutrientes, alta incidência de radiação ultravioleta, longos períodos de ausência de luz, além dos ciclos de congelamento e degelo. Além disso, a Antártica é isolada dos demais continentes principalmente pela Zona de Convergência Antártica, que atua como uma barreira geográfica e climática, que pode favorecer o surgimento de espécies endêmicas no continente (COWAN; TOW, 2004; WYNN-WILLIAMS, 1996).

Devido as condições inóspitas, grande parte dos ecossistemas da Antártica são colonizados exclusivamente por micro-organismos que, por este motivo, exibem um papel fundamental nas cadeias tróficas e nos ciclos biogeoquímicos. Os ecossistemas na Antártica são muito diversos, e podem incluir solos mineirais e ornitogênicos, solos e sedimentos aquecidos geotermicamente, como os encontrados em *Deception*, lagos continentais de salinidade variada, cobertos perenemente ou sazonalmente por gelo, sistemas endolíticos, solos permanentemente congelados (*permafrost*), geleiras e ecossistemas marinhos, bentônicos e pelágicos (CAVICCHIOLI, 2015; WYNN-WILLIAMS, 1996).

A composição microbiana nesses ecossistemas pode ser influenciada por uma série de fatores, como temperatura, salinidade, disponibilidade de nutrientes, luminosidade e características geoquímicas do solo, sedimento, água, neve ou gelo (WYNN-WILLIAMS, 1996). Ao fornecer energia potencial para o crescimento microbiano, a luz solar influencia os padrões de crescimento diário e sazonal dos fototróficos e as respostas associadas dos heterótrofos envolvidos na remineralização da matéria orgânica. Por outro lado, a baixa luminosidade ou temperaturas muito elevadas (acima de 80 °C), como no caso dos ecossistemas geotermais, favorecem o metabolismo quimiolitotrófico. A disponibilidade de nutrientes e minerais, como proporções relativas de ferro, silicato, nitrogênio, sulfato ou fósforo biodisponível, exerce um grande efeito na composição das comunidades. Ainda, muitos trabalhos já demonstraram que a temperatura é um dos fatores mais relevantes para selecionar a composição e os processos realizados pelos micro-organismos (BOETIUS et al., 2015; CAVICCHIOLI, 2015).

Desse modo, a composição microbiana irá depender diretamente das diferentes condições ambientais que caracterizam cada ecossistema antártico. Por exemplo, alguns trabalhos indicam que em amostras de neve da Antártica os grupos mais abundantes detectados são Alphaproteobacteria, Flavobacteria e Cyanobacteria (BOETIUS et al., 2015). Para ecossistemas subglaciais, como em sedimentos do Lago *Whillans*, Betaproteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes são os mais abundantes (CHRISTNER et al., 2014). No gelo marinho, Flavobacteria, Gammaproteobacteria e Alphaproteobacteria prevalecem (COWIE, 2011). Contudo, mesmo ecossistemas antárticos semelhantes podem ainda abrigar uma composição microbiana consideravelmente heterogênea entre si. Portanto, os fatores que influenciam a diversidade microbiana nesses ecossistemas ainda estão longe de serem definidos (BOETIUS et al., 2015)

Trabalhos recentes envolvendo técnicas independentes de cultivo sugerem que a diversidade microbiana na Antártica é muito maior do que se havia imaginado quando as técnicas de cultivo eram empregadas para o estudo da ecologia microbiana. Contudo, grande parte da diversidade microbiana descrita está relacionada ao Domínio Bacteria, e ainda pouco se sabe sobre a diversidade de arqueias na Antártica (COWAN, 2014). Ainda, novos avanços vêm identificando não só a composição das comunidades microbianas, mas também suas funções e interações nos ecossistemas antárticos e suas respostas frente às variações extremas ambientais (CAVICCHIOLI, 2015; CHOWN et al., 2015).

2.3.1 Ecologia microbiana em ecossistemas geotermiais na Antártica

Até o momento, somente cinco trabalhos relataram a ecologia microbiana nos ecossistemas geotermiais da Antártica utilizando métodos independentes de cultivo. Contudo, a comparação destes trabalhos torna-se limitada devido às diferentes técnicas moleculares empregadas. Apesar destas diferenças, todos estes estudos concordam que a diversidade microbiana nos ambientes geotermiais é bem mais diversa do que os métodos dependentes de cultivo demonstravam (HERBOLD et al., 2014).

Dentro estes estudos, três foram realizados sobre as comunidades do Monte *Erebus*. Soo et al., (2009) construíram bibliotecas do gene do RNAr 16S e sequenciaram pelo método de Sanger amostras associadas a solos geotermiais na região de *Tramway Ridge* (Monte *Erebus*), detectando os Filos Cyanobacteria, Planctomycetes, Acidobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Deinococcus/Thermus, OP10 e Chloroflexi. Herbold et al., (2014) utilizaram a técnica de pirosequenciamento do gene do RNAr 16S em amostras de solos associados a fumarolas na região do Monte *Erebus* e detectaram os Filos Bacteroidetes, Cyanobacteria, Meiothermus, Chloroflexi, Chlorobi, Acidobacteria, Armatimonadetes, Actinobacteria, Thermus, Planctomycetes e arqueias relacionadas ao Filo Thaumarchaeota. Vickers (2012) empregou também pirosequenciamento em amostras de solos termais do Monte *Erebus* e detectou os mesmos grupos descritos acima, incluindo ainda os Filos TW1, TW2 e Nitrospirae.

Os outros dois estudos foram realizados nas fumarolas de *Fumarole Bay* em *Deception* (AMENÁBAR et al., 2013; MUÑOZ et al., 2011) e ambos empregaram as técnicas de DGGE e sequenciamento Sanger das bandas detectadas. Muñoz et al., (2011) observaram principalmente membros relacionados a Firmicutes e Thermus/Deinococcus, dos gêneros *Geobacillus*, *Brevibacillus*, *Bacillus* e *Thermus*. Amenábar et al., (2013) buscaram através desta técnica detectar membros do Domínio Archaea, e encontraram os gêneros hipertermófilos *Thermococcus*, *Methanococcoides* e membros de Crenarchaeota não classificados. O trabalho de Amenábar et al., (2013) foi o primeiro a detectar arqueias hipertermófilas na Antártica. É provável que os resultados obtidos com o método de DGGE não correspondam com a diversidade microbiana presente em *Deception*, uma vez que nos sítios geotermiais do continente, a diversidade mostrou-se muito maior ao empregar outras técnicas, como o pirosequenciamento.

Desse modo, o presente trabalho é o primeiro a utilizar métodos de sequenciamento de nova geração para acessar a diversidade taxonômica e funcional das comunidades microbianas nos sítios geotermiais de *Deception*.

2.4 Micro-organismos extremófilos

Ao longo das últimas décadas, a descoberta de micro-organismos habitando os ambientes mais extremos do planeta tem intrigado a comunidade científica. Tais organismos, denominados extremófilos, sobrevivem em condições hostis e letais para qualquer outro tipo de vida no planeta (ROTHSCHILD; MANCINELLI, 2001). Os extremófilos são capazes de colonizar *habitats* termais, gelados, hipersalinos, secos, ácidos e alcalinos, dentre outros ambientes que eram previamente considerados inóspitos para a vida. Estes micro-organismos já foram detectados em regiões que vão desde oceanos a 10 km de profundidade – em pressões próximas a 100 MPa – até a alta atmosfera, a 10 km de altitude (CANGANELLA; WIEGEL, 2011). Foram encontrados em ambientes de pH extremamente ácido (pH 0) ou básico (pH 12.8), em ventos hidrotermais a 122 °C e no gelo marinho, a -20 °C. Para cada condição extrema investigada, uma variedade de micro-organismos tem mostrado não só tolerá-las, mas frequentemente requerí-las para sua sobrevivência (HORIKOSHI et al., 2010).

Os extremófilos são classificados de acordo com as condições as quais habitam: termófilos ou hipertermófilos (organismos que crescem em temperaturas altas ou muito altas, respectivamente), psicrófilos (requerem baixas temperaturas para seu crescimento), acidófilos ou alcalófilos (crescem em ambientes ácidos ou básicos, respectivamente), barófilos ou piezófilos (crescem sob alta pressão), halófilos (requerem altas concentrações de sais) e radioresistentes (capazes de resistir a altas doses de radiação ionizante). Ainda podem oligotróficos (requerem baixas concentrações de nutrientes) e xerófilos (resistir à baixa disponibilidade de água) (Tabela 1). Estes organismos podem ser também poliextremófilos, estando adaptados a sobreviver em *habitats* com mais de um parâmetro físico-químico extremo. Por exemplo, muitas fumarolas que são quentes e ácidas ou alcalinas, ou ambientes de oceano profundo que são gelados, oligotróficos e expostos a alta pressão (DUARTE, 2010; ROTHSCHILD; MANCINELLI, 2001).

Tabela 1 - Classificação dos extremófilos quanto aos parâmetros físico-químicos ambientais. Adaptado de Rothschild e Mancinelli (2001).

Parâmetro	Extremófilo	Limites de crescimento	Exemplos
Temperatura	Hipertermófilo	> 85 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i> (113 °C)
	Termófilo	45 ~ 85 °C	<i>Aquifex</i> sp.
	Psicrófilo	< 15 °C	<i>Psychrobacter</i> sp.
	Psicrotrófico	< 15 °C (ótimo: 20 °C)	<i>Exiguobacterium antarcticum</i>
pH	Acidófilo	pH < 5	<i>Cyanadium caldarium</i> (pH 0)
	Alcalinófilo	pH > 8	<i>Bacillus firmus</i>
Salinidade	Halófilo	2 ~ 5 M NaCl	Família Halobacteriaceae
Pressão	Piezofílico	> 400 atm	<i>Shewanella oneidensis</i>
Dessecação	Xerófilo	aw < 0.8	<i>Trichosporonoides nigrescens</i>
Radiação	Radiotolerante	Até 60 Gy/hora	<i>Deinococcus radiodurans</i>
Oxigênio	Anaeróbico	Sem O ₂	<i>Methanococcus jannaschii</i>
	Microaerófilo	Níveis baixos de O ₂	<i>Clostridium</i> sp.
Nutrientes	Oligotrófico	Crescimento em habitats depletados de nutrientes	<i>Nitrosopumilus</i>

*aw: atividade da água

Os extremófilos podem ser divididos em duas categorias mais amplas: organismos extremofílicos, que requerem uma ou mais condição ambiental para seu crescimento, e organismos extremotolerantes, que podem tolerar condições extremas, mas crescem de forma ótima em condições mesofílicas (“normais”) (CAVICCHIOLI et al., 2002).

Os extremófilos incluem principalmente organismos procariontes (Bactéria e Archaea), embora alguns micro-organismos eucariontes (microalgas, fungos e protozoários) apresentem também adaptações a algumas condições ambientais extremas. Ainda, o principal grupo de extremófilos é composto por membros do Domínio Archaea. Embora membros desse grupo sejam comumente menos versáteis que as bactérias, eles são os recordistas em extremofilia. Os organismos mais hipertermófilos, acidófilos, alcalófilos e halofílicos conhecidos fazem parte do Domínio Archaea. Por exemplo, a arqueia *Methanopyrus kandleri* cresce a 122 °C, máxima temperatura detectada que um organismo é capaz de sobreviver, e o gênero *Picrophilus*, que inclui o organismo mais acidófilo conhecido (cresce em pH 0.06) (HORIKOSHI et al., 2010; ROTHSCILD; MANCINELLI, 2001). Na Figura 3 estão descritas as temperaturas ótimas e pH mínimos

requeridos para o crescimento de bactérias e arqueias termofílicas. Nota-se que as arqueias exibem os valores mais baixos de pH e os mais altos de temperatura.

Figura 3 - Temperaturas ótimas e pH mínimos requeridos para o crescimento de bactérias e arqueias termofílicas. Adaptado de Valentine (2007).

De modo geral, a diversidade filogenética de extremófilos é consideravelmente complexa. Algumas Ordens e Gêneros contêm somente extremófilos, enquanto outras contêm tanto extremófilos quanto mesófilos. Extremófilos adaptados a uma mesma condição muitas vezes estão amplamente dispersos na árvore filogenética, indicando mecanismos de evolução convergente em suas adaptações. Há também grupos de organismos que pertencem a uma mesma Família filogenética, que se adaptaram a diversas condições extremas (RAMPELOTTO, 2013).

A pesquisa com extremófilos permite também a compreensão dos limites da vida dentro do nosso planeta. Muitos desses estudos são abordados dentro do campo multidisciplinar da Astrobiologia - o estudo da origem, evolução, distribuição e futuro da vida no universo - visto que a história da vida na Terra se desdobrou conjuntamente com a evolução do clima e geoquímica do planeta em si. Relacionando os limites e a distribuição da vida na Terra podemos também vislumbrar seus limites fora dela (DES MARAIS et al., 2008).

Como o foco deste trabalho envolveu analisar as respostas das comunidades microbianas à atividade vulcânica em uma região polar, serão discutidos em mais detalhes as adaptações microbianas em relação à temperatura, e os metabolismos alternativos que esses micro-organismos são capazes de realizar.

2.4.1 Adaptações celulares e metabólicas de termófilos e hipertermófilos

Os micro-organismos termófilos e hipertermófilos formam grupos basais na árvore filogenética. Os membros localizados em ramos curtos e profundos exibem as mais altas temperaturas de crescimento. Dentro de Bacteria, *Aquifex pyrophilus* e *Thermotoga marítima* exibem as mais altas temperaturas de crescimento, entre 95 e 90 °C, respectivamente. Dentro de Archaea, os organismos recordistas quanto às altas temperaturas são encontrados nos Filos Crenarchaeota, que em sua maioria metabolizam enxofre, e Euryarchaeota, principalmente metanogênicos. Eles são membros de gêneros como *Pyrolobus*, *Pyrodictium*, *Hyperthermus*, *Aeropyrum*, *Pyrobaculum*, *Igneococcus* e *Stetteria* (Crenarchaeota), e *Methanopyrus* e *Pyrococcus* (Euryarchaeota) (STETTER, 2013).

As altas temperaturas afetam a estrutura e função das células microbianas, tanto fisicamente quanto quimicamente. Os efeitos físicos são principalmente alterações na fluidez da membrana, nas taxas de difusão, no enovelamento e estabilidade proteica e na estabilidade genômica. Os efeitos químicos basicamente alteram as taxas de reações químicas nas células. Os termófilos e hipertermófilos possuem uma série de adaptações celulares e moleculares para suportar estes efeitos, que são letais para a maioria dos organismos (STETTER, 1999).

Os lipídeos das arqueias, incluindo as mesófilas, são compostos por glicerol-1-fosfato, ligações éter e cadeia isoprenoide de hidrocarbonetos, ao passo que os lipídeos das bactérias são formados por glicerol-3-fosfato, ligações éster e cadeias de ácidos graxos. A composição dos lipídeos das arqueias por si só já confere uma maior estabilidade a altas temperaturas. Ainda, as arqueias possuem uma monocamada lipídica que torna a membrana muito mais rígida em comparação com a bicamada lipídica das bactérias. Contudo, as bactérias termofílicas exibem modificações em sua membrana que permitem a sua estabilidade em altas temperaturas. Os lipídios de membrana da bactéria hipertermófila *Thermotoga matitima* contêm lipídeos do tipo glicerol éter (ácido 15,16-dimethyl-30-glyceryloxy-triacontanedioico), que aumentam significativamente a estabilidade da membrana frente os efeitos de hidrólise causados pelas altas temperaturas. Os termófilos e hipertermófilos também possuem mais saturações em seus ácidos graxos, resultando numa maior rigidez e estabilidade da membrana plasmática (ALBERS et al., 2000).

As altas temperaturas também afetam diretamente a molécula de DNA, rompendo as pontes de hidrogênio e o desnaturando. A resistência termal da dupla fita de DNA em arqueias hipertermófilas é aperfeiçoada pela enzima girase reversa, um tipo único de Topoisomerase I que causa um superenovelamento positivo no DNA, aumentando consideravelmente sua estabilidade. Ainda, as arqueias hipertermófilas possuem proteínas relacionadas filogeneticamente às histonas dos eucariotos, que auxiliam a manter a estrutura do DNA estável em altas temperaturas. Da mesma forma, as moléculas de RNA também são afetadas com as altas temperaturas. Os termófilos e hipertermófilos estabilizam as estruturas secundárias do RNA aumentando o conteúdo GC e adicionando modificações pós transcricionais (STETTER, 1999).

As altas temperaturas também provocam a deaminação nucleotídica no DNA, que se não reparada, ocasiona a incorporação errada de nucleotídeos durante a replicação, resultando em mutações no DNA que podem ser letais aos micro-organismos. As arqueias hipertermófilas não apresentam taxas altas de mutação, o que indica que adquiriram um sistema de reparo extremamente eficiente capaz de conter os efeitos danosos das altas taxas de deaminação causadas pelas temperaturas elevadas (GRASSO; TELL, 2014; GROGAN, 2015).

A transferência horizontal de genes (THG) parece também exibir um papel importante na adaptação microbiana a altas temperaturas, podendo funcionar como um mecanismo relacionado ao reparo de danos no DNA. Através da THG os organismos são capazes de obter novos genes que podem auxiliar sua sobrevivência em condições extremas. A conjugação e a transdução são os principais mecanismos de transferência de genes em termófilos e hipertermófilos. A transformação é rara, uma vez que fragmentos de DNA fora da célula em sistemas termais são imediatamente degradados pelas altas temperaturas. Os mecanismos de THG são principalmente comuns em arqueias hipertermófilas (VAN WOLFEREN et al., 2013).

As altas temperaturas também provocam desestabilidade das estruturas protéicas das células. As proteínas termofílicas e hipertermofílicas possuem algumas estratégias que evitam a sua desnaturação nessas condições. Uma das estratégias é a presença de resíduos hidrofóbicos no interior de suas estruturas, que promovem sua estabilidade térmica pela interação formada entre esses resíduos no *core* da proteína (DONG et al., 2008). O estudo desenvolvido por Dong et al., (2008) mostraram que ao remover poucos resíduos hidrofóbicos do *core* de uma ribonuclease de *Thermococcus kodakaraensis*, as taxas de desnaturação da proteína aumentaram significativamente. Outra estratégia que

aumenta a estabilidade protéica é a presença de pontes de sais no interior da estrutura protéica. As pontes de sais são uma combinação de duas interações não covalentes: pontes de hidrogênio e interações eletroestáticas. Essas interações no interior das proteínas as auxiliam a manterem-se enoveladas em altas temperaturas (ELCOCK, 1998).

Além disso, em temperaturas elevadas a presença de proteínas *heat-shock* parece ser essencial para os termófilos e hipertermófilos. As proteínas *heat-shock* são expressas por todas as células em resposta a condições de estresse ambiental. Muitas proteínas desse grupo desempenham funções de chaperonas, estabilizando novas proteínas e garantindo seu enovelamento correto. As chaperonas podem atuar ainda no desenovelamento de proteínas com estrutura incorreta, causada pelas condições de estresse ambiental. As proteínas chaperonas são as principais responsáveis em manter a estrutura protéica estabilizada e são altamente expressas por termófilos e hipertermófilos em condições de altas temperaturas. A 108 °C, aproximadamente 80% das proteínas solúveis em *Pyrodicticum occultum* consistem em chaperonas induzidas pelo calor, denominadas termosomos, que até o momento só foram detectadas em arqueias hipertermófilas (LARGE et al., 2009; STETTER, 1999). A chaperona GroEL e sua co-chaperona GroES exibem também um papel importante na estabilidade protéica nos micro-organismos termófilos e hipertermófilos, embora na maioria das arqueias hipertermófilas somente GroES está presente (KLUMPP; BAUSMEISTER, 1998; MADIGAN et al., 2016).

Outras estratégias também estão presentes nos termófilos e hipertermófilos, como a presença de sais e solutos compatíveis no interior da célula (p. ex. manosilglicerato), que auxiliam a manutenção do equilíbrio osmótico em altas temperaturas. Os mecanismos de resposta ao estresse osmótico estão presentes principalmente em termófilos e hipertermófilos marinhos, que precisam lidar também com a salinidade (EMPADINHAS, 2006). A resposta ao estresse oxidativo também é muito comum nesses organismos, uma vez que os ambientes termais muitas vezes emitem compostos sulfurosos que exibem um alto poder de oxidação quando em contato com o oxigênio. Em resposta, os termófilos e hipertermófilos produzem algumas moléculas, como a oxiredutase e a glutathione, que auxiliam a manter o estado redox das células microbianas (ALVES et al., 2009).

Ainda, esses organismos são adaptados a outros fatores além da temperatura, incluindo a composição mineral e gasosa dos ambientes que habitam. A composição geoquímica dos ambientes vulcânicos propicia a presença de metabolismos quimiolitotróficos. A maioria dos termófilos e hipertermófilos possuem metabolismo quimiolitotrófico, obtendo energia a partir de reações inorgânicas redox

(quimiolitotróficos) e utilizando CO₂ como fonte de carbono para a construção de suas moléculas orgânicas (autotróficos) (STETTER, 1999).

As reações quimiolitotoautotróficas nesses organismos podem ser tanto anaeróbias quanto aeróbias. Um importante doador de elétrons para esses organismos é H₂, geralmente abundante nos gases vulcânicos. Outros doadores de elétrons podem ser o sulfeto, enxofre e Fe (II). Como no caso da respiração em mesófilos, alguns termófilos e hipertermófilos podem usar oxigênio comoceptor de elétrons. Contudo, os hipertermófilos são geralmente microaerófilos, crescendo somente em concentrações reduzidas de oxigênio (< 10 ppm). Os tipos de respiração anaeróbica comuns em termófilos e hipertermófilos são utilizando nitrato, Fe (III), sulfato, enxofre e dióxido de carbono como aceptores de elétrons. Muitos quimiolitotoautotróficos podem ser também heterotróficos facultativos, utilizando compostos orgânicos se estes se encontram abundantes no ambiente. Os termófilos e hipertermófilos podem também ser heterotróficos, obtendo energia tanto aerobicamente ou por diferentes tipos de respiração anaeróbica, usando compostos orgânicos como doadores de elétrons, ou realizando fermentação (STETTER 1999, 2013).

2.4.2 Adaptações celulares e metabólicas de psicrófilos

As baixas temperaturas criam uma série de desafios para os micro-organismos que vão desde a destruição estrutural das células por cristais de gelo, até a desnaturação de biomoléculas (ROTHSCHILD; MANCINELLI, 2001). Contudo, foram descritos micro-organismos psicrófilos no gelo e na neve, com atividade metabólica em temperaturas de até -20 °C e com capacidade de permanecer viáveis a -45 °C. Os psicrófilos foram encontrados nos mais variados ambientes gelados, tais como *habitats* alpinos e polares, oceano profundo, cavernas de gelo, superfície terrestre e oceânica, e inclusive na atmosfera superior. São particularmente abundantes nas profundezas frias oceânicas e nas regiões polares (CAVICCHIOLI, 2006).

Para suportar as condições de baixas temperaturas, os psicrófilos possuem diversas estratégias celulares. Ao contrário dos termófilos e hipertermófilos, o conteúdo GC parece não exibir um padrão nos organismos psicrófilos. Contudo, um alto nível de redundância ocorre nos genomas de psicrófilos, onde observa-se múltiplas cópias RNAt (relacionados à síntese de aminoácidos) e um aumento na variedade e número de chaperonas. No genoma desses organismos é observado também um grande número de

características envolvidas com a plasticidade genômica, como plasmídios, *transposons* e outros elementos genéticos móveis. Muitos desses elementos genéticos móveis, e os genes que eles carregam, parecem estar diretamente envolvidos com adaptações ao frio, como a biossíntese de ácidos graxos insaturados (AYALA-DEL-RÍO et al., 2010).

Um dos efeitos das baixas temperaturas é a diminuição das taxas de reação química. As enzimas dos psicrófilos precisam então ser adaptadas a manter taxas catalíticas adequadas para as funções celulares. As enzimas psicrófilas são geralmente caracterizadas por um alto grau de flexibilidade estrutural, baixa termoestabilidade e alta especificidade em temperaturas baixas. A sua maior flexibilidade aumenta o grau de complementaridade entre o sítio catalítico e o substrato, reduzindo assim as energias de ativação e aumentando as taxas de *turnover* do substrato (CHATTOPADHYAY, 2006).

As proteínas psicrófilas possuem menos argininas e prolinas em suas estruturas. Esses aminoácidos formam múltiplas pontes de hidrogênio e pontes de sais, diminuindo a flexibilidade conformacional. A redução do conteúdo de alanina foi observada nas proteínas do psicrófilo *Shewanella* spp., enquanto redução de prolina/arginina foi detectada em *Psychrobacter arcticus*. Por outro lado, as proteínas psicrófilas mostram um aumento dos aminoácidos asparagina, metionina e glicina em suas estruturas. Glicina aumenta a mobilidade local da proteína, e lisina/arginina diminuem as pontes de hidrogênio e pontes de sais, aumentando a flexibilidade protéica. Foram observados também em psicrófilos um aumento de aminoácidos hidrofóbicos no lado exposto das proteínas, e menos resíduos hidrofóbicos em seus centros (MAAYER et al., 2014).

A manutenção da atividade celular em baixas temperaturas, e sua resistência a choques térmicos, tem sido também relacionada a expressão de proteínas celulares induzidas pelo frio, conhecidas como *Cold Induced Proteins* (CIPs). Dentro destas proteínas, foram caracterizadas as *Cold Shock Proteins* (CSPs), relacionadas a aclimação em condições de queda de temperatura. As CSP são proteínas que se ligam a ácidos nucleicos fita simples que regulam uma variedade de processos celulares, incluindo a transcrição, tradução, enovelamento protéico e a fluidez da membrana (KUHN, 2012).

Um dos impactos mais significativos das baixas temperaturas é na fluidez da membrana. As adaptações na membrana de psicrófilos incluem um aumento de ácidos graxos insaturados nos fosfolipídeos, mudança na composição de lipídeos, redução do tamanho e carga de lipídeos, e conversão dos ácidos graxos de –trans para –cis. Ainda, os pigmentos carotenóides polares e não-polares são produzidos por diversas bactérias da

Antártica e auxiliam a modular a fluidez da membrana e a manutenção da homeoviscosidade durante as variações de temperatura (Figura 4) (DEMING, 2002; MAAYER et al., 2014).

As baixas temperaturas induzem a formação de cristais de gelo no citoplasma das células, resultando em dano celular e desequilíbrio osmótico. Algumas estratégias de crioproteção são observadas na grande maioria dos psicrófilos (Figura 4). O acúmulo de solutos compatíveis, como a glicina, betaína, sucrose e manitol, resultam na diminuição do ponto de congelamento citoplasmático, provendo proteção contra o congelamento, e também contra a dessacação e hiperosmolaridade. O dissacarídeo trealose auxilia a prevenir a desnaturação e agregação de proteínas, e a diminuir o número de radicais livres e estabilizar as membranas celulares em condições de frio (CASANUEVA et al., 2010).

Alguns psicrófilos produzem proteínas anticongelantes (AFP), que se ligam e controlam o crescimento dos cristais de gelo e a recristalização, diminuindo o ponto de congelamento. Proteínas nucleadoras de gelo (IN) controlam e estabilizam a formação dos cristais de gelo, auxiliando os organismos a evitar o rompimento da membrana pelas baixas temperaturas. As proteínas IN são um raro exemplo de organismos vivos catalizando a transição de fase de água líquida para sólida. As bactérias nucleadoras de gelo são capazes de promover a formação de gelo em temperaturas muito mais quentes do que as partículas não vivas (CASANUEVA et al., 2010; MAAYER et al., 2014).

A produção de exopolissacarídeos (EPS) representa outra estratégia de crioproteção. Altos níveis de EPS diminuem o ponto de congelamento e a temperatura de nucleação de gelo. Os EPS podem ainda capturar água, nutrientes e íons de metais. Podem também facilitar a adesão, agregação celular e a formação de biofilmes, desempenhando um papel importante na proteção de enzimas extracelulares contra a desnaturação pelo frio (NICHOLS et al., 2005).

Figura 4 - Adaptações celulares comuns em micro-organismos psicrófilos. Adaptado de Maayer et al., (2014).

Os psicrófilos utilizam uma variedade de vias metabólicas, principalmente heterotróficas, mas também quimiolitotróficas e fotossintéticas. Diferentes grupos de arqueias metanogênicas foram detectados em ambientes gelados. Chen et al., (2012) analisaram as respostas moleculares da arqueia metanogênica psicrófila *Methanobrevibacter psychrophilus* e observaram mecanismos de adaptação ao frio distintos de bactérias, como a expressão de chaperoninas GroEL/GroES e termossomos. Apesar da abundância de arqueias metanogênicas nos ambientes polares, ainda pouco se sabe sobre seus mecanismos adaptativos em resposta ao frio. Muitas bactérias e arqueias psicrófilas estão relacionadas também ao ciclo do nitrogênio, atuando na fixação de nitrogênio, nitrificação e desnitrificação (DUCEY et al., 2010; ZHENG et al., 2011). Alguns psicrófilos também realizam o metabolismo do enxofre, principalmente as bactérias verdes do enxofre, que são fotoautotróficas anaeróbicas, e bactérias quimiolitotróficas oxidadoras de enxofre (NG et al., 2010; NIEDERBERGER et al., 2009).

2.5 Métodos independentes de cultivo empregados no estudo das comunidades microbianas

Antes do desenvolvimento de técnicas moleculares, os estudos de ecologia microbiana eram baseados em métodos de isolamento e cultivo de micro-organismos em laboratório. Contudo, estimativas indicam que apenas 1-5% dos micro-organismos do ambiente são cultivados nas condições laboratoriais, subestimando extremamente a diversidade microbiana (AMANN et al., 1995). Esta dificuldade é ainda mais vidente ao se considerar os ambientes extremos, onde o isolamento e cultivo de micro-organismos são ainda mais complexos. Por este motivo, o emprego de técnicas independentes de cultivo tornou-se uma necessidade metodológica no campo da ecologia microbiana (DUARTE, 2010).

As técnicas independentes de cultivo baseiam-se na análise do DNA diretamente extraído de amostras ambientais. Estas análises podem ser classificadas em dois grandes grupos: os dependentes de *primers* específicos e amplificação (PCR), como o sequenciamento do gene do RNAr 16S, e os independentes de *primers* e ampliações específicas, como a técnica de Metagenoma *shotgun*. Mais detalhes serão descritos a seguir a respeito dessas técnicas.

2.5.1 Técnicas baseadas na amplificação do gene do RNAr 16S

A maioria dos métodos moleculares empregados em ecologia microbiana envolve o estudo do gene 16S ribossomal (16S RNAr). Características do gene do RNAr 16S, tais como sua função no metabolismo celular, ubiquidade e propriedades evolucionárias, o tornaram um dos marcadores moleculares mais utilizados em ecologia microbiana (CASE et al., 2007). Uma particularidade do gene 16S rRNA é a presença de regiões altamente conservadas, as quais permitem o desenho de *primers* de PCR específicos, e regiões hipervariadas, as quais são utilizadas para inferir relações filogenéticas entre os micro-organismos (DUARTE, 2010; WARD et al., 1990).

Muitas técnicas são utilizadas a partir da amplificação do RNAr 16S em ecologia microbiana. A técnica de PCR quantitativo (PCRq) é empregada com o intuito de verificar a abundância de determinados grupos microbianos ou genes funcionais nas amostras ambientais. O PCRq se baseia na técnica convencional de PCR (reação em cadeia da polimerase), porém é capaz de quantificar em tempo real o número de cópias amplificadas

de um determinado gene. Para isso, é utilizado o fluoróforo *Sybr Green* ou a sonda fluorescente *TaqMan*, que se intercalam na dupla fita de DNA, gerando sinais fluorescentes proporcionais ao número de cópias produzidas. A quantificação do produto amplificado é realizada através de comparação com uma curva padrão que correlaciona a intensidade dos sinais de fluorescência, gerados durante os ciclos de amplificação, com as concentrações conhecidas de uma sequência idêntica a que se quer quantificar. A curva padrão é geralmente construída a partir de sequências do gene de interesse clonadas em plasmídios e diluídas em série a concentrações conhecidas. O PCRq é altamente sensível, tendo seu limite mínimo de detecção de 10 cópias de DNA/mL (GINZINGER, 2002). Desse modo, muitos trabalhos vêm empregando a técnica de PCRq para quantificar bactérias e arqueias em amostras ambientais, inclusive em ambientes extremos onde a abundância desses micro-organismos é baixa (BAYER et al., 2014; OCHSENREITER et al., 2003; WEBSTER et al., 2015).

O sequenciamento do gene do RNAr 16S é uma das técnicas mais utilizadas para estudar a diversidade microbiana e suas relações filogenéticas, ecológicas e evolutivas. Diferentes plataformas e tecnologias vêm sendo empregadas desde o surgimento da técnica de sequenciamento de DNA na década de 1970. A primeira técnica de sequenciamento de DNA consistia no princípio da incorporação terminal de dideoxinucleotídeos marcados, juntamente com a eletroforese capilar (SANGER et al., 1977). No contexto da ecologia microbiana, essa técnica possibilita o sequenciamento de até centenas de fragmentos de genes 16S rRNA por estudo. Contudo, além de poucas sequências geradas, o processo de preparo de bibliotecas de clones, necessário para o sequenciamento baseado em eletroforese capilar, é longo, trabalhoso e de alto custo.

Nos últimos anos, foram desenvolvidas novas tecnologias de sequenciamento denominadas sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing* - NGS) ou sequenciamento de alto rendimento (*high-throughput sequencing* - HTS) (SHENDURE; JI, 2008). As principais vantagens das tecnologias de NGS são o sequenciamento direto dos *amplicons*, sem a necessidade de construção de bibliotecas de clones, o alto volume de sequências produzidas (de milhares a milhões) e a realização das leituras das sequências diretamente nas plataformas, ou seja, não há dependência de eletroforese. A primeira tecnologia de NGS lançada (2005) foi o pirosequenciamento, por meio da plataforma 454 (Roche), que era capaz de gerar em torno de 200 mil sequências por corrida. Inicialmente, sequências entre 30-100 bp eram geradas pelas plataformas de NGS e conforme o avanço das tecnologias, o comprimento máximo das sequências foi para

300-1000 bp. Após o lançamento do 454, uma série de plataformas e tecnologias surgiram, como o SOLiD (*Sequencing by Oligo Ligation Detection*) (Life Technologies), Ion Torrent (Life Technologies) e MiSeq/HiSeq (Illumina). Os custos de sequenciamento diminuíram drasticamente com o avanço dessas tecnologias, de modo que hoje é possível sequenciar o genoma humano por 1000 dólares pela plataforma HiSeq da Illumina (em 2004 o custo era de 10 milhões) (METZKER, 2010; VAN DIJK et al., 2014).

A escolha da plataforma de NGS depende de uma série de fatores, desde o tamanho dos *amplicons* a serem sequenciados, aos custos e objetivos do estudo. Recentemente, a plataforma Illumina se tornou líder entre as tecnologias estabelecidas de NGS, principalmente pelos equipamentos de alto desempenho (milhões de sequências geradas), por oferecer o menor custo por base sequenciada e maior qualidade de sequências (KOZICH et al., 2013; NELSON et al., 2014). Na plataforma MiSeq da Illumina, é possível gerar cerca de 30 milhões de *reads* (denominação de sequências para esta plataforma) pareados com aproximadamente 300 pb cada. A plataforma MiSeq da Illumina é atualmente a mais utilizada para o sequenciamento de *amplicons* em ecologia microbiana (CAPORASO et al., 2012).

A tecnologia de sequenciamento da Illumina funciona a partir de um processo conhecido por amplificação em fase sólida associado a sequenciamento por síntese (*sequencing-by-synthesis*). Primeiramente, são preparadas bibliotecas de *amplicons* independentes de clonagem: aos *amplicons* são adicionadas sequências de adaptadores e de *barcodes* (índices ou códigos que irão identificar cada amostra). As bibliotecas são depositadas em uma superfície sólida (*flow cell*), coberta por oligonucleotídeos que vão se ligar aos adaptadores adicionados previamente às bibliotecas. Em seguida ocorre o processo de amplificação por ponte (*bridge amplification*), onde ocorrerá uma reação de amplificação controlada, denominada de *cluster generation*. De forma similar à PCR, a *bridge amplification* se dá por ciclos de denaturação e extensão que resultam na amplificação dos fragmentos de DNA que ficaram preso à *flow cell*, gerando de milhões à bilhões de *clusters* clonais por toda a *flow cell*. A tecnologia da Illumina também utiliza o princípio de nucleotídeos terminadores, que impedem a extensão do fragmento de DNA, mas de forma reversível. Cada um dos 4 tipos de nucleotídeos é marcado com uma cor única. Após sua incorporação na fita de DNA pela polimerase, o marcador fluorescente é identificado por excitação a laser através de câmera de CCD e, em seguida, clivado enzimaticamente, revertendo a condição terminadora do último nucleotídeo incorporado, para dar continuidade a um novo ciclo de extensão. A identificação das bases é feita a

cada etapa da síntese da fita de DNA (NELSON et al., 2014; VAN DIJK et al., 2014; WERNER et al., 2011).

A plataforma Illumina também pode se beneficiar da geração de sequências *paired-end* em que cada *amplicon* é sequenciado duas vezes, a partir da ponta 3' e da 5' da molécula de DNA. Desde que as *reads paired-end* se sobreponham, a geração de sequências contíguas (*contigs*) resulta em sequências finais de tamanho maior que o das *reads* individuais ao mesmo tempo em que se reduz os erros intrínsecos do processo de sequenciamento (WERNER et al., 2011).

Atualmente, o maior desafio relacionado ao sequenciamento NGS é a análise da grande quantidade de dados gerados por essas plataformas. No caso dos dados de sequenciamento do RNAr 16S, as ferramentas de bioinformática atualmente mais utilizadas para processá-los são o *Qiime* (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (COPARASO et al., 2010) e o *pipeline* do *Uparse* (EDGAR, 2013). Através dessas ferramentas, as sequências são agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (*Operational Taxonomic Units* - OTUs) para a realização das análises filogenéticas e de diversidade. As OTUs são classificadas taxonomicamente de acordo com os bancos de dados de DNA ribossomal empregados, como os do RDP (WANG et al., 2007) e *Greengenes* (DeSANTIS et al., 2006).

Apesar de fundamental para o estudo da ecologia de micro-organismos, é preciso ter cautela ao empregar os métodos dependentes de amplificação, principalmente devido a alguns vieses, como: a afinidade diferencial dos *primers* para determinados grupos microbianos e a baixa cobertura desses *primers* para grupos raros ou ainda não descritos na literatura (CAPORASO et al., 2012). Por este motivo, é importante associar os resultados gerados pelas técnicas dependentes de amplificação, com outras técnicas que não dependem do uso de *primers*, como a Metagenômica.

2.5.2 *Metagenoma shotgun*

A Metagenômica ou “genômica ambiental” é o estudo dos genomas microbianos extraídos diretamente de amostras ambientais. O termo “*shotgun*” refere-se à etapa em que o DNA ambiental extraído é totalmente fragmentado em comprimentos de aproximadamente 400 pb. No Metagenoma, as bibliotecas são construídas através desses fragmentos, sendo então não dependentes de amplificação com *primers* específicos. Em seguida, o sequenciamento dessas bibliotecas seguirá os mesmos princípios descritos para

o sequenciamento do gene do RNAr 16S pela plataforma MiSeq da Illumina. Contudo, a complexidade das sequências do Metagenoma é muito maior em relação ao sequenciamento de *amplicons*, já que diversos genes e genomas estarão sendo avaliados. Por esse motivo é necessário utilizar uma plataforma que gere uma grande quantidade de *reads*, como é o caso da plataforma HiSeq da Illumina, a mais empregada atualmente para as análises de Metagenoma. A HiSeq da Illumina é capaz de gerar em torno de 300 milhões de *reads* pareados de 150 pb cada (CAPORASO et al., 2012; EISEN, 2007).

A Metagenômica tem se tornado a principal ferramenta para estudos relacionados à diversidade funcional, o potencial metabólico e a função ecológica das comunidades microbianas (SIMON et al., 2009). Entender a diversidade funcional pode auxiliar também o desenvolvimento de novos meios de cultura e técnicas de cultivo capazes de isolar um maior número de micro-organismos. O Metagenoma *shotgun* têm sido proposto como a abordagem funcional mais robusta para a descrição de comunidades microbianas em seus *habitats* naturais, visto que, teoricamente, todas as sequências de DNA de todos os organismos presentes em uma determinada amostra são analisadas (FERRER et al., 2011). A presença ou ausência de genes envolvidos em vias metabólicas, como na oxidação-redução de enxofre, ferro ou na respiração aeróbia, pode fornecer informações a respeito das estratégias metabólicas e da função destes micro-organismos nos ciclos biogeoquímicos. Além disso, o Metagenoma pode fornecer informações à respeito da adaptabilidade destes micro-organismos aos extremos de temperatura encontrados, por exemplo, nos sítios geotermiais polares (INSKEEP et al., 2012).

Se o sequenciamento do gene do RNAr 16S pela plataforma Illumina MiSeq já gera desafios quanto a grande quantidade de dados gerados, a Metagenômica utilizando HiSeq é ainda mais desafiadora. Os dados gerados por HiSeq requerem uma enorme capacidade de processamento, que deve ser suprida pelo uso de *clusters* de computadores ou serviços de computação em nuvem. O MG-RAST (*Metagenomics RAST server*) é um servidor gratuito *online* que fornece ferramentas automatizadas para a análise e visualização de dados Metagenômicos. O *pipeline* de análise do MG-RAST consiste em processar as sequências quanto à qualidade e tamanho, selecionar ORFs (*open reading frame*), anotar os genes e os aminoácidos, identificar as proteínas, e por fim, gerar os perfis de abundância de cada função para cada amostra analisada (GLASS et al., 2011).

Muitas informações são geradas através da Metagenômica e por este motivo é de grande importância ter em vista quais perguntas se objetiva responder com esta técnica. Nesse trabalho, buscou-se principalmente selecionar os genes envolvidos em processos

metabólicos e nos ciclos biogeoquímicos, bem como genes relacionados com a adaptação microbiana a ambientes extremos, sobretudo com a resposta ao estresse ambiental.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostras ambientais na Ilha *Deception*, Antártica

As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas durante a Operação Antártica XXXII (dezembro de 2013 a janeiro de 2014) com apoio logístico do Navio Polar Almirante Maximiano, Marinha do Brasil, e com auxílio dos Projetos INCT-CRIOSFERA e MICROSFERA, coordenados pelo Dr. Luiz Henrique Rosa e pela Dr^a. Vivian Helena Pellizari, respectivamente. Ambos os projetos contaram com o apoio do Programa Antártico Brasileiro.

Foram coletadas amostras de sedimento superficial (~5 cm de profundidade) associado à fumarolas e geleiras da Ilha *Deception*, nos sítios geotermicamente ativos de *Fumarole Bay* (FB) e *Whalers Bay* (WB). Definiu-se um transecto de temperatura, totalizando três pontos, intitulados A, B e C (Figura 5). Os pontos A e B referem-se as amostras coletadas nas fumarolas, enquanto os pontos C estão relacionados às amostras das geleiras. Durante as coletas, somente a fumarola de *Fumarole Bay* do ponto B estava submersa (aproximadamente a 50 cm de profundidade na coluna d'água), enquanto as demais estavam expostas, em uma zona de entremarés. As amostras de sedimento dos pontos C foram coletadas abaixo da borda das geleiras (Tabela 2).

Em relação à temperatura de cada sítio geotermal, os pontos A foram considerados os mais quentes, B os pontos intermediários e C os pontos mais frios. Triplicatas de cada ponto foram realizadas e tratadas como amostras independentes em todas as análises posteriores. As amostras ficaram armazenadas no Navio Polar Almirante Maximiano em *freezer* -20 °C para as análises moleculares e em refrigerador 4 °C para as análises dependentes de cultivo, até sua retirada no Rio de Janeiro no mês de abril de 2014.

Tabela 2 - Descrição das dezoito amostras coletadas na Ilha Deception durante a Operantar XXXII (2013-2014).

Data	Local	Sítio Geotermal	Código	Coordenadas	Tipo de amostra	Temperatura
09/jan/14	Deception	Fumarole Bay	FBA1, FBA2 e FBA3	62°58'02,7" S – 60°42'36,4" W	Sedimento exposto superficial associado a fumarola	98 °C
09/jan/14	Deception	Fumarole Bay	FBF1, FBF2 e FBF3	62°58'02,7" S – 60°42'36,4" W	Sedimento associado a fumarola submersa em região rasa (~50 cm profundidade)	66 e 80 °C
09/jan/14	Deception	Fumarole Bay	FBC1, FBC2 e FBC3	62°58'02,7" S – 60°42'36,4" W	Sedimento associado a geleira	~0 °C
4/dez/13	Deception	Whalers Bay	WBA1, WBA2 e WBA3	S 62°58'788" S - 60°33'464" W	Sedimento superficial exposto associado a fumarola	54 °C
4/dez/13	Deception	Whalers Bay	WBB1, WBB2 e WBB3	S 62°58'788" S - 60°33'464" W	Sedimento superficial exposto a 5 metros da fumarola do ponto A	10 °C
4/dez/13	Deception	Whalers Bay	WBC1, WBC2 e WBC3	S 62°58'788" S - 60°33'464" W	Sedimento associado a geleira	~0 °C

Figura 5 - Visão geral dos pontos de coleta nos sítios geotermiais de *Whalers Bay* e *Fumarole Bay*, na Ilha *Deception*.

3.2 Análises físico-químicas do sedimento

Durante a coleta nas fumarolas submersas de *Fumarole Bay* utilizou-se a sonda multiparamétrica Horiba U-50 para a análise da água do mar adjacente. Os parâmetros mensurados pela sonda foram pH, temperatura, salinidade, condutividade, turbidez, densidade ótica, sólidos totais dissolvidos e potencial de redução. Por questões logísticas, não foi possível mensurar com a sonda estes parâmetros nas fumarolas de *Whalers Bay*.

Todas as amostras de sedimento analisadas neste trabalho foram avaliadas em laboratório quanto aos seguintes parâmetros físico-químicos: micronutrientes (boro, cobre, ferro, manganês e zinco), matéria orgânica, carbono orgânico, pH em H₂O, pH em KCl, fósforo, silício, sódio, potássio, cálcio, magnésio, alumínio, soma de bases trocáveis, capacidade de troca de cátions, saturação da CTC por bases (V), saturação por alumínio (m), sulfato, nitrogênio total, amônia, nitrato, condutividade elétrica, granulometria, umidade e densidade do solo. Estas análises foram realizadas por terceirização de serviço no Departamento de Ciência do Solo, Escola Superior de Agrucultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

3.3 Extração de DNA total

A extração de DNA genômico total das amostras coletadas durante a Operação Antártica XXXII foi realizada utilizando o *kit* PowerMax Soil™ DNA (Mo Bio, USA), a partir de 10 g de cada amostra, segundo o protocolo do fabricante. Após a extração, o DNA foi purificado com o *kit* OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit™ (Zymo Research, USA), conforme o protocolo do fabricante. A integridade e concentração final de DNA foi avaliada, respectivamente, em eletroforese em gel de agarose 1% (v/v) preparado em tampão TAE 1X (Tris 0,04 M, ácido acético glacial 1M, EDTA 50 mM, em pH 8) e em fluorômetro *Qubit* 1.0 (Life Technologies, USA) com o *kit* *Qubit*® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, USA).

3.4 PCR em Tempo Real (PCR quantitativo)

As análises de PCR quantitativo (PCRq) foram realizadas com o intuito de avaliar a abundância do gene do RNAr 16S de bactérias e arqueias nas comunidades microbianas

analisadas. As reações foram realizadas em triplicatas e utilizando o sistema de detecção *Sybr Green I*. As reações de PCRq foram feitas em volume de 25 µL contendo 12,5 µL de *Power Sybr® Master Mix* (Life Technologies, USA) e 0,2 µM dos pares de *primers*. Os *primers* empregados foram:

a) Bactérias: *primers* 27F e 518R (LANE et al., 1991; MUYZER et al., 1993) numa amplificação com uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 30 s;

b) Arqueias: *primers* 340F e 1000R (GANTNER et al., 2011) iniciando com desnaturação a 98 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 57 °C por 30 s e 72 °C por 90 s.

Com o intuito de verificar a especificidade da reação de amplificação foram construídas curvas de desnaturação com temperaturas variando entre 60 °C e 95 °C. Os dados foram analisados em *software* fornecido pela *Applied Biosystems* que é capaz de calcular os valores de *cycle threshold* (Ct), a correlação logarítmica (R^2) entre o número de ciclos e a quantidade de DNA nas amostras, além da eficiência da reação (E). Como controles foram empregadas diluições seriadas de produtos de PCR do gene RNAr 16S amplificados com os *primers* 27F e 1401R (LANE et al., 1991) e 1000R e 340F (GANTNER et al., 2011). Desta forma os valores de Cts obtidos em cada reação foram utilizados para determinar o número de cópias do gene por grama de amostra e para estimar o número de células por grama de amostra. O número de cópias do gene do rRNA 16S foi convertido para células assumindo 2 e 3,8 cópias do gene para Archaea e Bacteria, respectivamente (BORREL et al., 2012). A análise de variância (ANOVA), através do *software* Prism, foi realizada para avaliar se houve diferenças significativas entre as amostras. Análises de componentes principais foram realizadas a fim de correlacionar os resultados de PCRq com os parâmetros ambientais, através do *software* Canoco v4.5 (SMILAUER; LEPS, 2014).

3.5 Sequenciamento do gene do RNAr 16S por Illumina Miseq

O gene do RNAr 16S foi amplificado a partir do DNA genômico total das amostras analisadas e sequenciado através da plataforma Illumina MiSeq, em um sistema *pairend* 2 x 300 pb. O gene do RNAr 16S possui aproximadamente 1500 pb e contém 9 regiões variáveis, intercaladas entre as regiões conservadas. Essas regiões variáveis são

frequentemente utilizadas para classificações filogenéticas e análises de diversidade. Para este trabalho, o par de *primers* S-D-Bact-0341-b-S-17 (abreviado como 341F) (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') e S-D-Bact-0785-a-A-21 (abreviado como 785R) (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') foi escolhido para amplificar as regiões V3 e V4 do gene do RNAr 16S em bactérias, e os *primers* S-D-Arch-0519-a-S-15 (abreviado como 519F) (5'-CAGCMGCCGCGGTAA-3') e S-D-Arch-1041-a-A-18 (abreviado como 1017R) (5'-GGCCATGCACCWCCTCTC-3') para amplificar o mesmo gene em arqueias (KLINDWORTH et al., 2013). Os *primers* foram selecionados por apresentarem degenerações que permitem uma alta cobertura e boa representatividade da diversidade microbiana, de acordo Klindworth et al., (2013) em estudo recente. A cobertura de cada *primer* contendo um *mismatch* ou degeneração é respectivamente para arqueias e bactérias: 66,6% e 98,1% para 341F, e 96,5% e 96,2% para 785R; 97,7% e 98,4% para o 519F, e 95,0% e 0% para o 1017R. Quando considera-se a cobertura do par de *primers* 341F e 785R, as análises *in silico* testadas por Klindsworth et al., (2013) indicam valores de 58,2 % para arqueias e 70,9% para bactérias. Para o par de *primers* 519F e 1017R, as análises *in silico* indicam valores de cobertura de 92,8% para arqueias e 0% para bactérias.

O preparo das amostras consistiu em uma amplificação inicial do gene do RNAr 16S a partir do DNA genômico, utilizando os *primers* citados acima. Cada *primer* possuía uma sequência de adaptadores específicos (*Forward* 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'; *Reverse* 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3') para a plataforma Illumina MiSeq. A primeira reação de PCR consistiu em 25 µL da enzima KAPA *HiFi HotStart Ready Mix* (Kapa Biosystems), aproximadamente 5 ng de DNAg e 0,2 µM de cada *primer*. O programa consistiu em uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos a 95 °C por 30 s, anelamento a 55 °C ou 67 °C por 30 s, para bactérias ou arqueias, respectivamente, e extensão a 72 °C por 30 s, e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Devido a presença de dímeros de *primers*, as bandas referentes aos *amplicons* foram cortadas do gel e purificadas através do kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN, USA). O DNA amplificado foi quantificado através de fluorômetro *Qubit 1.0* (Life Technologies, USA) com o kit *Qubit® dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies, USA). Em seguida, foram utilizados aproximadamente 50 ng de DNA para realizar a segunda reação de amplificação, que consistiu na adição de índices em cada *amplicon* do gene do

RNAr 16S para a montagem das bibliotecas. Os índices são compostos por dois conjuntos de *primers* (12 *primers* de índices “tipo 1” e 8 *primers* de índices “tipo 2”) que dão origem a 96 combinações diferentes, correspondendo a 96 amostras (Figura 6). O programa para a PCR de adição dos índices foi desnaturação inicial de 95 °C por 3 min, 8 ciclos de 95 °C a 30 s, 55 °C a 30 s e 72 °C a 30 s, e extensão final de 72 °C por 5 min.

Figura 6 - Esquema correspondente a combinação de diferentes primers que irão criar “códigos” para a identificação de 96 amostras. Em A: conjunto de primers índices 1, B: conjunto de primers índices 2 e C: placa contendo os amplicons do gene do rRNA 16S. Fonte: Protocolo Illumina – 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation.

Os *amplicons* contendo os índices e denominados de “bibliotecas” foram purificados por *beads* magnéticas através do *kit AMPure XP beads* (Beckman Coulter). Para a purificação, foram adicionados 56 µL das *beads* magnéticas em cada biblioteca. A placa contendo as amostras foi inserida em um rack magnético por 2 min ou até que o sobrenadante se tornasse transparente. O sobrenadante foi removido e 200 µL de etanol a 80% foi adicionado para a lavagem do DNA. O etanol 80% foi removido e 25 µL de 10 mM Tris pH 8,5 foi adicionado em cada amostra para a eluição do DNA purificado.

As bibliotecas foram analisadas quanto a sua qualidade empregando-se Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) e *chip* Bioanalyzer DNA 1000 (Agilent Technologies), e quanto a sua quantidade, por meio de *Qubit 1.0* (Life Technologies, USA) e *kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies, USA).

Foi efetuada a normalização das bibliotecas para 4 nM, por meio da seguinte fórmula:

$$\frac{(\text{concentração em ng/}\mu\text{L})}{(660 \text{ g/mol} \times \text{tamanho médio da biblioteca})} \times 10^6 = \text{concentração em nM}$$

Em seguida, foi realizada a etapa final de *pooling*, onde misturou-se todas as bibliotecas normalizadas para o envio ao sequenciamento. As amostras foram enviadas para o Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP), localizado no Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP, que possui uma plataforma Illumina MiSeq disponível para pesquisadores do ICB.

A preparação para o sequenciamento no CEFAP consistiu na desnaturação das bibliotecas com NaOH, diluído com tampão de hibridização, e em seguida, desnaturação por calor, seguindo as especificações do fabricante. Foi adicionado à biblioteca 5% do controle interno PhiX, devido à baixa complexidade dos *amplicons* (pouca variação de bases). A fabricante Illumina recomenda o preparo de *pool* de bibliotecas visando densidades de geração de *cluster* dentro da margem de 800-1000 K/mm² para otimização dos reagentes MiSeq v3. Para tanto, foi calculado uma concentração final de DNA de 4 pM para a corrida.

O sequenciamento foi realizado na plataforma MiSeq juntamente com os reagentes e flow cell MiSeq v3, que gera reads de 301 pb, paired-end, por um total de 600 ciclos de amplificação. O sequenciamento foi acompanhado por 65 horas até seu término, pela plataforma online BaseSpace® (Illumina). Todos os dados gerados foram enviados pelo equipamento MiSeq aos servidores da Illumina e descarregados pela plataforma BaseSpace® para posterior análise de bioinformática.

3.6 Análise dos dados de sequenciamento do gene do rRNA 16S por Illumina

Os dados de sequenciamento do gene do rRNA 16S foram analisados através do *Qiime* (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (COPARASO et al., 2010) e do *pipeline* do *Uparse* (EDGAR, 2013). Primeiramente, os *reads* pareados foram montados por meio do *software* PEAR (ZHANG et al., 2014), utilizando um mínimo de sobreposição de 50 pb, mínimo de tamanho de 400 pb e mínimo *Phred score* de 30. Em seguida os *reads* montados foram filtrados quanto à sua qualidade através do comando *-fastq_filter* do *Usearch* versão 8.1.1861 (EDGAR, 2010), com um mínimo de erros esperados de 1.0 (*-fastq_maxee* 1.0). Os *reads* montados foram novamente filtrados por meio do *Software* PRINSEQ (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011) e trimados em suas extremidades (~10 pb), de modo que todas as sequências exibissem tamanho de 400 pb.

As sequências únicas foram selecionadas com o comando *-derep_fulllength* do *Usearch*, com o intuito de selecionar somente as sequências únicas. As sequências únicas foram agrupadas em OTUs considerando uma similaridade de 97%, através do comando *-cluster_otus* do *Usearch*. As sequências quiméricas foram filtradas através do comando *-uchime_ref* do *Usearch*, utilizando como referência o banco de dados do RDP *Classifier* (WANG et al., 2007).

A tabela de OTUs foi construída por meio do comando *-usearch_global* do *Usearch* e as OTUs foram classificadas taxonomicamente através do comando *assign_taxonomy.py* do *Qiime*, utilizando o banco de dados do *Greengenes* (DeSANTIS et al., 2006) como referência para Bacteria e o banco do RDP para Archaea (WANG et al., 2007). Foram removidas as sequências assinaladas como cloroplastos e, em seguida, utilizou-se o comando *alpha_diversity.py* do *Qiime* para as análises de riqueza e alfa diversidade. A riqueza foi estimada pelos índices Ace e Chao1 e a alfa diversidade foi calculada pela Equitabilidade e pelos índices Simpson e Shannon. As sequências foram alinhadas através do comando *align_seqs.py* para a construção da árvore filogenética, utilizando o comando *make_phylogeny.py* do *Qiime*. Utilizou-se o comando *core_diversity_analyses.py* do *Qiime* para calcular a beta diversidade baseada no índice filogenético de UNIFRAC *weighted* (quantitativo) e *unweighted* (qualitativo) (LOZUPONE et al., 2011). É importante destacar que as análises descritas acima foram aplicadas para as sequências amplificadas com os *primers* de Bacteria (341F e 785R) e Archaea (519F e 1017R) separadamente. Os gráficos e as análises estatísticas, incluindo os testes de hipótese, foram elaborados com auxílio do *R* versão 3.3.1 (*R Development Core Team*, 2008), utilizando os pacotes *ggplot2*, *vegan*, *qiimer*, *reshape2*, *circlize* e *flyr*. A correlação entre o perfil da comunidade e as variáveis físico-químicas foi realizada por meio de uma análise de db-RDA (Análise de Redundância baseada na Distância), através do pacote *vegan* do *R*.

3.7 Metagenoma *shotgun*

O metagenoma permite sequenciar o DNA total das comunidades microbianas, ou seja, todos os genes de todos os organismos detectados em uma determinada amostra. Dessa forma, é possível inferir, por exemplo, o potencial metabólico, os ciclos

biogeoquímicos associados à comunidade microbiana e seus genes de adaptação ao ambiente de estudo.

Neste trabalho o metagenoma foi realizado pela plataforma Illumina HiSeq 2500 através de terceirização de serviços, no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), localizado na Unicamp. O sequenciamento foi realizado em um sistema *pairend* 2 x 100 pb em 3 *lanes*, totalizando aproximadamente 30 milhões de *reads* por amostra.

Inicialmente, as amostras de DNA total foram amplificadas (*Whole Genome Amplification*) para obtenção de DNA suficiente para o sequenciamento (aproximadamente 2 µg), por meio do *kit illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification* (GE healthcare Life Sciences), seguindo o protocolo do fabricante. Esse *kit* se baseia na amplificação por círculo rolante através da enzima Phi29 DNA polimerase de fagos e de hexâmeros de *primers*, que amplificam uniformemente e aleatoriamente o DNA total da amostra em questão. Foram realizadas de duas a três amplificações por amostra para a obtenção de 2 µg de massa total. O DNA amplificado foi purificado por *beads* magnéticas através do *kit AMPure XP beads* (Beckman Coulter). A purificação consistiu na adição de 56 µL das *beads* magnéticas em cada biblioteca. A placa contendo as amostras foi inserida em um *rack* magnético por 2 min ou até que o sobrenadante se tornasse transparente. O sobrenadante foi removido e 200 µL de etanol a 80% foi adicionado para a lavagem do DNA. O etanol 80% foi removido e 25 µL de 10 mM Tris pH 8,5 foi adicionado em cada amostra para a eluição do DNA purificado. O DNA total purificado foi enviado para o sequenciamento no LacTAD (Unicamp), onde as bibliotecas foram preparadas e o sequenciamento realizado.

3.8 Análise dos dados de Metagenoma *shotgun*

Os *reads* obtidos através da plataforma Illumina HiSeq para a análise do Metagenoma foram primeiramente filtrados utilizando o *software* SICKLE (JOSHI; FASS, 2011), utilizando um mínimo de *Phred score* de 30. Os *reads* filtrados foram anotados utilizando o *Metagenomics RAST server* (MG-RAST) (GLASS et al., 2011), de acordo com o *pipeline* da versão 3.3. O MG-RAST fornece um controle de qualidade das sequências que consiste em remover sequências duplicadas e selecionar sequências de acordo com sua qualidade e tamanho. Foram selecionados os *reads* com tamanho maior

que 80 pb e *Phred score* maior que 30. Os perfis funcionais e taxonômicos foram gerados através das classificações de subsistemas e classificações com melhor *hit*, por meio do SEED *subsystem*, M5NR (M5 *non-redundant protein database*) e KEGG, disponíveis no MG-RAST, com os parâmetros 1×10^{-5} *e-value*, mínimo alinhamento de 50 pb e 60% de identidade.

Foi gerada uma tabela contendo a frequência de *hits* para cada taxa individual (taxonomia) ou subsistema (função) para cada Metagenoma. Os valores foram normalizados para abundância relativa para remover possíveis vieses quanto aos diferentes tamanhos dos *reads* e esforços de sequenciamento. Os dados gerados pelo MG-RAST foram analisados estatisticamente através do *software Statistical Analysis of Metagenomic Profiles* (STAMP) (PARKS; BAIKO, 2010). Os valores de *p* foram calculados utilizando o teste exato de *Fisher two-sided* (FISHER, 1958) e os intervalos de confiança foram calculados por meio do método de Newcombe-Wilson (NEWCOMBE, 1998). As comparações estatísticas foram realizadas agrupando as amostras em três grupos de acordo com a temperatura ambiental: geleiras, fumarolas de até 80 °C e fumarola de 98 °C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises físico-químicas do sedimento

Durante a Operação Antártica XXXII, como descrito anteriormente, a água do mar adjacente às fumarolas de *Fumarole Bay* foi avaliada *in situ* por meio da sonda multiparâmetros Horiba U-50. Ao observar os parâmetros avaliados pela sonda, nota-se propriedades muito peculiares para a água do mar, onde os valores de pH (4,97) e a salinidade (2,98‰) mostraram-se consideravelmente baixos (Tabela 3). Provavelmente, a entrada de vapor d'água e gases sulfurosos oriundos das fumarolas vulcânicas em direção à coluna d'água provoca a redução de seu pH e a diminuição da salinidade nas regiões adjacentes.

Tabela 3 - Condições meteorológicas e propriedades da água do mar superficial durante a coleta no sítio de *Fumarole Bay*.

Condições Meteorológicas 09/01/14 (~22h – 1h) em <i>Fumarole Bay</i>	
<i>Pressão atmosférica (hPa)</i>	1004
<i>Temperatura do ar (°C)</i>	-0,8
<i>Velocidade Vento (Nós)</i>	8
<i>Velocidade Vento (km/h)</i>	15
<i>Direção Vento</i>	340°
Propriedades da Água Superficial em <i>Fumarole Bay</i>	
<i>Temperatura da água (°C)</i>	-0,25
<i>pH</i>	4,97
<i>ORP (mV)</i>	147
<i>Condutividade (mS/cm)</i>	24,8
<i>Turbidez (NTU)</i>	0,4
<i>OD (mg/l)</i>	15,73
<i>OD %</i>	133
<i>TDS (g/l)</i>	15,4
<i>Salinidade (‰)</i>	2,98
<i>Densidade (σ_t)</i>	23,9
<i>Profundidade (m)</i>	0,1

Os resultados das análises físico-químicas do sedimento das amostras de *Fumarole Bay* e *Whalers Bay* foram divididos nas Tabelas 4, 5, 6 e 7. Na Tabela 4, onde estão descritos os resultados para micronutrientes, pode-se observar uma quantidade significativa de Ferro associado aos Pontos A e B (temperatura ambiente superficial de 98 °C) no sítio de *Fumarole Bay* (FBA e FBB), possivelmente depositado pelas fumarolas mais quentes desta região. Essa condição torna-se interessante por favorecer o crescimento de bactérias e arqueias quimiolitotróficas, que oxidam o Fe (II) para obtenção de energia.

Tabela 4 - Valores obtidos através das análises físico-químicas dos sedimentos quanto aos micronutrientes, nas dezoito amostras coletadas nos sítios geotermiais da Ilha *Deception*.

Micronutrientes					
	B	Cu	Fe	Mn	Zn
WB-A1	1,16	<0,3	23	5,7	11,3
WB-A2	1,14	<0,3	26	3,4	1,2
WB-A3	1,39	<0,3	28	4,6	3,1
WB-B1	1,21	0,4	54	8,5	1
WB-B2	1,21	0,4	48	10,7	0,5
WB-B3	1,19	0,4	72	12,6	0,5
WB-C1	0,28	2,8	79	7,1	1,3
WB-C2	0,24	2,9	111	6,3	1,2
WB-C3	0,23	2,5	115	5,8	1,2
FB-A1	0,14	0,7	277	9,1	0,4
FB-A2	0,15	0,4	296	8	0,2
FB-A3	0,12	<0,3	121	6,9	0,4
FB-B1	1,69	<0,3	40	2,3	14,7
FB-B2	2,06	0,4	105	8,9	30,6
FB-B3	1,49	0,5	170	13,2	2,4
FB-C1	0,21	<0,3	50	7	0,4
FB-C2	0,18	<0,3	46	10,2	0,2
FB-C3	0,19	<0,3	45	8,7	0,2

*Todos os valores em mg.dm⁻³.

Pode-se observar na Tabela 5 que os pontos WBA, WBB, FBA, FBB, todos associados à fumarolas, apresentam maior quantidade de SO₄²⁻ em comparação com os pontos mais distantes (Pontos C) associados às geleiras. Um dos principais gases que compõem as fumarolas de *Deception* é o H₂S, que pode ser metabolizado por inúmeros grupos de bactérias e arqueias, dando origem a compostos oxidados de enxofre, como o SO₄²⁻. Desse modo, além de um gradiente de temperatura, observa-se a presença de um

gradiente geoquímico originado pela emissão de compostos vulcânicos nas regiões adjacentes às fumarolas. Compostos derivados de nitrogênio como a NH_4^+ , por outro lado, estão presentes em maiores concentrações nas amostras associadas às geleiras. A distribuição de matéria orgânica e carbono orgânico parece ser homogênea ao longo do gradiente de temperatura.

Tabela 5 - Valores obtidos através das análises físico-químicas do sedimento quanto aos compostos de nitrogênio, sulfato, matéria orgânica e carbono orgânico.

	N total	NH_4^+	NO_3^-	SO_4^{2-}	MO	CO
WB-A1	567	49	63	219	<4	2
WB-A2	406	42	66	203	<4	2
WB-A3	385	21	51	227	<4	2
WB-B1	378	14	27	215	5	3
WB-B2	308	11	42	204	6	3
WB-B3	308	18	28	248	6	4
WB-C1	1365	94	18	9	9	5
WB-C2	1344	101	25	5	9	5
WB-C3	1421	150	45	4	9	5
FB-A1	448	70	84	125	7	4
FB-A2	406	35	39	118	6	3
FB-A3	413	39	39	92	6	4
FB-B1	308	14	11	245	7	4
FB-B2	357	11	18	293	7	4
FB-B3	399	18	11	283	8	4
FB-C1	280	126	175	4	6	4
FB-C2	462	80	206	5	6	4
FB-C3	329	53	49	4	6	3

*N total, NH_4^+ e NO_3^- em mg/kg; SO_4^{2-} em mg.dm^{-3} ; Matéria orgânica e Carbono orgânico em g/kg.

Os valores de Na, soma de bases trocáveis, capacidade de troca de cátions e condutividade elétrica (Tabela 6) mostraram-se mais elevados nas amostras dos pontos A e B (próximos às fumarolas) tanto de *Fumarole Bay* quanto de *Whalers Bay*, provavelmente refletindo a proximidade e influência do ambiente marinho nessas amostras.

Tabela 6 - Valores obtidos através das análises físico-químicas do solo/sedimento quanto aos elementos P, Si, Na, K, Ca, Mg e Al, ao pH, condutividade elétrica, soma de bases trocáveis e capacidade de troca iônica.

	pH H ₂ O	pH KCl	P	Si	Na	K	Ca	Mg	Al	SB	CTC	V	m	C. E.
WBA1	6,9	5,6	47	31	103,2	6,4	13	26	<1	148,2	156,9	94	0	5332
WBA2	6,7	5,9	49	38	94,6	6,5	14	25	<1	139,7	147,4	95	0	5209
WBA3	7,2	6	47	39	107,5	5,8	12	24	<1	149,4	156,4	96	0	4979
WBB1	7,1	7,1	40	42	109,7	9	12	24	<1	154,2	155	99	0	5100
WBB2	7,4	6,6	46	43	94,6	8,5	11	24	<1	138,5	140,3	99	0	5127
WBB3	7,2	7	48	46	98,9	9,1	12	26	<1	145,7	146,6	99	0	4527
WBC1	6,1	4	20	33	4	3,9	18	10	6	35,4	75,9	47	14	210
WBC2	6,1	4,2	22	35	3,6	3,8	19	10	4	36,8	71,3	52	10	160
WBC3	6	3,9	21	34	3,4	4,1	17	9	9	33,6	71,6	47	21	133
FBA1	6,7	5,7	42	21	15,1	3	7	10	<1	34,8	37,4	93	1	494
FBA2	7	5,8	49	25	19,4	3,9	7	12	<1	42,5	45,1	94	1	429
FBA3	6,9	5,7	40	26	21,5	3,3	8	10	<1	42,5	46,8	91	0	610
FBB1	7,1	6,8	52	30	111,8	6,9	11	27	<1	157,1	159,7	98	0	5230
FBB2	7	6,6	78	35	144,1	9,1	18	37	<1	208,3	211,7	98	0	6595
FBB3	7,1	6,6	74	33	105,3	6,1	10	21	<1	142,8	149,7	95	0	5110
FBC1	7,4	6	64	35	10,6	3,8	36	9	<1	59,2	63,5	93	1	127
FBC2	7,9	6,5	66	39	12,9	4,3	43	10	<1	70,5	73,9	95	0	110
FBC3	7,7	6,4	66	40	12,9	3,8	36	9	<1	61,9	64,7	96	1	84

*P e Si em mg.Kg⁻¹; Na, K, Ca, Mg, Al, H + Al, SB (soma de bases trocáveis), CTC (capacidade de troca de cátions) em mmolc.Kg⁻¹; V e m (%); Condutividade elétrica (C.E) em µS/cm.

A granulometria (Tabela 7) indica que o sedimento, de maneira geral, possui caráter arenoso, com exceção das amostras das geleiras de *Whalers Bay*, que exibiram também grãos de menor tamanho na faixa de silte. Estes resultados coincidem com relatos descritos em trabalhos anteriores de estratigrafia para a Ilha *Deception*, que é composta essencialmente de material piroclástico e rochas de origem vulcânica (SMELLIE, 2001).

Tabela 7 - Valores obtidos através das análises físico-químicas quanto à granulometria, umidade e densidade do sedimento.

	Areia Total	Silte	Argila	Umidade %	Densidade solo
WBA1	975	25	-	19,89	2,39
WBA2	971	17	13		
WBA3	972	28	-		
WBB1	930	19	51	14,2	2,37
WBB2	940	22	37		
WBB3	920	30	50		
WBC1	630	320	50	30,41	2,73
WBC2	626	324	50		
WBC3	619	331	50		
FBA1	941	22	37	11,67	2,48
FBA2	939	11	50		
FBA3	924	26	50		
FBB1	967	20	13	9,27	3
FBB2	845	29	125		
FBB3	889	36	75		
FBC1	935	15	50	13,28	2,66
FBC2	935	17	75		
FBC3	907	17	76		

*Areia Total, Silte e Argila em g/kg; Umidade em %; Densidade do solo em cm³/cm³.

4.2 Extração de DNA total

O DNA total foi extraído através de 10 g de amostra de sedimento, como descrito anteriormente. O DNA foi purificado, concentrado 20 X em um concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e quantificado por *Qubit* 1.0 (Life Technologies, USA). Foram feitas alíquotas de 200 µL para compor o estoque de DNA de cada amostra, que foram utilizadas em todas as análises desse projeto. Após a concentração do DNA (20 X), os valores apresentaram-se entre 0,034 e 21,6 ng/µL (Tabela 8), em um volume total de 200 µL. Esta baixa concentração de DNA obtida está dentro dos valores esperados, uma vez que ambientes geotermiais e ambientes polares possuem parâmetros ambientais extremos e possivelmente poucos grupos microbianos são adaptados a estas condições.

Tabela 8 - Valores de DNA total extraído, purificado e concentrado 20X, quantificados por Qubit 1.0.

Amostras	ng/ μ L
FBA1	0,078
FBA2	0,0688
FBA3	0,034
FBB1	1,71
FBB2	1,312
FBB3	2,95
FBC1	0,31
FBC2	0,22
FBC3	0,21
WBA1	1,38
WBA2	1,932
WBA3	1,63
WBB1	0,824
WBB2	1,44
WBB3	0,8
WBC1	21
WBC2	21
WBC3	21,6

4.3 PCR em tempo real (PCR quantitativo)

O PCR em tempo real ou PCR quantitativo (PCRq) foi empregado neste trabalho com a finalidade de quantificar a abundância do gene do RNAr 16S de bactérias e arqueias que compõem as comunidades microbianas associadas aos sítios geotermiais da Ilha *Deception*. Além disso, essa técnica pode trazer outras informações relevantes, como a estimativa do número de células por grama de amostra ambiental, baseada na quantificação do gene RNAr 16S.

Nas Figuras 7 e 8 estão representados os números de cópias do gene RNAr 16S para arqueias e bactérias, respectivamente. Acima de cada figura pode-se visualizar a temperatura do sedimento mensurada durante a coleta. Na Tabela 9 estão representados os valores de número de células procarióticas por grama de amostra, estimados através de PCRq, e na Figura 9, a proporção do número de células por grama entre bactérias e arqueias. O número de cópias do gene RNAr 16S foi convertido para número de células assumindo 2 e 3,8 cópias do gene por célula de arqueia e bactéria, respectivamente (BORREL et al., 2012).

Figura 7 - Número de cópias do gene RNAr 16S em Archaea por grama de solo/sedimento das diferentes temperaturas ambientais. Não foi obtida a amplificação do gene para as amostras FBA1, FBA2 e FBA3, nas condições analisadas.

Figura 8 - Número de cópias do gene RNAr 16S em Bacteria por grama de solo/sedimento das diferentes temperaturas ambientais. Não foi obtida a amplificação do gene para as amostras FBA1, FBA2 e FBA3, nas condições analisadas.

Observa-se que as amostras FBA1, FBA2 e FBA3, referentes ao ponto com temperatura ambiental mais elevada (98 °C), não apresentaram amplificação para bactérias e arqueias nas condições analisadas. A amplificação dessas amostras só foi obtida por meio do sequenciamento do gene do rRNA 16S por Illumina (e somente para Archaea), que será descrito posteriormente.

Nos demais pontos, a abundância de arqueias mostrou-se maior em relação a bactérias

na maior parte das amostras analisadas, o que indica uma proporção incomum de Bacteria/Archaea para solos em geral, inclusive antárticos (Figura 9). As amostras que apresentaram maior abundância de Bacteria (WBC1, WBC2 e WBC3) referem-se ao ponto mais frio de *Whalers Bay*, próximo às geleiras e mais afastado das fumarolas. A alta abundância de Archaea na maior parte das amostras pode estar relacionada às condições ambientais oriundas da atividade vulcânica, especialmente a temperatura.

Tabela 9 - Número de células por grama de amostra ambiental estimado através de PCRq.

	Bacteria	Archaea
FBA1	ND	ND
FBA2	ND	ND
FBA3	ND	ND
FBB1	6,73E+04	1,02E+05
FBB2	3,38E+04	7,72E+04
FBB3	1,30E+05	1,40E+05
FBC1	2,01E+04	3,39E+04
FBC2	1,10E+04	1,67E+04
FBC3	5,94E+03	1,40E+04
WBA1	6,33E+04	1,67E+05
WBA2	1,21E+05	2,01E+05
WBA3	1,38E+05	2,36E+05
WBB1	2,69E+04	1,53E+05
WBB2	6,67E+04	2,26E+05
WBB3	3,69E+04	1,54E+05
WBC1	2,38E+06	3,84E+05
WBC2	1,51E+07	5,39E+05
WBC3	5,16E+06	4,65E+05

*ND: não foi detectada nenhuma amplificação para essas amostras nas condições analisadas.

Figura 9 - Proporção entre o número de células de bactérias e arqueias, estimada através de PCRq do gene RNAr 16S. O número de cópias do gene RNAr 16S foi convertido para número de células assumindo 2 e 3,8 cópias do gene por célula de arqueia e bactéria, respectivamente. Não foi detectada a amplificação do gene para as amostras FBA1, FBA2 e FBA3, nas condições analisadas.

A análise de componentes principais exibiu uma relação direta entre a abundância de bactérias e arqueias e os parâmetros ambientais analisados (Figura 10). As amostras em que as temperaturas ambientais apresentaram valores altos e intermediários (Pontos A e B de WB e FB) foram agrupadas especialmente pela influência positiva dos parâmetros Na, Mg, B, K, condutividade elétrica e SO_4^{2-} . Por outro lado, as amostras que estavam localizadas próximas às geleiras (Pontos C de WB e FB), em temperaturas de aproximadamente 0 °C, foram agrupadas por umidade e nitrogênio total, para *Whalers Bay*, e pH, NO_3^- e P, para *Fumarole Bay*. É provável que compostos derivados de enxofre influenciem positivamente as comunidades microbianas próximas às fumarolas, enquanto compostos derivados de nitrogênio parecem ter mais influência nas comunidades próximas às geleiras. Os efeitos da atividade geotermal na estrutura das comunidades microbianas serão discutidos em detalhes posteriormente através das técnicas de sequenciamento.

Figura 10 - Análise de componentes principais (PCA) correlacionando o número de cópias do gene do RNAr 16S e os parâmetros físico-químicos ambientais. CEC: capacidade de troca de cátions; EC: condutividade elétrica; OM: matéria orgânica; Temp: temperatura ambiental. CP 1: 63,7%; CP 2: 36,3%.

4.4 Sequenciamento do gene do RNAr 16S por Illumina

As amostras de sedimento de *Whalers Bay* e *Fumarole Bay*, na Ilha *Deception*, coletadas ao longo de um gradiente geoquímico e de temperatura, tiveram seu DNA total

extraído e submetido ao sequenciamento do gene do RNAr 16S pela plataforma Illumina MiSeq, no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP), do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Este sequenciamento teve como objetivo analisar a estrutura das comunidades microbianas quanto a sua composição, riqueza e alfa e beta diversidade. Além disso, avaliou-se a correlação dos dados biológicos oriundos do sequenciamento com os parâmetros físico-químicos ambientais. A seguir, a discussão dos resultados do sequenciamento do gene do RNAr 16S será subdividida em: preparo de bibliotecas do gene do RNAr 16S, resultados gerais do sequenciamento, composição taxonômica de bactérias, composição taxonômica de arqueias, diversidade de bactérias, diversidade de arqueias e, por fim, correlação com os parâmetros físico-químicos.

4.4.1 Preparo de bibliotecas do gene do RNAr 16S

Para o sequenciamento do gene do rRNA 16S através da plataforma Illumina MiSeq, foi realizado inicialmente o preparo de bibliotecas deste gene. O primeiro passo consistiu em uma PCR para obtenção dos *amplicons* para bactérias e arqueias, separadamente. É destacado que as amostras FBA1, FBA2 e FBA3, referentes às fumarolas mais quentes de *Fumarole Bay*, apresentaram amplificação somente com os *primers* para o Domínio Archaea (519F-1017R). Estas amostras, oriundas do ponto que apresentou temperatura ambiental mais elevada (98 °C), não haviam sido amplificadas com os *primers* para bactérias e arqueias utilizados no método de PCR quantitativo. É provável que, devido à alta temperatura, poucos grupos microbianos estejam presentes, e as arqueias, especialmente hipertermofílicas, sejam o grupo mais representativo devido à sua capacidade em resistir a temperaturas acima de 80 °C. Além disso, como descrito no *Material e Métodos*, os *primers* 519F-1017R apresentam degenerações que os tornam capazes de detectar alguns grupos taxonômicos que não são amplificados com *primers* que possuem menor abrangência e cobertura, como os utilizados para o PCR quantitativo neste trabalho. As demais amostras foram amplificadas com ambos os *primers* (341F-785R e 519F-1017R). Uma quantidade significativa de dímeros de *primers* foi observada no gel de agarose (Figura 11) (provavelmente devido a formação de estruturas secundárias pelo tamanho dos adaptadores Illumina adicionados às sequências dos *primers*), e por este motivo, as bandas de interesse foram cortadas do gel e purificadas para a obtenção dos *amplicons* específicos.

Figura 11 - Observação dos produtos de PCR de algumas amostras correspondentes ao primeiro passo para a elaboração das bibliotecas do gene RNAr 16S para a plataforma Illumina MiSeq. M: marcador; C-: controle negativo; C+: controle positivo.

Após a purificação, os *amplicons* contendo os adaptadores foram submetidos à segunda PCR, que consistiu na adição de índices específicos para cada amostra, compondo assim, as bibliotecas do gene RNAr 16S para a plataforma Illumina MiSeq. As bibliotecas foram purificadas por *beads* magnéticas, como descrito no Materiais e Métodos, e foram analisadas quanto a sua qualidade por Bioanalyzer 2100 (Agilent). A Figura 12 representa os resultados de algumas amostras gerados pelo Bioanalyzer 2100, correspondentes aos tamanhos dos *amplicons* de bactérias e arqueias. Pode-se observar nesta figura que todas as bibliotecas apresentaram tamanho de *amplicon* esperado e sem nenhum pico significativo de produtos inespecíficos. Após a confirmação do tamanho dos *amplicons*, as bibliotecas foram quantificadas por Qubit 1.0 (Life Technologies) para a realização da normalização a 4 nM. Após normalizadas, a etapa final de *pooling* foi realizada e o *pool* foi quantificado para a confirmação da concentração esperada. As bibliotecas (*pool*) foram, então, enviadas para o sequenciamento (Illumina MiSeq), conforme descrito no Materiais e Métodos.

Figura 12 - Análise em equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent) das bibliotecas do gene RNAr 16S de bactérias, purificadas por *beads* magnéticas. A numeração nos gráficos corresponde às amostras: B1: FBC1, B2: FBC2, B3: FBC3, B4: WBA1, B5:WBA2, B6: WBA3, B7: WBB1, B8:WBB2, B9: WBB3, B10:WBC1, B11:WBC2, B12, WBC3.

4.4.2 Resultados gerais do sequenciamento Illumina MiSeq

Os dados de sequenciamento do gene do rRNA 16S foram analisados utilizando-se ferramentas recentes de bioinformática, como o *software Qiime* e o *pipeline* do *Uparse*. A Tabela 10 exibe os resultados obtidos através destas ferramentas, quanto ao número de *reads* totais, número de *reads* filtradas e número de OTUs por amostra. Foram detectados um total de 5.884 OTUs para Bactéria em todas as amostras de *Deception*, classificadas a partir de 892.381 sequências filtradas do gene do RNAr 16S. O número de OTUs por amostra variou entre 706 e 1.868. Para Archaea, das 599.266 sequências filtradas, somente 55.732 foram assinaladas como Domínio Archaea. A partir das 55.732 sequências, foram classificadas 120 OTUs, variando entre 4 a 44 OTUs por amostra. Os resultados de classificação taxonômica das OTUs e os índices de alfa e beta diversidade serão discutidos em detalhes a seguir.

Tabela 10 - Resultados obtidos após a análise dos dados de sequenciamento do gene do rRNA 16S para Bacteria e Archaea, quanto ao número de reads totais, número de reads após o filtro de qualidade e número de OTUs, em cada amostra analisada.

	Bacteria			Archaea			
	NReads	Filtrados	N de OTUs	NReads	Filtrados	Selecionados*	N de OTUs
FBA1	ND	ND	ND	169.277	127.273	4.182	8
FBA2	ND	ND	ND	70.559	6.964	5.337	4
FBA3	ND	ND	ND	144.019	52.828	3.100	7
FBB1	37.931	25.600	706	175.342	139.023	2.357	13
FBB2	37.477	24.635	833	119.964	97.258	2.177	10
FBB3	58.014	35.294	764	115.192	14.925	3.697	24
FBC1	161.087	106.243	1.682	74.356	8.563	940	24
FBC2	128.959	82.751	1.041	63.629	5.598	776	44
FBC3	119.478	69.528	1.307	60.569	8.659	478	26
WBA1	194.492	133.217	1.801	88.069	18.618	2.700	35
WBA2	84.059	58.765	1.215	128.342	30.102	6.331	17
WBA3	136.892	93.168	1.678	135.321	28.420	6.877	17
WBB1	136.826	90.540	1.868	155.253	31.627	8.394	26
WBB2	65.273	34.155	1.607	84.347	17.499	5.942	18
WBB3	99.547	68.760	1.535	97.202	11.798	2.444	26
WBC1	123.190	80.280	893	505	11	NI	NI
WBC2	143.635	90.127	927	1.331	51	NI	NI
WBC3	173.552	105.113	930	1.422	49	NI	NI
TOTAL	1.700.412	1.098.176	5.884	1.684.699	599.266	55.732	120

*reads selecionados referentes ao Domínio Archaea

ND: não foram detectadas bactérias durante a amplificação com os *primers* empregados

NI: não foram identificadas sequências de arqueias nessas amostras

4.4.3 Composição taxonômica das comunidades para o Domínio Bacteria

A composição taxonômica será discutida primeiramente reunindo os resultados de todas comunidades de *Deception*. Serão discutidos, então, os Filos ubíquos em *Deception*, ou seja, aqueles abundantes em todas as amostras analisadas. Em seguida, os Filos preferencialmente abundantes nas geleiras e o mesmo para as fumarolas. Será também discutido a classificação taxonômica das OTUs mais abundantes ao nível de gênero. Ainda, a composição das comunidades de *Deception* serão comparadas com outros ambientes geotermiais.

4.4.3.1 Composição taxonômica da Ilha Deception

As 892.381 sequências amplificadas com os *primers* para Domínio Bacteria apresentaram um total de 48 Filos ao longo de todas as amostras, classificados a partir de 5.884 OTUs. Os Filos que apresentaram abundância relativa $> 0,1\%$, considerando todas as comunidades bacterianas de *Deception*, foram Proteobacteria, Bacteroidetes,

Actinobacteria, Verrucomicrobia, Caldithrix, Planctomycetes, Chloroflexi, Acidobacteria e OD1, e suas abundâncias relativas estão descritas na Figura 13. O Filo Proteobacteria compreendeu 48% das sequências analisadas, sendo que a maior parte foi classificada nas Classes Gammaproteobacteria (26%) e Alphaproteobacteria (12%), seguidos de Betaproteobacteria (7%), Deltaproteobacteria (2%) e Epsilonproteobacteria (1%). O segundo Filo mais abundante foi Bacteroidetes (19%), seguido de Actinobacteria, Verrucomicrobia e Caldithrix, todos com 6% de abundância relativa. Planctomycetes apresentou 5% de abundância relativa, seguido de Chloroflexi (3%), Acidobacteria (2%) e OD1 (1%). Os Filos que exibiram abundância relativa $< 0,1\%$ foram destacados como “Outros” na Figura 13 e juntos compreenderam 4% da abundância relativa total. A composição dos Filos para cada amostra analisada em *Deception* está ilustrada da Figura 14 e será discutida em detalhes a seguir.

Figura 13 - Abundância relativa dos Filos do Domínio Bacteria considerando todas as amostras de *Deception*. Estão representados os Filos que apresentaram valores maiores que 0,1%. Para Proteobacteria estão representadas as Classes deste Filo.

4.4.3.2 Filos distribuídos nas geleiras e fumarolas de *Deception*

Os micro-organismos possuem diferentes meios de se dispersarem no ambiente, como através do movimento das marés, do *spray* marinho ou mesmo por meio dos ventos intensos característicos do ambiente antártico. Ao se dispersarem, os micro-organismos mais versáteis são capazes de crescer, proliferar, ou ainda, manter um estado latente a espera de condições mais favoráveis. A seguir serão descritos os Filos abundantes distribuídos em todas as amostras analisadas, indicando sua versatilidade adaptativa ao longo dos gradientes ambientais (Figura 14).

Os Filos Proteobacteria, Planctomycetes e Bacteroidetes mostraram-se abundantes tanto nas geleiras quanto nas fumarolas de *Deception*. Destes, Proteobacteria foi o mais abundante, compreendendo cerca de 50% da composição taxonômica total de cada amostra. Os membros deste Filo são comumente os mais abundantes em amostras de solo e sedimento e estão presentes e adaptados aos mais variados ambientes, tanto terrestres quanto aquáticos. Sharp et al., (2014) realizaram um estudo sobre a diversidade microbiana ao longo de gradientes de temperatura (7,5 a 99 °C) em sítios geotermiais na Nova Zelândia e Canadá e também relataram a distribuição do Filo Proteobacteria em todas as temperaturas analisadas.

Os Filos Bacteroidetes e Planctomycetes também demonstraram ampla distribuição ao longo do gradiente de temperatura. Ambos os Filos já foram detectados em inúmeros *habitats* geograficamente diversos, inclusive em solos antárticos (COWAN, 2014). O Filo Planctomycetes é composto por membros que habitam diversos ambientes terrestres e aquáticos, especialmente marinhos, e apresentam algumas características peculiares, como ausência de peptidoglicanos em sua parede celular e algumas compartimentalizações intracelulares, denominadas nucleóides, que são análogas ao envoltório nuclear das células eucarióticas e estão presentes sobretudo no gênero *Gemmata* (FUERST; SAGULENKO, 2011). Algumas espécies desse Filo atuam em papéis importantes no ciclo do nitrogênio, especialmente no processo de oxidação de amônia. O Filo Planctomycetes apresentou distribuição ubíqua em *Deception*, provavelmente devido a influência do ambiente marinho, tanto nos sedimentos próximos das fumarolas, que muitas vezes são inundados dependendo das condições de maré, quanto nos associados às geleiras, que estão a poucos metros das regiões entremarés.

O Filo Bacteroidetes é composto por membros que habitam os mais diversos ambientes, como solos, sedimentos e coluna d'água. São membros importantes do

bacterioplâncton, principalmente por possuírem proteorodopsina e capacidade fotossintética (FERNÁNDEZ-GÓMEZ et al., 2013). Do mesmo modo que o Filo Planctomycetes, é provável que a distribuição ubíqua do Filo Bacteroidetes seja também devido à influência marinha em todos os sedimentos de *Deception*.

Figura 14 - Abundância relativa dos Filos de Bacteria que exibiram valores maiores que 0,1%.

4.4.3.3 Filos abundantes nas geleiras de *Deception*

Os Filos Verrucumicrobia, Actinobacteria, OD1, FBP, Acidobacteria, TM7, Nitrospirae, Gemmatimonadetes e Elusimicrobia foram preferencialmente abundantes nas amostras próximas às geleiras em *Fumarole Bay* (FBC1, FBC2 e FBC3) e *Whalers Bay* (WBC1, WBC2 e WBC3) (Figura 14). Comparando ainda as amostras associadas às geleiras, os Filos Acidobacteria, Gemmatimonadetes, Nitrospirae e Elusimicrobia foram mais abundantes nas amostras próximas à geleira de *Fumarole Bay* (FBC1, FBC2 e FBC3), e os Filos FBP e TM7, exibiram maior abundância no solo próximo à geleira de *Whalers Bay* (WBC1, WBC2 e WBC3). Muitos destes Filos já foram observados como os mais

abundantes nos ambientes de solo da Antártica. Bottos et al., (2014) descreveram que os Filos Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Gemmatimonadetes, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucumicrobia e Chloroflexi, são frequentemente detectados na região da Península Antártica. No presente trabalho, observou-se nas amostras próximas às geleiras, além destes descritos por Bottos et al., (2014), os Filos Elusimicrobia, OD1, FBP, TM7 e Nitrospirae. A seguir serão discutidos em mais detalhes os alguns Filos detectados como abundantes nas amostras associadas às geleiras.

O Filo Elusimicrobia é composto por membros que foram inicialmente descritos como Filo Candidato *Termite Group 1*, pois a maioria de seus membros eram considerados endossimbiontes de protistas presentes no trato gastro-intestinal de formigas. Contudo, análises recentes descrevem que as linhagens desse Filo estão presentes em *habitats* geograficamente e quimicamente distintos, incluindo principalmente solos e sedimentos (HERLERMAN et al., 2007).

Características ecológicas e metabólicas do Filo Candidato OD1 não foram descritas em detalhes até o momento, uma vez que seus membros nunca foram cultivados e somente parte de seus genomas foram recuperados. Ainda assim, os poucos dados a respeito desse grupo revelam que eles foram detectados preferencialmente em ambientes ricos em enxofre e anóxicos, e podem estar relacionados com a presença de metano e amônia no ambiente (PEURA et al., 2012). As amostras associadas às geleiras foram as únicas abundantes quanto a este Filo (OD1). Os resultados físico-químicos indicaram que amônia está presente em maiores concentrações nessas amostras. Além disso, como será descrito nos resultados a seguir para o Domínio Archaea, as amostras próximas às geleiras apresentaram grupos abundantes de arqueias metanogênicas. É provável que a abundância de OD1 nos sedimentos próximos às geleiras esteja relacionada com a presença de amônia e de arqueias metanogênicas.

Os membros do Filo TM7 foram descritos em diferentes tipos de solo, como turfas (solos pantanosos), solos da floresta amazônica, e em ambientes aquáticos (marinhos e lacustres) (HUGENHOLTZ et al., 2001). Winsley et al., (2014) detectaram o Filo TM7 em centenas de amostras de solo do Ártico e da Antártica, e avaliaram os fatores ecológicos que controlam a sua presença nestes ambientes polares. Essencialmente, duas classes deste Filo requerem condições ambientais distintas: TM7-1 é estimulada pela presença de ferro e baixas concentrações de oxigênio, enquanto TM7-2 está presente em ambientes mais alcalinos, com altas concentrações de fosfato e que geralmente contenham hidrocarbonetos

(WINSLEY et al., 2014). De acordo com as condições ambientais em *Deception*, é provável que o grupo TM7-1 seja o mais abundante nas amostras associadas às geleiras.

O Filo Nitrospirae contém somente uma Classe (Nitrospira), Ordem (Nitrospirales) e Família (Nitrospiraceae). É composto por bactérias oxidadoras de nitrito (BON) que realizam metabolismo quimiolitotrófico. Estudos recentes utilizando métodos independentes de cultivo descrevem que este é o mais abundante e diverso grupo de bactérias que atuam na nitrificação (LÜCKER et al., 2010). Foram descritas em diversos ambientes, como solos, sedimentos, nos oceanos e em *hot springs*. Recentemente, algumas bactérias magnetotáticas foram descobertas e classificadas dentro do Filo Nitrospirae, como *Candidatus Magnetobacterium bavaricum*, encontrada em sedimentos dos lagos *Chiemsee* e *Ammersee*, no sul da Alemanha (LEFÈVRE et al., 2011).

Membros do Filo Verrucomicrobia são encontrados em diferentes tipos de solo e em ambientes de água doce. Assim como o Filo OD1, alguns membros de Verrucomicrobia também podem estar relacionados com a presença de metano no ambiente, inclusive algumas espécies atuam na oxidação de metano (metanotrofia) (DUNFIELD et al., 2007). Possuem baixa tolerância a salinidade e é provável que, por este motivo, não são abundantes nos sedimentos próximos às fumarolas de *Deception*, que possuem maior influência marinha e conseqüentemente, maior concentração de sais.

Actinobacteria é um dos Filos mais dominantes nos mais diversos tipos de solo e trabalhos recentes indicam que membros deste grupo são também abundantes em ambientes de água doce (GHAI et al., 2011). São geralmente sensíveis a altas temperaturas. Sharp et al., (2014) avaliaram a abundância microbiana em diversas fontes geotermiais, com temperaturas entre 10 e 99 °C, e observaram que Actinobacteria era abundante somente até 70 °C. Em *Deception* também se observou que nas fumarolas de até 50 °C a abundância de Actinobacteria mostrou-se menor do que no sedimento próximo à geleira, e nas fumarolas acima de 50 °C, a abundância deste Filo foi ainda mais baixa.

Acidobacteria é um Filo com membros fisiologicamente diversos e ubíquos e com alguns membros acidófilos. É um dos grupos mais difundidos e abundantes da Terra, e apesar disso, o conhecimento do papel destes organismos no funcionamento dos ecossistemas permanece surpreendentemente rudimentar. Alguns membros são aeróbios, microaerofílicos ou anaeróbios facultativos, e ainda, podem ser fotossintéticos, como os da Classe Chloracidobacteria (KIELAK et al., 2016). Acidobacteria foi mais abundante nos sedimentos associados às geleiras de *Fumarole Bay*.

O Filo Gemmatimonadetes é composto por membros que habitam especialmente

solos, mas alguns grupos estão também presentes em ambientes de água doce. Estudos sugerem que alguns organismos deste Filo são adaptados a baixa disponibilidade de água, condição muito comum em ambientes gelados próximos de geleiras, onde a água encontra-se especialmente aprisionada na forma de gelo (DeBRUYN et al., 2011). Este Filo mostrou-se mais abundante nos sedimentos da geleira de *Fumarole Bay*.

FBP é um Filo candidato e ainda pouco se sabe sobre as características gerais e fisiologia de seus membros. Em trabalho recente, Tytgat et al., (2016) detectaram este Filo como abundante em amostras de solo nas montanhas Sor Rondane, no Leste antártico, indicando que provavelmente, estes organismos são adaptados a regiões polares. O Filo FBP mostrou-se mais abundante nos sedimentos da geleira de *Whalers Bay*.

4.4.3.4 Filos abundantes nas fumarolas de Deception

Os Filos preferencialmente abundantes nas amostras próximas às fumarolas de *Fumarole Bay* e *Whalers Bay* foram *Caldithrix* e *Chloroflexi* (Figura 14). *Caldithrix* é um Filo recentemente proposto, cujos membros eram classificados dentro do Filo Deferribacteres. Os organismos classificados nesse Filo são anaeróbios, quimiolitotróficos ou quimiorganotróficos (MIROSHNICHENKO et al., 2003). Além disso, são termofílicos e halofílicos ou halotolerantes, e por esse motivo são frequentemente encontrados em nichos marinhos, especialmente em ambientes de temperatura elevada e ricos em compostos de enxofre e ferro, como os ventos hidrotermais de oceano profundo (TAKAKI et al., 2010). Membros do Filo *Caldithrix* foram detectados em amostras principalmente de oceano profundo, como água de reservatórios de petróleo na sub-superfície (2000 m de profundidade) (GREENE et al., 1997), em ventos hidrotermais no Japão (TAKAKI et al., 2010) e ventos hidrotermais na dorsal Meso-Atlântica (MIROSHNICHENKO et al., 2003), e também em sistemas geotermiais em Edipso na Grécia (KORMAS et al., 2009).

Caldithrix exibiu maior abundância nas amostras próximas às fumarolas de *Whalers Bay* (WBA1, WBA2, WBA3, WBB1, WBB2 e WBB3), apesar de também estar presente em menor abundância nas fumarolas de *Fumarole Bay* (FBB1, FBB2 e FBB3). Miroshnichenko et al., (2010) descreveram que a temperatura ótima para a espécie *Caldithrix palaeochoryensis* é entre 40 e 65 °C. É possível que, por este motivo, *Caldithrix* não seja abundante nas fumarolas de *Fumarole Bay*, que exibiram temperatura

em torno de 80 °C. Por outro lado, as fumarolas de *Whalers Bay* exibiram temperatura de até 50 °C, dentro do ótimo para *Caldithrix palaeochoryensis*. A presença de *Caldithrix*, sobretudo em ambientes próximos às fumarolas de até 50 °C, demonstra o nicho específico em que estes organismos estão presentes.

O Filo Chloroflexi, composto por bactérias filamentosas verdes não sulfurosas, podem realizar fotossíntese anoxigênica ou respiração, dependendo da disponibilidade de O₂ no ambiente. Ao contrário de *Caldithrix*, membros que Chloroflexi são frequentemente aeróbios. São muito comuns em ambientes termais, especialmente em sítios geotermiais superficiais, mas foram também encontradas em diversos ambientes aquáticos, demonstrando grande contribuição para o ciclo do carbono (HUG et al., 2013). Chloroflexi foi detectado em todas as amostras associadas às fumarolas de *Whalers Bay* e *Fumarole Bay*, mas em maior abundância nas fumarolas de *Fumarole Bay* (FBB1, FBB2 e FBB3). Ainda, foi detectado em baixa abundância também na geleira de *Fumarole Bay* (FBC1, FBC2 e FBC3). É provável que, pela proximidade, muitos organismos sejam dispersos pelos ventos intensos característicos do ambiente antártico, o que pode explicar a presença de alguns termófilos em amostras de temperatura fria (0 °C). Ou mesmo, o Filo Chloroflexi pode estar presente também em ambientes de baixas temperaturas e sua distribuição pode ser mais ampla do que se imaginava, como demonstrado por Hug et al., (2013), que encontraram membros desse Filo, por exemplo, em sedimentos não termais de água doce.

4.4.3.5 Classificação das sequências ao nível de gênero

A classificação das sequências mais abundantes (> 0,1%) ao nível de gênero para o Domínio Bacteria encontra-se na Figura 15. Essa figura também exhibe o número de sequências detectadas em cada gênero, por amostra analisada. Na Tabela 11 estão listadas as classificações taxonômicas até gênero das 50 OTUs mais abundantes. Das sequências analisadas, 56% foram classificadas em 52 gêneros distintos. 44% das sequências não foram classificadas em gênero. Os gêneros mais abundantes nas amostras das fumarolas foram *Thalassomonas*, *Antarcticicola*, *Anaerospira*, *Sulfitobacter*. As fumarolas de *Whalers Bay* também exibiram como abundantes *Gaetbulibacter*, *Oceanicella* e *Maribacter*, e as fumarolas de *Fumarole Bay*, *Loktanella*, *Marinicella* e *Octadecabacter*. Para as geleiras, os gêneros mais abundantes foram *Flavobacterium*, *Luteolibacter*,

Rhodferax e *Polaromonas*. A geleira de *Fumarole Bay* foi também abundante em *Novosphingobium*, *Gallionella*, *Kaistobacter*, *Nitrospira* e *Methylothera*, e as geleiras de *Whalers Bay* em *Rhodanobacter*, *Dokdonella*, *Hydrogenophaga* e *Arthrobacter*.

Figura 15 - Classificação taxonômica das OTUs com abundância relativa maior que 0,1%, ao nível de gênero. O tamanho das bolhas indica o número de sequências classificadas em cada gênero ou não classificadas (*Unclassified*).

Tabela 11 - Classificação taxonômica até gênero das 50 OTUs mais abundantes em *Deception*.

	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
OTU7	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	<i>Luteolibacter</i>
OTU4	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	<i>Luteolibacter</i>
OTU23	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Rhodanobacter</i>
OTU29	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Dokdonella</i>
OTU35	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Dokdonella</i>
OTU74	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Psychrobacter</i>
OTU21	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Hahellaceae	Unclassified
OTU17	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Unclassified	Unclassified
OTU25	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Unclassified	Unclassified
OTU2	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Colwelliaceae	<i>Thalassomonas</i>
OTU70	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Colwelliaceae	<i>Thalassomonas</i>
OTU53	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Unclassified	Unclassified	Unclassified
OTU28	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Gallionellales	Gallionellaceae	<i>Gallionella</i>
OTU62	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Rhodiferax</i>
OTU33	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Polaromonas</i>
OTU20	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Polaromonas</i>
OTU9	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Unclassified
OTU61	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Novosphingobium</i>
OTU96	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Kaistobacter</i>
OTU41	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Sulfotobacter</i>
OTU24	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Oceanicella</i>
OTU104	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Loktanella</i>
OTU5	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Antarcticicola</i>
OTU63	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae	Unclassified
OTU15	OD1	ZB2	Unclassified	Unclassified	Unclassified
OTU43	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Ellin5301	Unclassified
OTU8	Chloroflexi	Anaerolineae	Caldilineales	Caldilineaceae	Unclassified
OTU3	Caldithrix	Caldithrixae	Caldithrixales	BA059	Unclassified
OTU11	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Psychroserpens</i>
OTU13	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Maribacter</i>
OTU6	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Gaetbulibacter</i>
OTU10	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>
OTU108	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>
OTU16	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>
OTU14	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>
OTU22	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Unclassified
OTU26	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Unclassified
OTU52	Bacteroidetes	Saprospirae	Saprospirales	Chitinophagaceae	Unclassified
OTU83	Bacteroidetes	Saprospirae	Saprospirales	Chitinophagaceae	Unclassified
OTU81	Bacteroidetes	Saprospirae	Saprospirales	Chitinophagaceae	Unclassified
OTU1482	Bacteroidetes	Saprospirae	Saprospirales	Chitinophagaceae	Unclassified
OTU715	Bacteroidetes	Saprospirae	Saprospirales	Chitinophagaceae	Unclassified
OTU18	Bacteroidetes	Saprospirae	Saprospirales	Chitinophagaceae	Unclassified
OTU37	Bacteroidetes	Saprospirae	Saprospirales	Chitinophagaceae	Unclassified
OTU93	Actinobacteria	Thermoleophila	Solirubrobacterales	Unclassified	Unclassified
OTU115	Actinobacteria	Thermoleophila	Solirubrobacterales	Unclassified	Unclassified
OTU45	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Sporichthyaceae	Unclassified
OTU19	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>
OTU121	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	Unclassified
OTU38	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Intrasporangiaceae	Unclassified

Os gêneros mais abundantes nas fumarolas, como *Thalassomonas*, *Antarcticicola*, *Sulfotobacter*, *Gaetbulibacter*, *Oceanicella*, *Maribacter*, *Loktanella*, *Marinicella* e *Octadecabacter*, foram detectados principalmente em *habitats* marinhos, tanto costeiros

quanto oceânicos, inclusive na Antártica (SUNAGAWA et al., 2015; YANG; CHO, 2008; ZENG et al., 2014). O Gênero *Thalassomonas*, membro da Classe Gammaproteobacteria, havia sido relatado principalmente em ambientes marinhos tropicais e costeiros (BOWMAN; McMEEKIN, 2005), contudo, trabalhos recentes detectaram estes organismos em sedimentos profundos no estreito de Gerlache, Antártica (LÓPEZ-GARCÍA et al., 2001) e em fontes hidrotermais superficiais na Ilha *Panarea*, Itália (LENTINI et al., 2014). *Octadecabacter* já foi amplamente descrita em regiões polares marinhas, tanto na coluna d'água, quanto em gelo marinho da Antártica e do Ártico (GOSINK et al., 1997). *Oceanicella* é um gênero encontrado em ambientes marinhos e considerado halofílico e termofílico, com temperatura de crescimento entre 25 e 57 °C (ALBUQUERQUE et al., 2012). *Sulfitobacter* é um gênero com membros também halofílicos, capaz de oxidar compostos de enxofre, como o sulfito (LABRENZ et al., 2000). A presença de bactérias marinhas halofílicas, termofílicas e psicrofílicas nas fumarolas de *Whalers Bay* e *Fumarole Bay* é explicada pela influência marinha, geotermal e polar nas comunidades de *Deception*.

Destaca-se ainda, que os Filos *Caldithrix* e *Chloroflexi*, abundantes nas fumarolas, não foram classificados ao nível de gênero (Tabela 11), provavelmente devido às poucas informações depositadas nos bancos de dados a respeito desses grupos. O Filo *Caldithrix* possui até o momento somente o gênero *Caldithrix*. Portanto, é provável que as OTUs detectadas para o Filo *Caldithrix* em *Deception* façam parte deste ou ainda de gêneros não descritos. Os membros conhecidos dentro do gênero *Caldithrix* são termófilos, anaeróbicos estritos, especialmente descritos em ambientes aquáticos e podem utilizar H₂ como doador de elétrons para a redução de NO₃⁻ a NH₃. Fedorov et al., (2005) sugerem que os mecanismos enzimáticos de *Caldithrix* facilitam uma rápida troca entre o metabolismo fermentativo e a respiração anaeróbia, permitindo que este organismo habite os ambientes com gradientes oxidativos característicos dos ventos hidrotermais de oceano profundo. Contudo, a sua função no ambiente ainda é pouco conhecida e poucos trabalhos relataram a presença do gênero *Caldithrix* em ambientes antárticos. Murray et al., (2011), através da técnica de clonagem, encontraram sequências relacionadas à *Caldithrix* em amostras da coluna d'água a 500 m de profundidade, no norte do Mar de *Weddell* (Antártica). Até o momento, os organismos termófilos do gênero *Caldithrix* não foram encontrados nos sítios geotermiais do continente antártico e o trabalho de Murray et al., (2011) foi único que relatou a presença deste gênero na Antártica. Esse resultado sugere que provavelmente a influência marinha faz com que a Ilha *Deception* abrigue uma

composição microbiana única para os sítios geotermiais antárticos, que são, em sua maioria, continentais.

Os gêneros abundantes nas geleiras, como *Flavobacterium*, *Luteolibacter*, *Rhodoferrax* e *Polaromonas*, são compostos por membros principalmente detectados em solos, inclusive solos da Antártica, e a maior parte deles são classificados como psicrófilos ou psicrotolerantes. Muitos isolados de *Flavobacterium* foram obtidos em diversos ambientes antárticos, como no gelo marinho, em lagos e esteiras microbianas, e apresentaram adaptação a baixas temperaturas, sendo caracterizados como psicrófilos (McCAMMON; BOWMAN, 2000; TRAPPEN et al., 2003; YI et al., 2005). Stanley e Rose (1967) isolaram bactérias do gênero *Flavobacterium* em cinco lagos de *Deception*, o que indica a abundância deste gênero no ambiente de estudo. Algumas espécies de *Flavobacterium* são patógenos de peixes, contudo, membros deste gênero parecem demonstrar um papel essencial nos processos de remineralização por exibirem grande capacidade hidrolítica (HUMPHRY et al., 2001). O gênero *Polaromonas* é composto por organismos essencialmente psicrófilos, globalmente distribuídos em *habitats* glaciais, como gelo glacial, gelo marinho e sedimentos sub-glaciais. Foram observados em amostras associadas à diversas geleiras no Alasca, Andes, Himalaia, Nova Zelândia e na Antártica (Geleira *Collins*) (DARCY et al., 2011). *Rhodoferrax* e *Gallionella* são compostos por membros relacionados à redução e oxidação de Ferro, respectivamente (FINNERAN et al., 2003; WANG et al., 2009).

Os gêneros *Rhodanobacter* e *Dokdonella*, abundantes nas geleiras de *Whalers Bay*, já foram descritos em regiões polares. *Rhodanobacter* está relacionado com *habitats* de baixas temperaturas e com o ciclo do nitrogênio (denitrificação) (BARAHONA et al., 2014; PRAKASH et al., 2012), e o gênero *Dokdonella* foi descrito em solos antárticos na região do Mar de Ross, na Antártica (AISLABIE et al., 2009). *Methylobacter* é composta por membros metilotróficos e também está relacionada com a denitrificação (SALCHER et al., 2015).

Apesar dos ambientes próximos às geleiras de *Whalers Bay* e *Fumarole Bay* apresentarem uma composição muito semelhante entre si, alguns gêneros são exclusivos de um ou outro ambiente. Por outro lado, os ambientes próximos às fumarolas de *Whalers Bay* e *Fumarole Bay* parecem exibir uma composição microbiana mais similar, mesmo estando a quilômetros de distância um do outro. É provável que a influência geotermal e marinha selecione grupos específicos de organismos que são capazes de suportar a salinidade e as altas temperaturas presentes em uma região polar, com temperaturas

baixas prevalentes. É importante ressaltar, ainda, que as triplicatas de coleta apresentaram um padrão muito fiel entre si, aumentando a confiança dos resultados obtidos quanto à composição microbiana.

4.4.3.6 Comparação entre *Deception* e outros ambientes geotermais

Poucos trabalhos foram realizados em *Deception* para o estudo de suas comunidades microbianas e apenas um trabalho (MUÑOZ et al., 2011) utilizou-se de métodos moleculares para descrevê-las. Muñoz et al., (2011) utilizaram a técnica de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) para avaliar a estrutura das comunidades microbianas em *Fumarole Bay* e nove bandas do gel de DGGE foram sequenciadas, revelando a presença de somente três grupos microbianos: *Bacillus*, Deltaproteobacteria redutoras de sulfato e Filo Thermus/Deinococcus. O presente trabalho é o primeiro a descrever as comunidades microbianas de *Deception* através de métodos moleculares de sequenciamento de nova geração. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram a importância da utilização de novas ferramentas moleculares capazes de revelar uma composição microbiana mais fidedigna à encontrada no ambiente. Os métodos de sequenciamento massivos e o desenvolvimento de novos *primers* permitem o acesso a grupos raramente detectados com ferramentas menos robustas, podendo fornecer novas informações a respeito da presença e função destes grupos no ambiente.

Devido à escassez de trabalhos em *Deception* para que os resultados da composição de Filos possam ser comparados, a seguir serão discutidos alguns dos principais Filos detectados em sítios geotermais do continente antártico e uma breve comparação com sítios geotermais localizados em outros continentes.

Um dos poucos trabalhos que exploraram as comunidades microbianas em sítios geotermais na Antártica foi realizado por Soo et al., (2009) em solos minerais quentes de *Tramway Ridge* no vulcão Monte *Erebus*, localizado na região de *Ross Island* no continente antártico. A principal composição das emissões gasosas em *Tramway Ridge* é CO₂, enquanto em *Deception* as fumarolas são compostas também por gases sulfurosos, essencialmente H₂S. Outras diferenças entre *Tramway Ridge* e *Deception* são (i) a temperatura máxima detectada nas fumarolas superficiais, que é em torno de 60 °C para *Tramway Ridge* e 100 °C para *Deception*; e (ii) a influência do ambiente marinho em *Deception* que pode resultar em muitas diferenças nas características físico-químicas

ambientais, especialmente salinidade e nutrientes. O trabalho de Soo et al., (2009) utilizou técnicas moleculares de *fingerprinting* (ARISA - *Automated rRNA intergenic spacer analysis*) e clonagem do gene do RNAr 16S e sequenciamento Sanger. Os principais Filos que eles encontraram foram Cyanobacteria, Planctomycetes, Acidobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Deinococcus-Thermus, OP10 e Chloroflexi. Embora as técnicas descritas acima sejam muito distintas das empregadas neste trabalho, muitos Filos foram comuns entre as amostras de *Tramway Ridge* e as fumarolas de *Deception*, como Planctomycetes e Chloroflexi. Nas geleiras de *Deception*, foram detectados também os Filos Acidobacteria e Actinobacteria.

Sharp et al., (2014) avaliaram os efeitos de gradientes de temperatura (7,5 a 99 °C) nas comunidades microbianas de sítios geotermiais da Nova Zelândia e Canadá, por meio da técnica de pirosequenciamento. Eles observaram que os Filos Cyanobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Planctomycetes apresentaram ampla distribuição de acordo com a temperatura, estando presentes em amostras de 7,5 e 99 °C, com exceção de Cyanobacteria que foi encontrada em amostras de até 70 °C, provavelmente devido à temperatura limite para a fotossíntese de 73 °C, sobretudo devido à instabilidade térmica dos intermediários do Ciclo de Calvin (BERG, 2011). Nas análises de *Deception* deste trabalho, somente Proteobacteria, Bacteroidetes e Planctomycetes apresentaram ampla distribuição de acordo com a temperatura. Ainda, Sharp et al., (2014) obtiveram grande abundância de Deinococcus-Thermus, Firmicutes, Chloroflexi, Aquificae, Thermotogae, Proteobacteria e Filo Candidato GAL08 nas temperaturas entre 60 e 80 °C, enquanto em *Deception*, dentre estes, somente os Filos Chloroflexi e Proteobacteria foram abundantes nas amostras próximas às fumarolas. Na maior parte dos ambientes geotermiais marinhos e terrestres, Aquificae e Thermotogae são descritos como Filos abundantes (LEBEDINSKY et al., 2007), e em *Deception*, pouquíssimas sequências desses organismos foram detectadas. Esses organismos foram principalmente detectados em ambientes termais levemente alcalinos, com emissões gasosas compostas sobretudo de CO₂ (MILLER et al., 2009). Dessa forma, é provável que Aquificae e Thermotogae não estejam presentes em *Deception* por serem sensíveis aos gases sulfurosos emitidos pelas fumarolas.

Ainda, Sharp et al., (2014) observaram que o Filo Actinobacteria se mostrou menos abundante em temperaturas acima de 70 °C, o que foi observado também nas amostras de *Deception* analisadas neste trabalho. Além disso, observa-se que os Filos Calditrix e Chloroflexi, abundantes especialmente nas amostras próximas às fumarolas de *Whalers*

Bay e *Fumarole Bay*, não foram detectados em nenhum dos ambientes geotermiais superficiais descritos acima (*Tramway Ridge* no Monte Erebus, Antártica, ou nos sítios geotermiais do Canadá e Nova Zelândia). Como descrito anteriormente, os membros do Filo *Caldithrix* foram principalmente detectados em ventos hidrotermais de oceano profundo ou sistemas geotermiais marinhos de regiões rasas (KORMAS et al., 2009; MIROSHNICHENKO et al., 2003; TAKAKI et al., 2010).

Desse modo, os resultados demonstraram que as comunidades microbianas em *Deception* são compostas por Filos comumente encontrados em ambientes antárticos frios e geotermiais do continente, mas também por Filos não comuns em ambientes antárticos, como os descritos em sítios geotermiais de outros continentes e em ventos hidrotermais do oceano profundo. Essa composição única reflete o mosaico de condições ambientais (especialmente geoquímicas e de temperatura) produzidas pelo efeito do vulcanismo em uma região polar e influenciada pelo ambiente marinho.

4.4.4 Composição taxonômica das comunidades para o Domínio Archaea

Da mesma forma que para o Domínio Bacteria, a composição taxonômica de Archaea será discutida primeiramente reunindo os resultados de todas comunidades de *Deception*. Para Archaea, não serão discutidos os Filos presentes tanto nas geleiras, quanto nas fumarolas, uma vez que não foi observado a presença de Filos abundantes ao longo de todas as amostras. Será discutido, portanto, os Filos abundantes nas fumarolas e geleiras separadamente. Ainda, será exposto a classificação taxonômica das OTUs ao nível de gênero e a comparação das comunidades de Archaea de *Deception* com outros ambientes geotermiais.

4.4.4.1 Composição taxonômica da Ilha Deception

O número total de *reads* amplificados para o Domínio Archaea foi 1.684.699. Os *reads* foram filtrados por qualidade, totalizando 599.266 sequências filtradas. Destas, somente 55.732 foram classificadas dentro do Domínio Archaea, distribuídas ao longo das 18 amostras analisadas. A maior parte das sequências (~90%) foram classificadas dentro do Domínio Bacteria, demonstrando que o *primer* empregado não foi específico para Archaea, como as análises *in silico* sugeriram (KLINDWORTH et al., 2013). Os

primers 519F e 1017R contendo as degenerações só haviam sido testados experimentalmente por Gonzalez-Gil et al., (2014), que obtiveram uma cobertura de no máximo 0,07% para bactérias. As condições da PCR e a complexidade do ambiente de estudo podem influenciar a cobertura desses *primers*, e talvez, esses motivos podem ter resultado de um baixo número de sequências de Archaea. Poucos estudos empregaram *primers* específicos para o Domínio Archaea, e até pouco tempo, poucos membros deste domínio eram alcançados com as técnicas utilizadas, o que exige que novos *primers* sejam testados para verificar qual melhor se adequa à complexidade do ambiente de estudo. De qualquer forma, como será demonstrado a seguir, os *primers* empregados neste trabalho para Archaea permitiram a detecção de grupos que, em geral, não são detectados por outros *primers*, principalmente hipertermofílicos.

É importante lembrar que as amostras FBA1, FBA2 e FBA3, próximas à fumarola de *Fumarole Bay* (temperatura ambiental de 98 °C), apresentaram amplificação somente para o Domínio Archaea e os seus resultados quanto à composição microbiana serão revelados a seguir. Nenhuma sequência de Archaea foi detectada nas amostras próximas à geleira de *Whalers Bay* (WBC1, WBC2 e WBC3). Essas amostras já haviam demonstrado, através da técnica de PCR quantitativo, uma abundância de Bacteria muito maior que de Archaea, e é provável que por esse motivo não exibiu amplificação para arqueias com os *primers* empregados.

As 120 OTUs referentes ao Domínio Archaea foram classificadas nos Filos Thaumarchaeota (43%), Crenarchaeota (13%) e Euryarchaeota (42%), tendo 2% das sequências não classificadas em Filo (Figura 16). Dentro de Thaumarchaeota, as sequências foram classificadas nas Ordens Nitrososphaerales (1,8%) e Nitrosopumilales (41,5%). Para Crenarchaeota, todas as sequências foram classificadas dentro da Ordem Desulfurococalles. As sequências referentes à Euryarchaeota foram classificadas nas Ordens Methanomassiliicoccales (18,3%), Haloferacales (20,2%) e 3,4% não foram classificadas em Ordem. Os resultados da composição de Filos e Ordens para cada amostra encontram-se, respectivamente, nas Figuras 17 e 18.

Figura 16 - Abundância relativa dos Filos e Ordens do Domínio Archaea, considerando todas as amostras de *Deception*.

Figura 17 - Abundância relativa dos grupos taxonômicos ao nível de Filo para o Domínio Archaea.

Figura 18 - Abundância relativa dos grupos taxonômicos ao nível de Ordem para o Domínio Archaea.

4.4.4.2 Filos e Ordens abundantes nas geleiras de Deception

As amostras da geleira de *Whalers Bay*, como descrito anteriormente, não exibiram sequências amplificadas para o Domínio Archaea. A técnica de PCR quantitativo mostrou que a abundância de Archaea nessas amostras era baixa, o que provavelmente resultou numa amplificação preferencial para Bacteria com os *primers* de Archaea empregados. As amostras da geleira de *Fumarole Bay* (FBC1, FBC2 e FBC3) foram majoritariamente abundantes em membros do Filo Euryarchaeota (~90%) (Figura 17). A maior parte dos membros de Euryarchaeota foram classificados na Ordem Methanomassilliicoccales da Classe Thermoplasmata (Figura 18). A Classe Thermoplasmata é composta por duas Ordens: Methanomassilliicoccales (Grupo E2) e Thermoplasmatales (Grupo E3). Alguns membros de Thermoplasmata podem ser termofílicos, mesófilos, acidófilos, aeróbios, anaeróbios e/ou metanogênicos. Os membros desse grupo frequentemente habitam ambientes extremos, como fontes geotermiais emissoras de enxofre, mas também já foram detectados no plâncton marinho, em solos de plantação e até mesmo em fezes humanas (IINO et al., 2013). A Classe Thermoplasmata já foi detectada como abundante em geleiras e *permafrosts* da Antártica. Pessi et al., (2015) obtiveram sequências referentes a Ordem Methanomassilliicoccales em solos próximos à Geleira *Wanda*, na Ilha Rei George, Península Antártica. Methanomassilliicoccales é uma Ordem descrita recentemente, composta essencialmente por arqueias metanogênicas (DRIDI et al., 2012). Membros dessa Ordem foram detectados em áreas alagadas, solos, mas também em fluídos do rúmen de animais. Contudo, Söllinger et al., (2016) sugeriram filotipos muito mais diversos nas amostras ambientais.

Os ambientes subglaciais são em grande parte anóxicos e contêm carbono orgânico, que foi aprisionado no momento de acúmulo de gelo da geleira. Essas características criam condições favoráveis para a atividade microbiana, especialmente para a degradação do carbono orgânico via metanogênese. A presença de metanogênicas nos sedimentos subglaciais é de grande importância para as questões de mudanças climáticas, uma vez que o metano produzido pode ser liberado para a atmosfera durante o recuo e derretimento das geleiras (STIBAL et al., 2012).

As arqueias metanogênicas também exibem uma aplicação importante para a Astrobiologia, principalmente as detectadas em ambientes gelados. Muitos pesquisadores sugerem que se houver vida microbiana em Marte, é provável que seja composta por organismos semelhantes aos metanogênicos da Terra. Marte não possui oxigênio

abundante, o que favoreceria um metabolismo anaeróbio, como a metanogênese. Além disso, concentrações de metano foram detectadas na atmosfera de Marte, e ainda é discutido se a origem desse metano é biológica (via metanogênese) ou geológica (MUMMA et al., 2009; PRIETO-BALLESTEROS, 2006). Ainda, se houver organismos metanogênicos em Marte, eles seriam também adaptados às baixas temperaturas do planeta. Por esse motivo, arqueias metanogênicas da Antártica são usualmente aplicadas como modelos para estudar a possibilidade de vida em Marte (KENDRICK; KRAL, 2006; MOROZOVA et al., 2007; SINHA et al., 2016).

4.4.4.3 Filos e Ordens abundantes nas fumarolas de *Deception*

A Composição de Archaea nas fumarolas variou de acordo com a temperatura das mesmas (Figuras 17 e 18). O Filo Thaumarchaeota foi predominantemente abundante nas fumarolas de *Whalers Bay*, de temperaturas de 50 °C (WBA1, WBA2 e WBA3) e 10 °C (WBB1, WBB2 e WBB3). As fumarolas de 50 °C (WBA1, WBA2 e WBA3) exibiram em torno de 80% de abundância de Thaumarchaeota e 20% de Euryarchaeota não classificadas. Já as fumarolas de 10 °C (WBB1, WBB2 e WBB3) exibiram mais de 95% de abundância de Thaumarchaeota. Nas amostras WBA1, WBA2 e WBA3 todas as sequências de Thaumarchaeota foram classificadas na Ordem Nitrosopumilales. Nas amostras WBB1, WBB2 e WBB3, cerca de 80% das sequências de Thaumarchaeota foram classificadas na Ordem Nitrosopumilales e 15% na Ordem Nitrososphaerales. Uma amostra das fumarolas de *Fumarole Bay* de 80 °C (FBB3) exibiu composição semelhante às fumarolas de *Whalers Bay*, sendo basicamente composta pela Ordem Nitrosopumilales (98%). Uma pequena parcela das sequências (0,2%) foi classificada na Ordem Desulfurococcales, que será descrita a seguir. As demais amostras das fumarolas de *Fumarole Bay* de 80 °C (FBB1 e FBB2) foram abundantes no Filo Euryarchaeota, Ordem Haloferacales (98%). Da mesma forma que FBB3, FBB2 exibiu uma pequena parcela de sequências relacionadas a Desulfurococcales (0,1%).

As fumarolas mais quentes (98 °C) detectadas em *Deception* (FBA2 e FBA3), no sítio de *Fumarole Bay*, foram abundantes no Filo Crenarchaeota, Ordem Desulfurococcales (~90%). Aproximadamente 5% das sequências em FBA2 e FBA3 foram relacionadas à Ordem Haloferacales, Filo Euryarchaeota. Ainda, FBA2 exibiu 2% das sequências relacionadas a Nitrosopumilales. A amostra FBA1 exibiu composição

distinta de suas triplicatas de coleta, apresentando 96% das sequências classificadas na Ordem Haloferacales e somente 2% relacionadas a Desulfurococcales.

A diferença entre as triplicatas pode ser explicada por possíveis artefatos do método ou por as arqueias muitas vezes se distribuírem em micro-nichos, fazendo com que a sua estrutura de comunidades se distinga significativamente em distâncias muito próximas (CAO et al., 2012). É pouco provável que essa diferença seja artefato do método empregado, uma vez que algumas triplicatas exibiram composição muito semelhante entre si. Como em *Deception* os gradientes ambientais são muito acentuados em distâncias muito próximas, é possível que as arqueias sejam mais sensíveis à essas variações, principalmente relacionadas à temperatura e demanda de oxigênio. Isso pode ter resultado em composições microbianas distintas nas triplicatas das fumarolas de *Fumarole Bay*, onde as temperaturas são mais elevadas e o calor é perdido rapidamente, favorecendo a presença de diferentes micro-nichos.

A Ordem Nitrosopumilales, abundante nas fumarolas de *Whalers Bay*, foi recentemente proposta por Könneke et al., (2005) e é composta por apenas uma Família (Nitrosopumilaceae). Seus membros estão diretamente relacionados com o ciclo do nitrogênio, especialmente na nitrificação, oxidando amônia em metabolismo quimiolitotrófico. Geralmente estão presentes em ambientes oligotróficos, onde atuam em um papel importante na produção primária e nos ciclos biogeoquímicos. Em ambientes desprovidos de fontes de energia orgânicas e luz solar, a oxidação de amônia contribui para a produtividade primária, e pode explicar o sucesso de alguns membros marinhos de Nitrosopumilales em nichos ecológicos como oceano profundo e águas polares superficiais durante o inverno (KÖNNEKE et al., 2005; LEARMAN et al., 2016).

Alguns trabalhos propuseram que membros de Nitrosopumilales derivaram-se de uma linhagem termofílica e se adaptaram a colonizar regiões de baixas temperaturas. O trabalho de Pessi et al., (2015) detectou membros de Nitrosopumilales como abundantes em solo associado à Geleria Wanda (Ilha Rei George, Península Antártica). Gillan e Denis (2007) descreveram Nitrosopumilales como um grupo abundante em sedimentos do Mar de Weddel e Learman et al., (2016) detectaram esse grupo em sedimentos ao longo de toda a costa oeste da Antártica.

Membros da Ordem Nitrososphaerales eram classificados dentro de Nitrosopumilales até a proposta recente de Tourn et al., (2011), que sugeriram a criação desta nova Ordem. Nitrososphaerales é também composta por membros que realizam metabolismo quimiolitotrófico, participando do ciclo do nitrogênio através da

oxidação da amônia. Membros de Nitrososphaerales foram descritos em alguns ambientes não oligotróficos, sobretudo em *habitats* terrestres, como solos em diferentes regiões, exibindo características que os diferem de Nitrosopumilales. Na Antártica, foram descritos como abundantes em solos tanto da região continental, nos *Dry Valleys* (MAGALHÃES et al., 2014), quanto da região da Península Antártica, em *permafrosts* na Ilha Rei George (KARAEVSKAYA et al., 2014). Nitrososphaerales foi mais abundante nas amostras WBB1, WBB2 e WBB3, mais afastadas da influência marinha que WBA1, WBA2 e WBA3.

A Ordem Haloferacales é composta por uma grande diversidade fenotípica de arqueias halofílicas, capazes de resistir a altas concentrações de sais (de 4 a 30% de salinidade). Foram detectadas em diversos salares e lagos salinos e hipersalinos. Também estão presentes em oceanos com altas concentrações de Cloreto de Sódio, especialmente no gelo marinho. Na Antártica, foram descritas como abundantes sobretudo em lagos subglaciais hipersalinos, como o *Deep Lake*, em *Vestfold Hills* (WILLIAMS et al., 2014), onde as temperaturas atingem -20 °C e o lago encontra-se líquido devido à alta salinidade. Membros de Haloferacales também foram detectados em solos da região dos *Dry Valleys* antárticos (WEI et al., 2015). Thombre et al., (2015) detectaram membros de Haloferacales capazes de responder ao estresse ambiental causado por altas temperaturas, através da expressão de diferentes chaperoninas. Nesse trabalho, Haloferacales foi mais abundante nas amostras das fumarolas de *Fumarole Bay* submersas, de temperatura de 80 °C (FBB1 e FBB2). É possível que sua abundância nessas amostras seja devido à sua capacidade de resposta a altas temperaturas e resistência à salinidade, visto que estão diretamente em contato com o ambiente marinho e as fumarolas.

Da mesma forma que as arqueias metanogênicas, as halofílicas também exibem uma importante aplicação na Astrobiologia, principalmente para a busca de vida em Marte. Muitos trabalhos indicaram a presença de depósitos salinos abundantes em Marte, com magnésio e sódio como os principais cátions, e cloreto e sulfato como os ânions dominantes (OREN et al., 2014). A sonda *Phoenix*, que pousou em Marte em 2008, detectou altas concentrações de percloratos ao longo dos depósitos salinos. A detecção destes depósitos salinos conduziu a especulações sobre a existência de micro-organismos halofílicos em *brines* que podem existir ou terem existido no passado de Marte, quando o clima era mais propício à vida do que atualmente (CLARK; VAN HART, 1981). Descobertas recentes indicaram um fluxo sazonal de água líquida durante o verão marciano, com temperaturas que poderiam atingir entre -23 °C e +23 °C (CHEVRIER;

RIVERA-VALENTIN, 2012). Se de fato os *brines* líquidos existem atualmente em Marte, é possível que sejam habitados por micro-organismos semelhantes aos halófilos da Terra. Inclusive, a presença de percloratos em Marte poderia estimular o crescimento microbiano, uma vez que esses compostos podem servir como acceptor de elétrons para a atividade respiratória no ambiente anaeróbico marciano (OREN et al., 2014).

A Ordem Desulfurococcales é composta por membros essencialmente hipertermófilos, com temperatura ótima de crescimento entre 85 and 106 °C. São anaeróbios, anaeróbios facultativos ou aeróbios (HUBER; STETTER, 2006). Podem realizar metabolismo quimiolitotrófico através da oxidação de H₂ e utilização de enxofre elementar, tiosulfato, nitrato ou nitrito como aceptores de elétrons, usando CO₂ como fonte de carbono. Podem alternativamente realizar organotrofia através da respiração aeróbica ou anaeróbica do enxofre ou pela fermentação de substratos orgânicos (HUBER; STETTER, 2001).

Membros de Desulfurococcales já foram detectados numa variedade de ambientes vulcânicos, tanto marinhos, em regiões rasas ou profundas, quanto terrestres. Os gêneros *Sulfophobococcus*, *Thermosphaera* e *Acidilobus* foram isolados de *hot springs* e outras fontes termais continentais (como no vulcão *Askja*, na Islândia, e em *Yellowstone*, nos EUA) com baixa salinidade e pH ácido para levemente alcalino. Por outro lado, os gêneros *Aeropyrum*, *Ignicoccus*, *Staphylothermus*, *Stetteria*, *Thermodiscus*, *Pyrodictium* e *Hyperthermus* foram detectados em sedimentos marinhos rasos associados a fontes termais, como fumarolas. Os gêneros *Ignicoccus*, *Staphylothermus*, *Pyrodictium* e *Pyrolobus* foram isolados também de ambientes marinhos, contudo de oceano profundo, em ventos hidrotermais e fragmentos de *black smokers*, tanto no Pacífico quanto na Dorsal Mesoatlântica. *Pyrodictium* foi também detectado na zona ativa de um vulcão submarino em erupção (HUBER; STETTER, 2006).

Assim como as arqueias metanogênicas e halofílicas, as hipertermófilas também exibem uma aplicação importante na Astrobiologia, especialmente para estudos sobre os primórdios da evolução microbiana na Terra. Alguns autores sugerem a hipótese de que a vida na Terra Pré-Cambriana (há cerca de 3,9 bilhões de anos) teria os ventos hidrotermais do oceano profundo como um de seus principais *habitats*, e os primeiros organismos teriam sido muito parecidos com as arqueias hipertermófilas modernas, capazes de crescer em temperaturas acima de 100 °C (STETTER, 2013). Akanuma et al., (2013) utilizaram as nucleosídeos difosfato quinases como modelos para estimar, por análises moleculares *in silico*, as temperaturas ideais de crescimento dos ancestrais de

bactérias e arqueias, que se mostraram em torno de 80 e 97 °C. Esta análise sugere uma origem hipertermofílica para os Domínios Bacteria e Archaea, corroborando com as estimativas de temperatura média da Terra no Pré-Cambriano (calculadas pela medição de isótopos de oxigênio em *cherts* marinhos), que variaram de 80 °C há 3,8 bilhões de anos a 70 °C há 3,5 bilhões de anos (SCHWARTZMAN; LINEWEAVER, 2004). Além disso, muitos gêneros hipertermófilos apresentam raízes profundas na árvore filogenética baseada no gene do rRNA 16S, indicando sua origem primordial no planeta (STETTER, 2013).

4.4.4.4 Classificação das sequências ao nível de gênero

A abundância relativa dos gênero detectados para o Domínio Archaea nas amostras de *Deception* encontra-se na Figura 19. O gênero mais abundante (58%) foi *Nitrosopumilus*, seguido de *Haloferax* (16%) e *Pyrodictium* (14%). Os gêneros menos abundantes, considerando todas as amostras, foram *Methanomassiliicoccus* (4%) e *Nitrososphaera* (2%). Uma parte das sequências não foi classificada em gênero (6%), e dentre estas, 5% são correspondentes a membros do Filo Euryarchaeota não classificados. Na Figura 20 estão descritas as classificações das sequências ao nível de gênero para cada amostra analisada. Nas geleiras de *Fumarole Bay* (FBC1, FBC2 e FBC3), o gênero mais abundante foi *Methanomassiliicoccus*. Nas fumarolas de *Whalers Bay*, *Nitrosopumilus* foi o mais abundante. Nas amostras WBB1, WBB2 e WBB3, mais afastadas da influência marinha que WBA1, WBA2 e WBA3, também exibiram abundância do gênero *Nitrososphaera*. As amostras WBA1, WBA2 e WBA3 foram abundantes em membros de Euryarchaeota não classificados em gênero. As amostras da fumarola de *Fumarole Bay* de 80 °C exibiram um grande número de sequências classificadas nos gêneros *Haloferax* e *Nitrosopumilus*. A fumarola de *Fumarole Bay* de 98 °C foram abundantes no gênero *Pyrodictium* e *Haloferax*.

A distribuição dos gêneros exibiu o mesmo padrão para a distribuição das Ordens, uma vez que um gênero foi classificado dentro de cada Ordem detectada. Os gêneros detectados em *Deception* seguem a mesma descrição de suas Ordens (itens 4.4.4.2 e 4.4.4.3) e, por esse motivo, não serão discutidos novamente, com exceção de *Pyrodictium*. A Ordem Desulfurococcales, da qual *Pyrodictium* é membro, é composta por arqueias hipertermófilas, como já foi discutido anteriormente, mas que exibem

algumas características distintas, principalmente em relação aos seus *habitats*. Como *Pyrodictium* foi o único gênero detectado dentro da Ordem Desulfurococcales, mais detalhes serão discutidos a respeito de suas características.

Figura 19 - Abundância relativa dos gêneros detectados na Ilha *Deception* para o Domínio Archaea.

Pyrodictium é composto por arqueias anaeróbias, redutoras de sulfato e hipertermofílicas, capazes de crescer entre temperaturas de 80 °C e 105 °C. São capazes de fixar CO₂ e realizar metabolismo quimiolitotrófico, ao respirar enxofre e utilizar H₂ como doador de elétrons, produzindo H₂S através dessa reação. O gênero é composto por três espécies: *P. abyssi*, *P. brockii* e *P. occultum*. Foram encontrados em estruturas porosas de ventos hidrotermais no oceano profundo, onde a temperatura atinge cerca de 300-400 °C. Devido à baixa temperatura do oceano adjacente (em torno de 3-4 °C), o gradiente de temperatura criado permite a presença de temperaturas viáveis para o crescimento destes organismos hipertermofílicos (STETTER et al., 1983). *Pyrodictium* é aparentemente adaptado a estas variações de temperaturas elevadas e baixas, características dos ventos hidrotermais de oceano profundo. É possível, que por este motivo, tenha sido detectado nas fumarolas mais quentes de *Deception*, uma vez que este gradiente de temperatura extremo também está presente devido às baixas temperaturas

típicas de ambientes polares. Além disso, como mencionado anteriormente, as fumarolas de *Deception* também possuem influência marinha, especialmente salinidade, selecionando assim os hipertermófilos típicos destes ambientes.

Figura 20 - Classificação das sequências ao nível de gênero para o Domínio Archaea. O tamanho das bolhas é equivalente ao número de sequências detectadas.

Estes resultados sugerem que diferentes grupos taxonômicos e funcionais de arqueias foram detectados de acordo com a temperatura ambiental. As arqueias abundantes nas amostras próximas às fumarolas de *Whalers Bay* e próximas às fumarolas de temperatura de 80 °C em *Fumarole Bay* estão envolvidas principalmente no ciclo do nitrogênio e são cosmopolitas no ambiente marinho. As amostras próximas à geleira de *Fumarole Bay* são compostas sobretudo por arqueias metanogênicas, adaptadas a baixas temperaturas e já detectadas em geleiras na Antártica. As arqueias da fumarola mais quente de 98 °C em *Fumarole Bay* atuam especialmente no ciclo do enxofre e são hipertermófilas. As arqueias hipertermofílicas detectadas neste trabalho estão presentes sobretudo em ventos hidrotermais de oceano profundo, o que indica que em *Deception* há uma diversidade incomum quando se considera um sistema geotermal de superfície. Além disso, até o momento, arqueias hipertermofílicas não foram detectadas em outros sítios geotermiais do continente antártico, provavelmente devido às temperaturas mais baixas dos vulcões do continente (atingem até 60 °C), que não selecionam esses organismos.

4.4.4.5 Comparação entre *Deception* e outros ambientes geotermais

Somente um trabalho analisou a diversidade de arqueias na Ilha *Deception*. Amenábar et al., (2013) avaliaram através da técnica de DGGE sequências relacionadas a arqueias a partir de amostras de fumarolas de *Fumarole Bay* submersas (4 metros de profundidade). Foram detectadas 3 sequências classificadas nas Ordens Thermococcales e Methanosarcinales, e 9 sequências não classificadas. As sequências não classificadas estariam relacionadas a grupos de arqueias metanotróficas, oxidadoras de metano, provavelmente mediadas por bactérias redutoras de sulfato. De acordo com Amenábar et al., (2013), a composição microbiológica de *Fumarole Bay* difere de outras fontes hidrotermais, uma vez que se assemelha a diversidade presente em ventos hidrotermais conhecidos, mas combina-se com micro-organismos descritos em outros ambientes marinhos antárticos.

No presente trabalho, nas fumarolas de *Fumarole Bay* acima de 80 °C foram detectados grupos distintos dos descritos por Amenábar et al., (2013), como relacionados aos gêneros *Pyrodictium* (Desulfurococcales), *Nitrosopumilus* (Nitrosopumilales) e *Haloferax* (Haloferacales). Grupos relacionados a metanogênese foram detectados somente nas amostras das geleiras e a Ordem Thermococcales não foi detectada pelo sequenciamento Illumina do gene do RNAr 16S. A diferença dos grupos de arqueias descritos por Amenábar et al., (2013) e no presente trabalho pode estar relacionada aos *primers* empregados e às técnicas de sequenciamento.

Amenábar et al., (2013) utilizaram a combinação de *primers* 344F (STAHL; AMANN, 1991) e 915R (RASKIN et al., 1994) para o sequenciamento do gene do RNAr 16S. Estes *primers* foram desenvolvidos na década de 1990 e não estão atualizados para os grupos recentemente descritos. Os *primers* empregados neste trabalho para Archaea (519F e 1017R) foram alterados (adição de degenerações) e testados recentemente (KLINDWORTH et al., 2013), de modo que sua cobertura é muito maior em relação aos *primers* da década de 1990. Além disso, as técnicas de DGGE e sequenciamento Sanger, utilizados por Amenábar et al., (2013), detectam um baixo número de sequências (na ordem de dezenas ou no máximo centenas) devido às suas limitações metodológicas. O sequenciamento por Illumina, empregado neste trabalho, é capaz de sequenciar de 10-30 milhões de sequências numa única corrida. No presente trabalho, foram obtidas cerca de 1 milhão de sequências brutas a partir dos *primers* para o Domínio Archaea. Destas, 600 mil foram filtradas quanto a qualidade e cerca de 60 mil foram assinaladas no Domínio

Archaea. Embora o número de sequências para Archaea tenha sido consideravelmente baixo em comparação com o número de sequências de Bacteria, a curva de rarefação estimou que provavelmente o esforço amostral foi suficiente para avaliar a diversidade real no ambiente (com excessão das amostras das geleiras). De qualquer modo, milhares de sequências foram obtidas neste trabalho para avaliar a composição e diversidade do Domínio Archaea em *Deception*, em contraste com as 12 sequências detectadas por Amenábar et al., (2013). Ainda, vale-se considerar também, que devido aos gradientes ambientais extremos em *Deception* e a sensibilidade do Domínio Archaea frente às condições ambientais, é possível que outros grupos não detectados no presente trabalho de fato colonizem em abundância as fumarolas submersas estudadas por Amenábar et al., (2013).

Devido à escassez de estudos de diversidade microbiana em *Deception*, os resultados obtidos neste trabalho para o Domínio Archaea serão também comparados com a diversidade de arqueias em outros ambientes termais marinhos e terrestres. Soo et al., (2009) estudaram a diversidade microbiana em solos termais do Monte *Erebus*, no continente antártico, e os únicos grupos de arqueias detectados foram relacionados a *Nitrosopumilus*.

Takai e Sako (1999) avaliaram a diversidade de arqueias em sistemas termais terrestres e marinhos, por meio da técnica de clonagem. No sistema termal terrestre, localizado no Monte *Unzen* no Japão (84 – 93 °C, pH 2.8), os principais gêneros detectados foram *Sulfolobus*, *Picrophilus* e *Sulfurisphaera*, sendo que nenhum desses foram descritos em *Deception*. No sistema hidrotermal estudado por Takai e Sako (1999) e localizado a 4 m de profundidade em *Tachibana Bay* (128 °C, pH 8.7), também no Japão, foram observados os gêneros *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Pyrodictium*, *Aeropyrum* e *Desulfurococcus*, mostrando uma diversidade de hipertermófilos maior que *Deception*, onde destes, somente *Pyrodictium* foi detectado pelo sequenciamento do RNAr 16S neste trabalho.

Jay et al., (2016) avaliaram a distribuição e diversidade de arqueias em diferentes ambientes termais (> 70 °C) do Parque Nacional de *Yellowstone*, USA, e observaram que a Classe Thermoproteales foi a mais abundante, mesmo considerando as características geoquímicas distintas entre as amostras analisadas. Dentro da Classe Thermoproteales, Jay et al., (2016) observaram que os gêneros *Thermocladium*, *Vulcanisaeta* e *Caldivirga* foram mais abundantes nos sítios termais de pH < 5, *Thermoproteus* em pH entre 5-6 e *Pyrobaculum* em pH > 6. Nenhum destes grupos foram detectados em *Deception*.

Krebs et al., (2014) estudaram a diversidade microbiana em *hot springs* da Islândia (~100 °C) através de *PhyloChip*, e detectaram dentro de Archaea, 20 OTUs relacionadas a Crenarchaeota (Ordens Desulfurococcales, Fervidicoccales e Sulfolobales) e 17 assinaladas em Euryarchaeota (Ordens Halobacteriales, Methanosarcinales, Thermoplasmatales e Nitrososphaerales). Neste trabalho, *Deception* exibiu prevalentemente OTUs relacionadas a Desulfurococcales e Halobacteriales nas fumarolas acima de 80 °C. Dentro das OTUs classificadas por Krebs et al., (2014), em *Deception* foi detectado também Nitrososphaerales em abundância nas amostras próximas às fumarolas de *Whalers Bay* (WBB1, WBB2 e WBB3), mais afastadas da influência marinha.

A diversidade microbiana em oito *hot springs* geograficamente distintos (China, Rússia, Itália, Islândia e Estados Unidos) foi estudada por Menzel et al., (2015). Nos *hot springs* dos Estados Unidos (Parque Nacional de *Yellowstone*) e da Itália (Pisciarelli) houve uma predominância de Crenarchaeota (> 50%). Em *Yellowstone*, a maior parte das arqueias foram classificadas no gênero *Sulfolobus*, enquanto em Pisciarelli *Pyrobaculum* foi dominante.

Lentini et al., (2014) avaliaram a diversidade procariótica em ventos hidrotermais rasos (23 m profundidade) na Ilha Panarea, Itália, com temperaturas próximas a 70 °C e pH 3,3, e detectaram poucas sequências relacionadas a Archaea. Estas poucas sequências foram classificadas principalmente dentro de Euryarchaeota (Classes Halobacteria, Methanomicrobia e Thermococci) e em menor abundância, em Crenarchaeota (Thermoprotei). Nakagawa et al., (2006) investigaram a diversidade de arqueias em ventos hidrotermais das fossas Marianas, no Pacífico, que exibiram altas concentrações de H₂S. Poucas sequências foram assinaladas como arqueias, e dentro destas, os gêneros mais abundantes foram *Thermococcus*, *Pyrodictium* e *Aeropyrum*. Takai et al., (2001) detectaram os gêneros *Pyrolobus*, *Pyrodictium* e *Hyperthermus* em ventos hidrotermais (temperatura da chaminé de 250 °C, 1664 m de profundidade) em *Manus Basin*, próximo a Papua Nova Guiné.

Desse modo, observa-se que a fumarola de *Deception* de 98 °C é composta por arqueias hipertermófilas, do gênero *Pyrodictium*, que foram essencialmente observadas em ventos hidrotermais de oceano profundo, principalmente do Pacífico, como discutido acima. Destaca-se aqui que os dados de Metagenoma obtidos no presente trabalho também detectaram hipertermófilos da ordem Desulfurococcales, a partir da classificação de genes funcionais, que serão descritos adiante. As outras fumarolas de *Deception* foram

compostas por arqueias halofílicas do gênero *Haloferax* (80 °C) e nitrificantes do gênero *Nitrosopumilus* (50 e 10 °C) e do gênero *Nitrososphaera* (10 °C). As amostras da geleira de *Fumarole Bay*, foram compostas essencialmente por metanogênicas (~0 °C). Portanto, da mesma forma que para Bacteria, os grupos de Archaea encontrados na Ilha *Deception* mostraram uma combinação taxonômica única quando comparados a outros ambientes geotermiais. Além disso, a presença de hipertermófilos na Antártica, que até o momento só foram detectados na Ilha *Deception*, é de grande importância para estudos envolvendo a distribuição e evolução desses organismos no planeta.

4.4.5 Diversidade microbiana para o Domínio Bacteria

A seguir serão descritos os resultados obtidos através das análises de estimativa de riqueza e alfa e beta diversidade. Para as análises de beta diversidade, foi realizado uma sub-amostragem para padronizar o número de sequências e possibilitar a comparação dos índices empregados, totalizando 22.946 sequências para cada amostra.

4.4.5.1 Riqueza e alfa diversidade

Primeiramente, foi calculada a estimativa de rarefação de acordo com o número de sequências por amostra em função do número de OTUs observadas (Figura 21). Os dados foram plotados em função do número de sequências analisadas com o intuito de avaliar se estas sequências representam a riqueza dos organismos dentro de uma comunidade. As curvas de rarefação demonstraram que o esforço amostral não foi suficiente para cobrir a riqueza de espécies (*cutoff* 0,03) na maior parte das amostras analisadas, uma vez que a sua inclinação se mostrou acentuada. Somente nas amostras das geleiras de *Whalers Bay* (WBC1, WBC2 e WBC3) foi observado uma tendência de platô nas curvas de rarefação. Para o Domínio Bacteria, é comum que as curvas de rarefação para uma determinada amostra atinjam um platô somente quando um *cutoff* de Filo é utilizado (0,20) (ERCOLINI, 2013; TRINGE et al., 2005). Em *Fumarole Bay*, as amostras próximas às geleiras exibiram maior estimativa de espécies quando comparadas às amostras próximas às fumarolas. Em *Whalers Bay*, não foi observado um padrão quanto a estimativa de riqueza entre as amostras próximas ou afastadas das fumarolas. Quando agrupadas em

fumarolas e geleiras, as amostras exibem inclinações das curvas de rarefação muito semelhantes entre estes dois grupos, como pode ser observado no segundo gráfico da Figura 21.

Figura 21 - Curva de rarefação estimada para as amostras analisadas do Domínio Bacteria. O segundo gráfico agrupa as amostras associadas à fumarolas e associadas às geleiras.

O número de OTUs, os índices de riqueza Ace e Chao1, os índices de alfa diversidade PD Whole Tree, Shannon, Simpson e Equitabilidade, estão listados na Tabela 12. Os valores de cada índice foram agrupados de acordo com as triplicatas de coleta e estão representados graficamente através de *boxplots* na Figura 22. Uma série de índices de diversidade têm sido aplicados para descrever as comunidades microbianas, em particular os Índices de Shannon e Simpson. O Índice de Shannon enfatiza o componente de riqueza, e o Índice de Simpson enfatiza o componente da equitabilidade (NAGRENDRA, 2002). O Índice de Simpson representa a probabilidade de que ao selecionar um indivíduo aleatoriamente dentro de uma comunidade, o indivíduo já tenha sido observado (HILL et al., 2003). A equitabilidade descreve a proporção dos indivíduos

de cada uma das espécies presentes em uma comunidade em relação ao total de indivíduos desta mesma comunidade. É importante destacar que é preciso ter cautela na utilização destes Índices para avaliar a diversidade das comunidades microbianas e é importante verificar qual o Índice que se mostre mais apropriado para as amostras e o ambiente em questão.

Tabela 12 - Índices de riqueza e diversidade para Bacteria, calculados através das ferramentas do Qiime.

	N OTUs	Chao1	Ace	PD Whole Tree	Shannon	Simpson	Equitability
FBA1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FBA2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FBA3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FBB1	706	772,0074	791,2841	55,4251	6,4592	0,9684	0,6825
FBB2	833	978,8792	1002,9931	66,1894	6,7363	0,9734	0,6943
FBB3	764	935,6791	946,3552	61,4304	6,0941	0,9541	0,6363
WBA1	1682	1701,1897	1720,8458	122,0803	6,8982	0,9471	0,6437
WBA2	1041	1065,4457	1080,5090	80,4406	6,2236	0,9201	0,6209
WBA3	1307	1352,1244	1372,6128	96,9859	6,1220	0,9059	0,5914
WBB1	1801	1833,1413	1855,1489	120,7198	6,9120	0,9433	0,6391
WBB2	1215	1366,5700	1382,9248	89,5913	7,0769	0,9628	0,6906
WBB3	1678	1706,1968	1721,5649	122,6455	7,2095	0,9639	0,6730
FBC1	1868	1897,7543	1916,3344	118,1128	8,4076	0,9920	0,7737
FBC2	1607	1629,8771	1640,5507	101,7733	8,3443	0,9916	0,7835
FBC3	1535	1562,8802	1572,8911	101,9174	8,5493	0,9941	0,8078
WBC1	893	911,3978	920,6853	68,6546	7,0706	0,9795	0,7213
WBC2	927	952,9091	961,8230	70,5841	6,7806	0,9744	0,6879
WBC3	930	948,7373	960,5820	68,9869	6,7377	0,9769	0,6833

As amostras da geleira de *Fumarole Bay* foram as que exibiram maiores índices de alfa diversidade Shannon, Simpson e Equitabilidade (Figura 22). Contudo, sua riqueza exibiu valores semelhantes às amostras das fumarolas de *Whalers Bay*. As fumarolas acima de 80 °C de *Fumarole Bay* e as geleiras de *Whalers Bay* apresentaram os menores índices de riqueza e diversidade entre as amostras analisadas. Entretanto, quando se leva em conta o componente equitabilidade, como no índice de Simpson, as fumarolas de *Fumarole Bay* acima de 80 °C exibem valores tao altos quanto às fumarolas de *Whalers Bay*.

Figura 22 - Índices de riqueza e diversidade calculados para o Domínio Bacteria. As triplicatas de coleta foram agrupadas para a construção dos *boxplots*.

Foi realizada uma análise de regressão linear para verificar a relação entre os índices de diversidade empregados e a temperatura ambiental (Figura 23). De acordo com os modelos de regressão linear, o número de espécies (riqueza) de Bacteria não é influenciado pela temperatura ambiental ($p > 0,05$). Já de acordo com o índice de Shannon

e a equitabilidade, a diversidade de Bacteria parece ter uma tendência inversamente proporcional em relação à temperatura ($p < 0,05$): quanto maior a temperatura, menor a diversidade. Apesar do valor de p significativo, o valor de R^2 foi de 0.37 para Shannon e 0.23 para equitabilidade, indicando que apesar da temperatura influenciar a diversidade, provavelmente não é o fator principal. No item 4.4.7 será discutido em detalhes os parâmetros ambientais que possivelmente influenciam a diversidade bacteriana em *Deception*. De qualquer forma, como será observado a seguir nas análises de beta diversidade, a composição dos grupos taxonômicos de Bacteria parece ser influenciada fortemente pela temperatura.

Figura 23 - Modelo de regressão linear a partir dos índices de diversidade empregados para Bacteria *versus* temperatura ambiental. Os valores de R^2 e p estão destacados na figura.

4.4.5.2 Beta diversidade

As análises de beta diversidade foram realizadas através das distâncias métricas de UNIFRAC. UNIFRAC é uma métrica de distância entre comunidades biológicas e difere de outras medidas de dissimilaridade, como Bray-Curtis, por incorporar distâncias filogenéticas entre os membros da comunidade para a realização do cálculo. O UNIFRAC quantitativo considera a abundância dos organismos (OTUs) observados, enquanto o qualitativo considera apenas sua presença ou ausência (LOZUPONE; KNIGHT, 2005).

Para este trabalho, foi calculado o índice de UNIFRAC quantitativo (*weighted*) e os resultados encontram-se nas Figuras 24 e 25, representados através de dendrograma e PcoA, respectivamente. O Índice de UNIFRAC quantitativo considera a distância dos ramos entre os grupos filogenéticos e a abundância das OTUs ao longo das amostras analisadas (LOZUPONE; KNIGHT, 2005). Para a visualização dos resultados de distância por UNIFRAC entre as amostras analisadas, construiu-se um dendrograma e uma análise de PCoA.

No dendrograma representado na Figura 24, observa-se a formação de dois *clusters*: um contendo todas as amostras das fumarolas, e outro todas as amostras associadas às geleiras. Nota-se também que as amostras das geleiras, apesar de terem formado um *cluster* no dendrograma, exibem uma distância entre sedimentos de *Fumarole Bay* e sedimentos de *Whalers Bay*. Por outro lado, as amostras das fumarolas de *Fumarole Bay* e *Whalers Bay* parecem ser muito semelhantes entre si quanto aos valores de UNIFRAC. Isso pode ser observado também na distribuição das amostras no PCoA representado na Figura 25. É provável que as amostras das fumarolas tenham se agrupado devido à presença de grupos específicos e filogeneticamente próximos compartilhados entre as mesmas. Como os ambientes termais são escassos e pontuais na Antártica, poucos grupos estão adaptados às essas condições específicas. Por outro lado, a distância entre as amostras das geleiras indica a presença de grupos filogeneticamente distintos em *Whalers Bay* e *Fumarole Bay*. É possível que diferentes grupos microbianos estejam adaptados às condições frias encontradas nas geleiras, que são típicas da região polar ao qual estão inseridos.

Figura 24 - Dendrograma gerado através do índice de UNIFRAC quantitativo e clusterização pelo método UPGMA.

Figura 25 - PcoA construído a partir de matriz de distância contendo os índices de UNIFRAC quantitativo para o Domínio Bacteria. PC1: 57,19%, PC2: 20,31%.

O teste de significância Adonis baseia-se na análise de permutação multivariada da variância e foi aplicado neste trabalho para avaliar se há diferença significativa nos valores de UNIFRAC quantitativo quando se compara dois grupos de amostras: (i) fumarolas e geleiras, ou seja, se há diferença significativa ao longo do gradiente ambiental, e (ii) *Fumarole Bay* e *Whalers Bay*, para verificar se há diferença significativa entre os sítios de diferentes localidades. Na Tabela 13 estão os valores de p e R^2 para o teste Adonis. Pode-se observar que houve diferença significativa quando se compara as amostras associadas às fumarolas com as amostras próximas às geleiras. Ou seja, as amostras diferem estatisticamente quanto às condições ambientais (Fumarolas vs. Geleiras), e não quanto à sua localização geográfica (*Fumarole Bay* vs. *Whalers Bay*).

Tabela 13 - Resultado do teste de significância Adonis a partir dos valores de UNIFRAC quantitativo, calculado através de 999 permutações.

	p	R^2
Fumarolas vs. Geleiras	0,001*	0,57
<i>Fumarole Bay</i> vs. <i>Whalers Bay</i>	0,103	0,16

* resultado significativo

Foi avaliado também o número de OTUs compartilhadas ao longo dos gradientes ambientais (Figura 26). Observa-se que as fumarolas compartilham mais de 400 OTUs entre si, e menos de 100 OTUs com as amostras associadas às geleiras. As amostras da geleira de *Fumarole Bay* compartilham mais de 1000 OTUs entre si, e mais de 300 OTUs com a geleira de *Whalers Bay*. As amostras da geleira de *Whalers Bay* compartilham aproximadamente 700 OTUs entre si. É importante destacar que ao menos 30 OTUs são compartilhadas quando comparamos amostras entre fumarolas e geleiras, indicando que os organismos dessas comunidades podem se dispersar e interagir ao longo do gradiente de temperatura.

Figura 26 - Número de OTUs compartilhadas entre fumarolas e geleiras da Ilha *Deception*, para o Domínio Bacteria.

Buscou-se detectar, também, o microbioma central da Ilha *Deception*, ou seja, quais OTUs estão presentes em todas as amostras analisadas. Encontrar os organismos ubíquos em um determinado ambiente pode contribuir na compreensão de como as comunidades microbianas interagem entre si e são influenciadas pelo ambiente que habitam (COMOLLI, 2014). Foram detectadas 7 OTUs presentes em todos os sedimentos analisados da Ilha *Deception*, considerando sua distância geográfica e condições ambientais tão distintas. A Figura 27 exibe a abundância relativa destas OTUs de acordo com sua classificação taxonômica. Observa-se que 84% do microbioma central de *Deception* é composto por membros da Classe Betaproteobacteria, correspondentes aos gêneros *Nitrosovibrio* e *Polaromonas*. Ainda, nota-se que quando são consideradas somente as amostras próximas às fumarolas, 184 OTUs são compartilhadas, e para as amostras associadas às geleiras, 216 OTUs são compartilhadas. Na Figura 28 estão representadas as abundâncias e distribuição das 7 OTUs presentes em todos os sedimentos analisados de *Deception*. Observa-se que a OTU20 correspondente ao gênero *Polaromonas* é a mais abundante dentre as demais. É interessante destacar que o gênero *Polaromonas* corresponde a bactérias psicrófilas que são comumente distribuídas em

ambientes polares. É provável que, por causa de sua alta abundância na Antártica, sejam facilmente dispersas nos mais diversos ambientes, através dos ventos, neve, *spray* marinho, ou mesmo, pelas condições de maré.

Figura 27 - Número de OTUs que compõem o microbioma central da Ilha *Deception* quanto ao Domínio Bacteria. A abundância relativa das 7 OTUs presentes em todas as amostras analisadas e sua classificação taxonômica estão destacadas na parte inferior à direita.

Figura 28 - Distribuição e abundância das 7 OTUs presentes em todas as amostras analisadas da Ilha *Deception*. O tamanho das bolhas corresponde ao número de sequências classificadas para cada OTU. G: Gênero, O: Ordem, F: Família.

Um diagrama de cordas foi construído para melhor observar a distribuição das OTUs mais abundantes ao longo das amostras analisadas (Figura 29). Na região inferior do diagrama estão distribuídas as amostras agrupadas de acordo com as triplicatas de coleta. Na região superior, estão as classificações taxonômicas das 3 OTUs mais abundantes para cada amostra, ao nível de Ordem. Observa-se que todos os grupos taxonômicos são específicos em relação às condições ambientais. As Ordens Alteromonadales, Rhodobacterales, Caldithriales, Caldilineales e Oceanospirillales são abundantes nos sedimentos associados às fumarolas, enquanto Actinomycetales, Sphingomonadales, Xanthomonadales, Verrucomicrobiales e Burkholderiales estão presentes nos sedimentos associados às geleiras. A Ordem Rhodobacterales é abundante especificamente nas fumarolas de *Fumarole Bay*, enquanto Caldithriales e Oceanospirillales prevalecem nas fumarolas de *Whalers Bay*. Alteromonadales e Caldilineales são abundantes em todas as fumarolas. Para as geleiras, Xanthomonadales, Verrucomicrobiales e Burkholderiales são abundantes especificamente em *Whalers Bay*, enquanto Sphingomonadales em *Fumarole Bay*. Actinomycetales é abundante em todas as geleiras.

Flavobacteriales foi a única Ordem que se mostrou abundante tanto nas fumarolas, quanto nas geleiras. A ampla distribuição deste grupo ao longo de todo o gradiente ambiental pode ser devido à sua ampla dispersão no ambiente e/ou versatilidade de sobreviver aos extremos de temperatura encontrados em *Deception*. Ainda, é possível que dentro de Flavobacteriales hajam espécies ou ecotipos adaptados às condições das geleiras, e outros às condições das fumarolas. A detecção de espécies e ecotipos não é possível devido às limitações metodológicas do sequenciamento Illumina, que produz fragmentos pequenos, de máximo de 600 pb. Dessa forma, não é possível a cobertura integral do gene do RNAr 16S (aproximadamente 1400 pb) e, por este motivo, as sequências em geral são classificadas até o nível taxonômico de Família e/ou Gênero.

Figura 29 - Diagrama de cordas exibindo a distribuição das 3 OTUs mais abundantes em cada amostra analisada. As amostras foram agrupadas em triplicatas de coleta. As OTUs estão classificadas ao nível de Ordem.

4.4.6 Diversidade microbiana para o Domínio Archaea

A seguir serão descritos os resultados obtidos através das análises de estimativa de riqueza e alfa e beta diversidade para o Domínio Archaea. Para as análises de beta diversidade, foi realizado uma sub-amostragem para padronizar o número de sequências e possibilitar a comparação dos índices empregados, totalizando 580 sequências para cada amostra.

4.4.6.1 Riqueza e alfa diversidade

Da mesma forma que para Bacteria, as estimativas de rarefação para o Domínio Archaea foram calculadas de acordo com o número de sequências por amostra em função

do número de OTUs observadas (Figura 30). Ao contrário do observado para Bacteria, as curvas de rarefação para o Domínio Archaea exibiram um padrão quando as amostras foram agrupadas em: (i) amostras da fumarola de 98 °C (denominada neste trabalho como *hyperhot*, para facilitar a discussão), (ii) demais fumarolas, abaixo de 80 °C e (iii) geleiras.

Pode-se observar na Figura 30 que as amostras da fumarola de 98 °C (*hyperhot*) exibiram um platô muito bem definido logo no início da curva de rarefação, indicando uma estimativa baixa de diversidade. As amostras próximas às fumarolas abaixo de 90 °C também exibiram um platô em sua curva de rarefação, contudo, com maior inclinação quando comparadas com a fumarola de 98 °C. As amostras próximas às geleiras exibiram uma grande inclinação em sua curva de rarefação, indicando que o esforço amostral não foi suficiente para detectar todas as OTUs estimadas no ambiente de coleta.

Figura 30 - Curva de rarefação estimada para as amostras analisadas do Domínio Archaea. O segundo gráfico agrupa as amostras associadas a fumarola de 98 °C, demais fumarolas (< 80 °C) e geleiras.

Na Tabela 14 estão listados o número de OTUs, os índices de riqueza Ace e Chao1, os índices de alfa diversidade PD Whole Tree, Shannon, Simpson e Equitabilidade, para o Domínio Archaea, calculados através dos comandos do *Qiime*, como descrito no *Material e Métodos*. Os valores de cada índice foram agrupados de acordo com as triplicatas de coleta e estão representados graficamente através de *boxplots* na Figura 31. As amostras associadas às geleiras de *Fumarole Bay* (FBC1, FBC2 e FBC3) exibiram os maiores índices de riqueza e diversidade quando comparadas com as amostras referentes às fumarolas. As amostras da fumarola de 98 °C em *Fumarole Bay* (FBA1, FBA2 e FBA3) foram as que exibiram menores índices de riqueza quando comparadas às demais. As amostras associadas às fumarolas de *Fumarole Bay* (FBA1, FBA2, FBA3, FBB1, FBB2 e FBB3) indicam menores índices de diversidade Shannon, Simpson e Equitabilidade quando comparadas às fumarolas de *Whalers Bay* (WBA1, WBA2, WBA2, WBB1, WBB2 e WBB3). Esses resultados indicam que a riqueza e alfa diversidade de Archaea são influenciadas diretamente pelas variações ambientais (principalmente temperatura e composição geoquímica), como será mostrado a seguir através de ferramentas estatísticas.

Tabela 14 - Índices de riqueza e diversidade para Archaea, calculados através das ferramentas do *Qiime*.

	N OTUs	Chao1	Ace	PD Whole Tree	Shannon	Simpson	Equitability
FBA1	8	8,0000	8,8809	0,9220	0,3648	0,0928	0,1216
FBA2	4	4,0000	4,0000	0,7764	0,5281	0,1711	0,2640
FBA3	7	7,0000	7,0000	0,7092	0,7489	0,2069	0,2668
FBB1	13	13,3333	13,9990	0,7957	0,4479	0,1093	0,1210
FBB2	10	10,3333	11,5755	1,0059	0,3279	0,0764	0,0987
FBB3	24	24,0000	24,0000	1,0034	1,2600	0,3750	0,2748
FBC1	44	44,2500	44,5103	0,6803	3,1128	0,7496	0,5702
FBC2	26	26,5000	26,7328	0,9592	2,8468	0,7187	0,6057
FBC3	35	35,0000	35,3054	0,9592	2,7931	0,6889	0,5445
WBA1	17	17,5000	17,7135	0,8739	1,6908	0,5928	0,4137
WBA2	17	17,7500	21,8935	0,9898	1,7009	0,6055	0,4161
WBA3	20	20,1667	21,1290	1,1148	1,5433	0,5530	0,3571
WBB1	26	26,0000	26,4667	1,1070	1,6861	0,5573	0,3587
WBB2	18	18,0000	18,4270	1,1019	1,7397	0,5857	0,4172
WBB3	26	26,2500	26,9719	0,8632	2,1789	0,6815	0,4635
WBC1	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
WBC2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
WBC3	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

*NI: Não foram identificadas sequências de Archaea para essas amostras

Figura 31 - Índices de riqueza e diversidade calculados para o Domínio Archaea. As triplicatas de coleta foram agrupadas para a construção dos *boxplots*.

Trabalhos anteriores descreveram (SHARP et al., 2014; WANG et al., 2013) que poucos grupos microbianos são adaptados às condições de altas temperaturas ($> 60^{\circ}\text{C}$), resultando em uma baixa diversidade em comparação aos ambientes mesofílicos. A baixa diversidade de hipertermófilos pode estar relacionada a suas baixas taxas de mutação e especiação, uma vez que seus mecanismos de reparo de DNA são altamente eficientes.

Além disso, os ambientes termais geralmente são estáveis em relação às variações de temperatura e composição geoquímica, o que não impulsiona as taxas de mutação e especiação dos micro-organismos já adaptados a essas condições. Por outro lado, os ambientes gelados da Antártica estão sujeitos a variações ambientais sazonais extremas, como aumento de temperatura e *input* de matéria orgânica nos meses de verão, e diminuição de temperatura e matéria orgânica no inverno. É provável que essas variações selecionem diferentes organismos que podem estar ativos ou inativos de acordo com as condições ambientais, resultando no aumento da diversidade microbiana (HOPKINS et al., 2006; SHARP et al., 2014).

Sharp et al., (2014) avaliaram a diversidade microbiana em sítios geotermiais entre 7,5 e 99 °C na Nova Zelândia e Canadá e verificaram uma distribuição unimodal: temperaturas abaixo de 20 °C e acima de 40 °C exibiram baixa diversidade, enquanto temperaturas entre 20 e 40 °C apresentaram alta diversidade microbiana. Contudo, no presente trabalho, foi observado que as comunidades microbianas das geleiras de *Deception*, especialmente as arqueias, exibiram diversidade maior em comparação às comunidades das fumarolas, o que provavelmente reflete a alta diversidade microbiana encontrada nos ecossistemas antárticos prevalentemente frios.

Do mesmo modo que para Bacteria, foi realizada uma análise de regressão linear para verificar a relação entre os índices de diversidade empregados para o Domínio Archaea e a temperatura ambiental (Figura 32). De acordo com os modelos de regressão linear, tanto riqueza quanto diversidade de Archaea parecem ser fortemente influenciados pela temperatura ambiental ($p < 0,05$). Os valores de R^2 foram aproximadamente 0.6 para riqueza e 0.81 para diversidade estimada pelo índice de Shannon. Os valores altos de R^2 de indicam que a temperatura é um dos principais fatores que influenciam a riqueza e diversidade das comunidades de arqueias em *Deception*. No item 4.4.7 serão discutidos outros fatores ambientais que poderiam influenciar também a diversidade dessas comunidades.

Figura 32 - Modelo de regressão linear a partir dos índices de diversidade empregados para Archaea versus temperatura ambiental. Os valores de R^2 e p estão destacados na figura.

4.4.6.2 Beta diversidade

As análises de beta diversidade de Archaea foram calculadas de acordo com o índice de UNIFRAC quantitativo e os resultados podem ser observados através do dendrograma na Figura 33 e do PCoA na Figura 34. Observa-se no dendrograma (Figura 33) a formação de quatro *clusters*: o primeiro contendo as amostras FBB1, FBB2 e FBA1, o segundo agrupando as fumarolas de *Whalers Bay* mais FBB3, o terceiro contendo as geleiras (FBC1, FBC2 e FBC3), e o quarto as fumarolas de 98 °C (FBA2 e FBA3). Na PCoA Figura 34, as amostras associadas às geleiras distribuíram-se mais distantes das amostras próximas às fumarolas de *Whalers Bay* e *Fumarole Bay*. As amostras das

fumarolas no PCoA também tiveram uma tendência de se agruparem de acordo com os sítios geotermiais de origem.

Figura 33 - Dendrograma gerado através do índice de UNIFRAC quantitativo e clusterização pelo método UPGMA, para o Domínio Archaea.

Figura 34 - PCoA construído a partir de matriz de distância contendo os índices de UNIFRAC para o Domínio Archaea. PC1: 39,53%, PC2: 24,15%.

Foi realizado o teste de significância Adonis para avaliar se há diferença significativa nos valores de UNIFRAC quantitativo quando se compara os grupos de amostras: (i) fumarolas e geleiras, ou seja, se há diferença significativa ao longo do gradiente ambiental, e (ii) *Fumarole Bay* e *Whalers Bay*, para verificar se há diferença significativa entre os sítios de diferentes localidades. Os valores de p e R^2 para o teste de significância Adonis encontram-se na Tabela 15. Pode-se observar que houve diferença significativa quando se compara as amostras associadas às fumarolas com as amostras próximas às geleiras, da mesma forma que houve diferença significativa ao comparar-se as amostras de acordo com sua localidade. Esse resultado indica que as comunidades de arqueias exibem estruturas muito distintas de acordo com o gradiente de temperatura e em cada sítio geotermal.

Tabela 15 - Resultado do teste de significância Adonis a partir dos valores de UNIFRAC quantitativo, calculado através de 999 permutações.

	Adonis (p)	Adonis (R^2)
Fumarolas vs. Geleiras	0,002*	0,49
<i>Fumarole Bay</i> vs. <i>Whalers Bay</i>	0,003*	0,42

* resultado significativo

O número de OTUs compartilhadas entre as amostras para o Domínio Archaea está ilustrado na Figura 35. Observa-se que as amostras associadas às fumarolas de *Whalers Bay* compartilham um alto número de OTUs entre si (>30). O mesmo pode ser observado para as amostras associadas às geleiras de *Fumarole Bay*, que compartilham também mais de 30 OTUs entre si. As amostras da fumarola de *Fumarole Bay* de 80 °C possuem de 10 a 24 OTUs e compartilham entre 6 e 9 OTUs entre si. As amostras da fumarola de *Fumarole Bay* de 98 °C possuem de 4 a 8 OTUs e compartilham de 3 a 2 OTUs entre si. As comunidades de arqueias compartilham mais OTUs entre si de acordo com o gradiente de temperatura. Contudo, observa-se também, que de modo geral, OTUs são compartilhadas entre todas as amostras, indicando a proximidade e interação desses ambientes.

Figura 35 - Número de OTUs compartilhadas entre fumarolas e geleiras da Ilha Deception, para o Domínio Archaea.

Os resultados do microbioma central de *Deception* para o Domínio Archaea estão na Figura 38. Observou-se que somente uma OTU (OTU38) foi compartilhada ao longo de todas as amostras, referente ao gênero *Nitrosopumilus*. Este gênero já foi descrito como alguns dos organismos mais abundantes de arqueias em ambientes marinhos e na Antártica. É interessante ressaltar que o microbioma central de *Deception*, tanto para Bacteria quanto para Archaea, compreende especialmente micro-organismos adaptados aos ambientes antárticos frios, provavelmente devido à sua ampla distribuição e abundância. As amostras da fumarola de 98 °C compartilharam 2 OTUs entre si (OTU11 e OTU524), classificadas como gênero *Haloferax* e Família Pyrodictiaceae, respectivamente. As amostras das fumarolas abaixo de 80 °C compartilharam 3 OTUs entre si (OTU1276, OTU38 e OTU329), referentes à Ordem DF10 (Nitrososphaerales), gênero *Nitrosopumilus* e a última, não foi classificada. As amostras associadas às geleiras exibiram 14 OTUs em comum, pertencentes à Ordem E2 (Methanomassillicocales) (7,84%), ao gênero *Nitrosopumilus* (90,86%) e à algumas sequências não classificadas (1,29%).

Figura 36 - Número de OTUs que compõem o microbioma central da Ilha *Deception* quanto ao Domínio Archaea. A abundância relativa das OTUs compartilhadas e sua classificação taxonômica estão destacadas na figura.

No diagrama de cordas é possível observar a distribuição das OTUs mais abundantes ao longo das amostras analisadas (Figura 37). Na região inferior do diagrama estão distribuídas as amostras agrupadas de acordo com as triplicatas de coleta. Na região superior, estão as classificações taxonômicas das 2 OTUs mais abundantes para cada amostra, ao nível de Ordem. Observa-se que, da mesma forma que para Bactéria, todos os grupos taxonômicos de Archaea são específicos em relação às condições ambientais. A Ordem Methanomassilliicocales é especificamente abundante nas amostras da geleira de *Fumarole Bay*. A Ordem Desulfurococcales está distribuída somente nas amostras da fumarola de *Fumarole Bay* de 98 °C. A Ordem Halobacteriales está presente em todas as fumarolas de *Fumarole Bay*. Nitrosopumilales é abundante em todas as fumarolas de *Whalers Bay* e na fumarola de *Fumarole Bay* de 80 °C. Ao contrário de Bactéria, não foi observado nenhuma Ordem de Archaea abundante ao longo de todo o gradiente analisado, o que indica mais uma vez que as arqueias são fortemente influenciadas e sensíveis às condições ambientais, especialmente de temperatura.

Figura 37 - Diagrama de cordas exibindo a distribuição das 2 OTUs mais abundantes em cada amostra analisada, para o Domínio Archaea. As amostras foram agrupadas em triplicatas de coleta. As OTUs estão classificadas ao nível de Ordem.

Por fim, os resultados de diversidade e composição taxonômica sugerem que a atividade geotermal em *Deception* atua como uma forte pressão seletiva, influenciando diretamente a estrutura e diversidade das comunidades microbianas. Ainda, os *habitats* geotermiais na Antártica podem fornecer uma diversidade incomum ao selecionar grupos microbianos específicos que são capazes de sobreviver às condições de temperaturas extremas (tanto baixas, quanto altas). Devido às curtas distâncias ao longo dos gradientes de temperatura, os micro-organismos adaptados às altas temperaturas provavelmente interagem com a microbiota típica dos ambientes antárticos. Isso resulta em uma diversidade e composição microbiana únicas para os ambientes antárticos predominantemente frios, que reflete o ambiente geotermal polar singular que é *Deception*.

4.4.7 *Correlação da composição e diversidade microbiana com os parâmetros ambientais*

Com o intuito de verificar quais os principais fatores ambientais que influenciam a composição e diversidade taxonômica das comunidades de *Deception*, foram realizadas análises de redundância baseada em distância (dbRDA), análises de correlação pelo método de *Pearson* e análises de regressão linear.

A análise de redundância (RDA) é um método para extrair e resumir a variação de um conjunto de variáveis resposta que pode ser explicado por um conjunto de variáveis explicativas. A RDA estende a regressão linear múltipla, permitindo a regressão de múltiplas variáveis resposta em múltiplas variáveis explicativas (RAMETTE et al., 2007). A análise de redundância baseada em distância (dbRDA) é capaz de detectar relações lineares em matrizes de dissimilaridades geradas por medidas que podem ser não-lineares (LEGENDRE; ANDERSON, 1999). Desse modo, para avaliar a influência dos parâmetros físico-químicos na estrutura das comunidades de *Deception*, foram selecionadas as OTUs de Bacteria e Archaea que apresentaram mais de 1% de abundância. Nas Figuras 38 e 39, estão representadas as análises de dbRDA com os parâmetros ambientais que apresentaram valores significativos na análise de ANOVA ($p < 0,05$).

Para a análise de dbRDA para o Domínio Bacteria (Figura 38) observa-se que as amostras distribuíram-se em três grupos: fumarolas, geleiras de *Whalers Bay* e geleiras de *Fumarole Bay*. As comunidades das geleiras de *Fumarole Bay* mostraram influência positiva de NO_3^- , e as geleiras de *Whalers Bay*, influência positiva de N, matéria orgânica, carbono orgânico e NH_3 . A OTU 10 (Bacteroidetes) foi preferencialmente distribuída nas geleiras de *Fumarole Bay*, enquanto OTU19 (Actinobacteria), OTU37 (Bacteroidetes), OTU7 (Verrucomicrobia), OTU4 (Verrucomicrobia), OTU20 (Betaproteobacteria), OTU23 (Gammaproteobacteria) e OTU9 (Alphaproteobacteria) distribuíram-se próximas as geleiras de *Whalers Bay*.

Enquanto as comunidades de bactérias das geleiras são mais influenciadas por compostos de nitrogênio, as das fumarolas mostraram maior influência positiva de SO_4^{2-} e temperatura. As OTUs que se distribuíram próximas às fumarolas na análise de dbRDA foram OTU2 (Gammaproteobacteria), OTU3 (Caldithrix), OTU6 (Bacteroidetes), OTU5 (Planctomycetes) e OTU8 (Chloroflexi). O H_2S emitido pelas fumarolas pode sofrer diferentes reações de oxidação (por processos bióticos ou abióticos), produzindo uma

série de compostos, como o SO_4^{2-} . A análise de dbRDA mostrou que a presença de SO_4^{2-} influencia diretamente e seleciona as comunidades microbianas associadas às fumarolas, onde esse composto é abundante. Por outro lado, os sedimentos das geleiras exibem baixas concentrações de SO_4^{2-} , mas altas concentrações de compostos de nitrogênio, selecionando uma comunidade distinta de bactérias, envolvidas no ciclo do nitrogênio.

Figura 38 - Análise de dbRDA relacionando os parâmetros ambientais com as OTUs de Bactéria com > 1% de abundância. Só foram exibidos os parâmetros ambientais que apresentaram valores significativos na análise de ANOVA ($p < 0,05$). dbRDA1: 49,2%; dbRDA2: 22,2%. OC: Carbono orgânico; OM: Matéria orgânica.

Na análise de dbRDA para o Domínio Archaea (Figura 39), observou-se que as amostras se distribuíram em três grupos: fumarolas de *Whalers Bay* (a amostra FBB3 também está localizada nesse grupo), fumarolas acima de 80 °C e geleira de *Fumarole Bay*. Nas fumarolas de *Whalers Bay* (mais FBB3) não foi observada nenhuma influência positiva a partir dos parâmetros analisados para as comunidades de arqueias. As OTUs que se distribuíram próximas a essas amostras foram relacionadas a *Nitrosopumilus*. *Nitrosopumilus* é uma arqueia cosmopolita, capaz de colonizar diferentes nichos no ambiente marinho, inclusive antárticos. Portanto, é possível que, por este motivo, os

parâmetros analisados não exibiram uma influência direta nas comunidades de arqueias dessas amostras, provavelmente adaptadas as mais diversas condições ambientais.

As comunidades de arqueias da geleira de *Fumarole Bay* exibiram maior influência de NO_3^- e NH_3 . A maior parte das OTUs de Archaea classificadas nas geleiras foram relacionadas a metanogênicas. É provável que haja uma interação entre as arqueias metanogênicas e as bactérias nitrificantes, detectadas também nessas amostras, e por este motivo, os compostos de nitrogênio mostraram influência positiva na análise de dbRDA.

As fumarolas acima de 80 °C exibiram influência positiva de temperatura, ferro, zinco e matéria orgânica. As OTUs que se distribuíram próximas a essas amostras no dbRDA foram OTU11 (*Haloferax*) e OTU524 (*Pyrodictium*). A influência positiva da temperatura nas fumarolas de 98 °C ocorre provavelmente devido a presença predominante das arqueias hipertermófilas do gênero *Pyrodictium*. *Pyrodictium* é capaz de reduzir Fe (III) a magnetita (LIN et al., 2016) e é provável que por este motivo o Fe influencie positivamente as comunidades das fumarolas de 98 °C. A maior parte das OTUs relacionadas a *Nitrosopumilus* e *Methanomassillicoccales* mostraram não ser influenciadas positivamente pelos parâmetros ambientais analisados. Os possíveis motivos para este resultado serão discutidos a seguir.

Figura 39 - Análise de dbRDA relacionando os parâmetros ambientais com as OTUs de Archaea com > 1% de abundância. Só foram exibidos os parâmetros ambientais que apresentaram valores significativos na análise de ANOVA ($p < 0,05$). dbRDA1: 40,3%; dbRDA2: 23,7%. OM: Matéria orgânica.

Análises de correlação pelo método de *Pearson* foram também realizadas para verificar a influência dos parâmetros ambientais nas comunidades microbianas (OTUs > 1% de abundância). Na Figura 40 estão representadas as correlações para o Domínio Bacteria, estando destacadas em azul as OTUs mais abundantes nas geleiras e, em laranja, as mais abundantes nas fumarolas. Nota-se que as OTUs abundantes nas geleiras OTU10, OTU20, OTU23 e OTU4, referentes à *Flavobacterium*, *Polaromonas*, *Rhodanobacter* e *Luteobacter*, respectivamente, tiveram forte correlação negativa (< -0,5) com temperatura, B, condutividade elétrica (EC), Na, K, Mg e SO_4^{2-} . As mesmas OTUs exibiram forte correlação positiva (> 0,5) com Ca, Al e NH_3 . As demais OTUs abundantes nas geleiras, de códigos OTU19, OTU 37, OTU7 e OTU9, equivalentes a *Arthrobacter*, Chitinophagaceae, *Luteolibacter* e Comamonadaceae, exibiram correlação negativa (< -0,5) com pH e P, e positiva (> 0,5) com Cu e o tipo de granulometria silte.

As OTUs de Bacteria abundantes nas fumarolas, correspondentes a *Thalassomonas*, *Caldithrix*, *Antarcticicola*, *Gaetbulibacter* e Caldilineaceae, exibiram correlação positiva (> 0,5) com temperatura, B, condutividade elétrica (EC), Na, K, Mg e SO_4^{2-} , e a OTU3 (*Caldithrix*) com o tipo de granulometria areia. Essas OTUs mostraram correlação negativa (< -0,5) com matéria orgânica, carbono orgânico, Ca, Al e NH_3 .

Figura 40 - Correlação de Pearson entre as OTUs de Bacteria mais abundantes (> 1%) e os parâmetros ambientais. As OTUs estão identificadas por Filo (Proteobacteria em Classe) e Gênero (as não classificadas em gênero, estão assinaladas em Família - F). Em preenchimento azul, estão destacadas as OTUs mais abundantes nas geleiras e, em laranja, as mais abundantes nas fumarolas. Temp: temperatura; EC: condutividade elétrica; OM: matéria orgânica; OC: carbono orgânico.

Na Figura 41 estão representadas as correlações para o Domínio Archaea, estando destacadas em azul as OTUs mais abundantes nas geleiras, em laranja, nas fumarolas (<

80 °C) e em vermelho, na fumarola de 98 °C. Nota-se que as correlações dos parâmetros ambientais para Archaea não mostraram-se tão intensas quando comparadas à Bacteria. De modo geral, os parâmetros que mostraram maiores correlações ($< -0,5$ ou $> 0,5$) foram temperatura, pH e Ca. As OTUs abundantes nas geleiras, referentes a *Methanomassiliicoccus*, mostraram correlação positiva ($> 0,5$) com pH, Ca, NO_3^- e NH_3 , e correlações negativas com temperatura ($< -0,5$), Cu, Fe, Na, SO_4^{2-} e condutividade elétrica. As OTUs abundantes nas fumarolas de 98 °C (*Haloferax* e *Pyrodictium*) mostraram correlação positiva ($> 0,5$) com temperatura, Fe e matéria orgânica, e correlação negativa ($< -0,5$) com pH, Si e Ca. As OTUs abundantes nas fumarolas de até 80 °C, referentes a *Nitrosopumilus* e *Nitrososphaera*, exibiram correlação positiva ($> 0,5$) com B, Si, Na, K, Mg e SO_4^{2-} , e correlação negativa ($< -0,5$) com matéria orgânica, carbono orgânico e NH_3 . Nas análises de dbRDA *Nitrosopumilus* não havia mostrado relação com nenhum parâmetro ambiental. Nas análises de correlação, *Nitrosopumilus* não exibiu valores significativos para temperatura e pH, ao contrário das demais OTUs de Archaea. Os parâmetros que influenciam *Nitrosopumilus* estão relacionados ao ambiente marinho, como Na, Si, K e Mg. Além disso, SO_4^{2-} também exibiu correlação positiva em algumas OTUs de *Nitrosopumilus*, indicando a influência das fumarolas nessas arqueias.

Figura 41 - Correlação de Pearson entre as OTUs de Archaea mais abundantes ($> 1\%$) e os parâmetros ambientais. As OTUs estão identificadas por Gênero. Em preenchimento azul, estão destacadas as OTUs mais abundantes nas geleiras, em laranja, as mais abundantes nas fumarolas até 80 °C, e em vermelho, na fumarola de 98 °C. Temp: temperatura; EC: condutividade elétrica; OM: matéria orgânica; OC: carbono orgânico.

As análises de regressão linear foram realizadas para verificar a relação entre os parâmetros ambientais e a diversidade microbiana, expressa pelo índice de Shannon. Os parâmetros ambientais representados foram aqueles que exibiram valores de p significativos ($< 0,05$) para Bacteria e Archaea, quando relacionados à diversidade Shannon (temperatura, pH, NH_3 , NO_3^- , SO_4^{2-} e Na). Na Figura 42 estão representadas as análises de regressão linear para Bacteria. Os parâmetros temperatura, pH, NO_3^- , Na e SO_4^{2-} exibiram valores de p significativo ($< 0,05$), indicando sua influência na diversidade bacteriana. Os parâmetros pH, NO_3^- , exibiram um modelo linear composto por uma reta de inclinação positiva, indicando que quanto maior seus valores, maior a diversidade bacteriana. Já os parâmetros temperatura, SO_4^{2-} e Na exibiram uma inclinação da reta negativa, ou seja, quanto maior seus valores, menor a diversidade. Contudo, os valores de R^2 de todos os parâmetros significativos para Bacteria exibiram valores abaixo de 0,40. Portanto, é provável que não haja somente um parâmetro que atue fortemente na diversidade bacteriana em *Deception*, mas sim, uma série de parâmetros que em conjunto são capazes de moldá-la.

Figura 42 - Modelos de regressão linear entre os parâmetros temperatura, pH, amônia, nitrato, sódio e sulfato e o índice de diversidade Shannon, para o Domínio Bacteria. Os valores de p e R^2 estão descritos acima de cada modelo.

Na Figura 43 estão representadas as análises de regressão linear para Archaea. Os parâmetros que exibiram valores de p significativos ($< 0,05$) quando associados à diversidade Shannon foram temperatura, pH, NH_3 , NO_3^- e SO_4^{2-} . Os parâmetros pH, NH_3 e NO_3^- exibiram reta com inclinação positiva, indicando que quanto maior seus valores, maior a diversidade. Os parâmetros temperatura e SO_4^{2-} mostraram reta com inclinação negativa, ou seja, quanto maior seus valores, menor a diversidade. O valor de R^2 para temperatura foi 0,81, indicando que a temperatura é o fator que influencia mais fortemente a diversidade das comunidades de arqueia. O valor de R^2 para pH foi de 0,48,

para NO_3^- 0,33 e para SO_4^{2-} 0,23, mostrando que esses parâmetros podem influenciar também a diversidade de arqueias, embora menos que a temperatura.

Figura 43 - Modelos de regressão linear entre os parâmetros temperatura, pH, amônia, nitrato, sódio e sulfato e o índice de diversidade Shannon, para o Domínio Archaea. Os valores de p e R^2 estão descritos acima de cada modelo.

Por fim, os resultados para Bacteria indicam que um conjunto de parâmetros ambientais moldam a composição de bactérias na Ilha *Deception*, e não só a temperatura, como, por exemplo, matéria orgânica, carbono orgânico, condutividade elétrica, B, P, Na, K, Ca, Mg, Al, SO_4^{2-} e NH_3 . A diversidade de bactérias parece ser moldada igualmente pelos parâmetros temperatura, pH, NO_3^- , Na e SO_4^{2-} . A composição das comunidades de

arqueias também é influenciada por um conjunto de parâmetros ambientais, como temperatura, pH, matéria orgânica, Cu, Fe, Na, K, Si, B, Mg, NO_3^- , NH_3 e SO_4^{2-} , enquanto sua diversidade é fortemente controlada pela temperatura. Ainda, os parâmetros ambientais parecem influenciar as comunidades microbianas das fumarolas de maneira oposta às comunidades das geleiras, mostrando que a atividade geotermal cria condições geoquímicas capazes de selecionar composições e diversidade de bactérias e arqueias únicas para ecossistemas antárticos.

4.5 Metagenoma *shotgun*

Como relatado anteriormente, a análise de Metagenoma resulta em uma grande quantidade de informações, sendo necessário selecioná-las de acordo com o objetivo de cada trabalho. Neste estudo, a técnica de Metagenoma *shotgun* foi empregada com o intuito de avaliar o potencial metabólico das comunidades microbianas e os genes envolvidos em sua adaptação a condições ambientais extremas. Para facilitar a discussão, os tópicos foram subdivididos em: resultados gerais do sequenciamento, classificação taxonômica dos genes funcionais, classificação dos genes funcionais, destacando o metabolismo de DNA, metabolismo energético e genes relacionados a resposta ao estresse ambiental.

4.5.1 Resultados gerais do sequenciamento

O sequenciamento Illumina HiSeq referente ao Metagenoma *shotgun* produziu um total de 567.410.264 *reads*. Após a filtragem por qualidade, 475.895.996 *reads* foram selecionados para as anotações funcionais e taxonômicas. Os valores correspondentes ao número de *reads* obtidos por amostra e o número de *reads* após os filtros de qualidade encontram-se na Tabela 16. O número de *reads* brutos variou entre 12 milhões (FBA2) a 60 milhões (FBB1, FBB2, WBB2) por amostra, e filtrados entre 10 milhões a 50 milhões.

Tabela 16 - Resultados do Metagenoma *shotgun* quanto ao número de reads totais obtidos no sequenciamento pela plataforma Illumina HiSeq e número de *reads* após os filtros de qualidade.

	N de <i>reads</i>	N de <i>reads</i> filtrados
FBA1	25.604.364	21.601.020
FBA2	12.940.394	10.301.158
FBA3	23.233.612	18.291.378
FBB1	60.833.206	50.314.226
FBB2	60.386.150	50.113.014
FBB3	24.844.724	20.400.376
FBC1	29.128.584	25.059.412
FBC2	30.067.068	25.698.534
FBC3	35.008.338	28.551.000
WBA1	31.124.452	25.862.686
WBA2	27.624.152	22.854.222
WBA3	26.968.302	23.022.704
WBB1	24.216.824	19.846.284
WBB2	60.498.270	53.521.536
WBB3	24.947.248	20.768.160
WBC1	15.888.948	13.358.408
WBC2	27.627.696	23.050.818
WBC3	26.467.932	23.281.060

As amostras foram agrupadas em três grupos para a construção de todos os gráficos e análises estatísticas: (i) fumarola de 98 °C, (ii) fumarolas abaixo de 80 °C e (iii) geleiras.

4.5.2 Classificação taxonômica dos genes funcionais

Os perfis taxonômicos obtidos através das classificações com melhor *hit* pelo M5NR, disponível no MG-RAST, estão ilustrados nos *heatmaps* da Figuras 44 para Filos de Bacteria e Figura 45 para Ordens de Archaea. É importante destacar que esta

classificação taxonômica foi obtida a partir dos genes funcionais que obtiveram melhor *hit* com o banco de dados do M5NR.

De acordo com o *heatmap* da Figura 44, observa-se que os Filos Proteobacteria e Bacteroidetes foram abundantes em todas amostras, assim como detectado pelo sequenciamento do gene do RNAr 16S. Contudo, nas fumarolas de *Fumarole Bay* acima de 90 °C, o Filo Firmicutes também exibiu alta abundância. Membros do Filo Firmicutes são capazes de formar endósporos e consequentemente resistem a condições de altas temperaturas e outros estresses ambientais, e é provável que, por este motivo, sejam mais abundantes na fumarola de 98 °C (MADIGAN et al., 2016). Dois *clusters* podem ser observados ao comparar-se as amostras quanto aos Filos de Bacteria: o primeiro contendo as amostras associadas a fumarola de 98 °C e o outro agrupando as demais amostras.

De modo geral, a maior parte dos Filos detectados para o Domínio Bacteria pelo Metagenoma, foram também detectados pelo sequenciamento do gene do RNAr 16S, o que aumenta a confiabilidade dos resultados obtidos por ambas as técnicas. A única exceção foram os Filos Aquificae e Thermotogae, que foram detectados pelo Metagenoma especialmente amostras da fumarola de 98 °C. Como não foi possível a amplificação com *primers* de Bacteria para estas amostras, estes Filos não foram detectados no sequenciamento do rRNA 16S na fumarola de 98 °C. Isso demonstra a importância dos métodos independentes de amplificação, como o Metagenoma *shotgun*, para acessar a diversidade microbiana, principalmente em ambientes extremos nos quais muitos grupos podem não ser detectados com os *primers* convencionais (ELOE-FADROSH et al., 2016). Os Filos Aquificae e Thermotogae compreendem grupos de grande importância ecológica em ambientes termais de superfície, como por exemplo, em *hot springs* do Parque Nacional de *Yellowstone*, EUA (MADIGAN et al., 2016).

Figura 44 - *Heatmap* exibindo os grupos taxonômicos do Domínio Bacteria (Filos) detectados através dos dados de Metagenoma *shotgun*, utilizando ferramentas do MG-RAST e banco de dados do M5NR.

Na Figura 45 está representado o *heatmap* com as Ordens detectadas para o Domínio Archaea. Para o Domínio Archaea observa-se que as amostras foram clusterizadas em três grupos de acordo com a temperatura ambiental: um grupo contendo todas as amostras associadas às fumarolas de até 80 °C, outro com as amostras da fumarola de 98 °C, e o terceiro compreendendo as amostras próximas às geleiras. As amostras próximas às fumarolas de até 80 °C exibiram maior abundância de sequências classificadas na Ordem Nitrosopumilales. Os resultados do sequenciamento do RNAr 16S também indicaram alta abundância de *Nitrosopumilus* nessas amostras. Como já discutido, este grupo é globalmente abundante nos oceanos e exibe grande importância

ecológica ao atuar diretamente no ciclo do nitrogênio, oxidando amônia à nitrito autotroficamente (WALKER et al., 2010).

As amostras associadas às geleiras foram principalmente abundantes em grupos de arqueias metanogênicas, como *Methanosarcinales* e *Methanomicrobiales*. O resultado do sequenciamento do RNAr 16S também indicou a abundância de grupos metanogênicos nas geleiras de *Fumarole Bay*. As geleiras de *Whalers Bay* não haviam exibido sequências de RNAr 16S relacionadas a arqueias e, por este motivo, o resultado do Metagenoma tornou-se importante para comprovar a abundância de metanogênicas também nessas amostras. Como discutido anteriormente, muitos trabalhos já descreveram a atividade de arqueias metanogênicas em ambientes subglaciais do Ártico e Antártica. Stibal et al (2012) destacam que ambientes subglaciais são em grande parte anóxicos e contêm carbono orgânico abaixo da camada de gelo, criando condições favoráveis para a atividade de arqueias metanogênicas. O metano produzido pode ser liberado para a atmosfera durante o recuo das geleiras em períodos de aquecimento e, portanto, estes micro-organismos exibem uma importância direta para as mudanças climáticas globais em escalas tanto geológicas, quanto milenares ou centenárias (STIBAL et al., 2012).

As amostras associadas a fumarola de 98 °C exibiram mais de 90% de abundância de *Desulfurococcales*, assim como o detectado no sequenciamento do rRNA 16S. Destaca-se novamente que membros da Ordem *Desulfurococcales* (Filo *Crenarchaeota*, Classe *Thermoprotei*) estão relacionados com arqueias hipertermófilas, especialmente detectadas e adaptadas a ventos hidrotermais de oceano profundo, e que não foram descritas em nenhum outro ambiente na Antártica que não seja a Ilha *Deception* (Muñoz et al., 2011). Características gerais da Ordem *Desulfurococcales* já foram discutidas anteriormente nos resultados do sequenciamento do RNAr 16S.

Figura 45 - Heatmap exibindo os grupos taxonômicos do Domínio Archaea (Ordem) detectados através dos dados de Metagenoma *shotgun*, utilizando ferramentas do MG-RAST e banco de dados do M5NR.

4.5.3 Classificação dos genes funcionais

Os perfis funcionais para o nível I da classificação do SEED *subsystem* estão descritos na Figura 46. Observa-se que as amostras agruparam-se novamente de acordo com a temperatura ambiental: um grupo compreendendo as amostras das fumarolas até 80 °C, outro com as amostras das geleiras, e o mais distante, reunindo as amostras da fumarola de 98 °C. Nota-se uma maior abundância de genes relacionados ao metabolismo de DNA, RNA e proteínas nas fumarolas de 98 °C, em comparação com as demais amostras. Nas geleiras, é observado que o metabolismo de carboidratos exibe maior abundância em relação às amostras das fumarolas. Outras funções parecem distribuir-se de maneira homogênea entre as amostras, como transporte de membrana, divisão celular, metabolismo de enxofre, metabolismo de nitrogênio, respiração e resposta ao estresse.

A Figura 47 representa os resultados obtidos pela PCA (análise de componentes principais) através dos dados de perfis funcionais do nível I do SEED *Subsystem*. As amostras distribuíram-se do mesmo modo que o observado no *heatmap* da Figura 46, de acordo com a temperatura ambiental. A seguir serão descritos os resultados para outros níveis da classificação do SEED *subsystem*, que apresentaram diferença estatística entre as amostras e importância ecológica e funcional.

Figura 46 - *Heatmap* exibindo os perfis funcionais das comunidades microbianas de *Deception*, detectados através dos dados de Metagenoma Funcional, utilizando ferramentas do MG-RAST e nível I do SEED *Subsystem*.

Figura 47 - Análise de componentes principais (PCA) através dos perfis funcionais das comunidades microbianas de *Deception*, detectados através dos dados de Metagenoma Funcional, utilizando ferramentas do MG-RAST e nível I do SEED *Subsystem*. PC1: 72,7%, PC2: 16%.

4.5.3.1 Metabolismo de DNA

Genes relacionados ao metabolismo de DNA apresentaram abundância relativa muito distinta entre as amostras e por isso foram investigados em mais detalhes. Foram selecionados os genes envolvidos com o metabolismo de DNA considerados mais relevantes quanto a sua importância funcional e ecológica e que apresentaram diferença significativa entre as amostras ($p < 0,01$) (Figura 48). De acordo com o nível II do SEED *subsystem*, os genes relacionados ao reparo de DNA por excisão de bases, replicação de DNA em Archaea, recombinação de DNA em Archaea, DNA topoisomerase, DNA helicase e girase reversa foram significativamente mais abundantes nas fumarolas de 98 °C do que nas demais amostras.

Metabolismo de DNA

Figura 48 - Perfis funcionais das comunidades microbianas de *Deception* quanto ao metabolismo de DNA, nível II SEED *subsystems*. Foram selecionadas as funções mais relevantes para a discussão dos resultados e que apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos analisados.

Devido a abundância de genes relacionados ao reparo de DNA, alguns detalhes serão discutidos a respeito de seus mecanismos. Todos os organismos possuem essencialmente três mecanismos de reparo quando um dano desencadeia o paraamento errôneo entre nucleotídeos da dupla fita de DNA: reparo *mismatch* (MMR), reparo por excisão de bases (BER) e reparo por excisão de nucleotídeos (NER). O MMR é ausente

na maioria das arqueias hipertermófilas e até o momento, não há evidências de que o NER esteja presente nestes micro-organismos (GRASSO; TELL, 2014). Portanto, o BER é um dos principais mecanismos responsáveis pelo reparo de pareamentos errôneos no DNA em arqueias hipertermófilas. Um dos principais efeitos de altas temperaturas é provocar a deaminação nucleotídica, que se não reparada, ocasiona a incorporação errada de nucleotídeos durante a replicação, resultando em mutações no DNA que podem ser letais aos micro-organismos. As arqueias hipertermófilas não apresentam taxas altas de mutação, o que indica que adquiriram um sistema de reparo extremamente eficiente capaz de conter os efeitos danosos das altas taxas de deaminação causadas pelas temperaturas elevadas (GRASSO; TELL, 2014; GROGAN, 2015).

Os resultados deste trabalho indicam que o BER é um dos mecanismos de reparo mais abundantes nas comunidades microbianas da fumarola de 98 °C. Além disso, a alta abundância de genes relacionados à replicação e recombinação de Archaea indica que as comunidades da fumarola de 98 °C em *Fumarole Bay* possuem potencialmente um metabolismo de DNA específico de arqueias hipertermófilas. A alta abundância da girase reversa nessas amostras corrobora com esta questão, uma vez que esta proteína está presente somente em arqueias hipertermófilas, sendo responsável por manter o superenovelamento positivo do DNA em altas temperaturas e evitar assim sua desnaturação (LULCHEV; KLOSTERMEIER, 2014). As proteínas DNA helicase e DNA topoisomerase são encontradas em todos os organismos vivos, mas exibiram maior abundância relativa na fumarola de 98 °C, indicando seu provável papel na estabilidade genômica em altas temperaturas (VETTONE et al., 2014). Todos estes mecanismos citados acima indicam que as comunidades da fumarola de 98 °C estão notadamente adaptadas aos efeitos de temperaturas muito elevadas no DNA microbiano, o que provavelmente não ocorre com as comunidades das fumarolas de temperaturas mais baixas e geleiras.

Genes envolvidos com o reparo pela fotoliase foram sobretudo abundantes nas amostras das fumarolas abaixo de 80 °C e nas geleiras. A fotoliase utiliza energia luminosa para romper dímeros de timina resultantes de danos causados por radiação ultravioleta (MUNSHI; STANLEY, 2013). Muitos micro-organismos são transportados e depositados pela neve, principalmente nas geleiras. Durante a sua dispersão, são frequentemente expostos à luz solar, o que ocasiona muitas vezes danos oxidativos em seu DNA. O mecanismo de reparo de DNA por fotoliase é muito comum para reparar os

danos causados pela radiação UV nessa situação e é provável que, por este motivo, a fotoliase tenha sido abundante nessas amostras.

A DNA girase foi mais abundante nas amostras das fumarolas abaixo de 80 °C e nas geleiras, e pouco abundantes nas fumarolas mais quentes. A DNA girase é uma proteína comum em todos os organismos, com exceção de arqueias hipertermófilas. É possível que, por esse motivo, foi pouco abundante nas amostras de 98 °C, que exibiram maior abundância de girase reversa, típica dos hipertermófilos. Desse modo, as comunidades microbianas das fumarolas abaixo de 80 °C e das geleiras respondem de maneira diferente quanto aos seus mecanismos de reparo e proteínas relacionadas ao DNA, quando comparadas à fumarola de 98 °C. Esses resultados indicam que as diferentes temperaturas afetam diretamente o DNA microbiano, e os organismos capazes de responder molecularmente a essas condições são selecionados.

4.5.3.2 *Metabolismo energético*

Foram selecionados os genes referentes ao metabolismo energético (níveis II e III SEED *subsystem*) que foram considerados mais relevantes para a discussão deste trabalho e que exibiram valor de $p < 0,01$ quando comparados entre os diferentes grupos de amostras (Figura 49). Genes relacionados à fotossíntese foram abundantes nas amostras das fumarolas abaixo de 80 °C e nas geleiras. Devido à instabilidade térmica dos intermediários do Ciclo de Calvin, a temperatura limite para a fotossíntese é de 73 °C (BERG, 2011), e por este motivo, é provável que a fumarola mais quente (98 °C) não tenha apresentado alta abundância destes genes. As amostras da fumarola de 98 °C exibiram alta abundância de genes relacionados à redução de sulfato, enquanto as fumarolas abaixo de 80 °C foram mais abundantes em genes envolvidos na oxidação de enxofre. A assimilação orgânica de enxofre não apresentou diferença significativa entre os grupos de amostras analisados. A alta abundância de genes envolvidos com a redução de sulfato na fumarola acima de 98 °C corresponde com os grupos taxonômicos detectados em alta abundância, tanto pelo Metagenoma, quanto pelo sequenciamento do RNAr 16S, como a Ordem Desulfurococcales, cujos membros atuam preferencialmente neste metabolismo.

Figura 49 - Perfis funcionais das comunidades microbianas de *Deception* quanto ao metabolismo energético, níveis II e III SEED *subsystems*. Foram selecionadas as funções mais relevantes para a discussão dos resultados e que apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos analisados.

O metabolismo de redução de sulfato consiste na obtenção de energia pela oxidação de compostos orgânicos (quimiorganotróficos) ou hidrogênio molecular (quimiolitotróficos), a partir da redução de sulfato (SO_4^{2-}) em sulfeto de hidrogênio (H_2S) (PEREIRA et al., 2011). Bactérias e arqueias são capazes de realizar este metabolismo, e a maior parte destes micro-organismos são estritamente anaeróbios. O metabolismo de oxidação de enxofre consiste na oxidação de H_2S em enxofre elementar ou SO_4^{2-} e é realizada especialmente por bactérias aeróbias ou microaerofílicas (MADIGAN et al., 2016).

Os resultados deste trabalho indicam que os tipos de metabolismos de enxofre são distintos de acordo com a temperatura das fumarolas: organismos redutores de sulfato são abundantes nas temperaturas mais quentes, enquanto oxidadores de enxofre nas fumarolas de menores temperaturas. É interessante notar, que dentre as fumarolas, a de temperatura de 98 °C foi a que exibiu menor concentração de SO_4^{2-} pelos dados físico-químicos, e é provável que o motivo seja a atividade das redutoras de sulfato consumindo esse substrato para a obtenção de energia. Por outro lado, as demais fumarolas que exibiram maiores concentrações de SO_4^{2-} , podem abrigar as bactérias oxidantes de enxofre, que produzem SO_4^{2-} a partir da oxidação de sulfeto de hidrogênio.

A fumarola de 98 °C exibiu alta abundância de genes relacionados à fixação de CO_2 em comparação com as demais fumarolas e geleiras. A fixação de CO_2 é o processo biossintético mais importante na Terra, uma vez que o carbono inorgânico é transformado em compostos orgânicos de baixo peso molecular, que são utilizados por todos os organismos quimiorganotróficos para obtenção de energia. A principal via em eucariotos, cianobactérias e bactérias anaeróbias facultativas para a fixação de CO_2 é o Ciclo de Calvin, caracterizado pela atuação das enzimas 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RubisCO) e ribulose 5-fosfato quinase. Em contraste, bactérias anaeróbias possuem outras duas vias autotróficas, que têm em comum a síntese de Acetil-coenzima A (CoA). A primeira é o ciclo reverso do ácido cítrico (Ciclo de Krebs reverso), com a atuação das enzimas 2-oxoglutarato:ferredoxina oxidoreductase e ATP citrato liase. A outra é a via redutiva de Acetil-CoA, caracterizada por um complexo enzimático denominado acetil-coA sintase. Ambas já foram descritas como modelos de vias metabólicas ancestrais (BECERRA et al., 2014). As vias para a fixação de CO_2 em Archaea, especialmente Crenarchaeota, vêm sendo elucidadas recentemente. Hügler et al. (2003) identificaram vias metabólicas envolvidas na fixação de CO_2 em diferentes Famílias do Filo Crenarchaeota, principalmente em membros termófilos e hipertermófilos. Os resultados

de Hügler et al. (2003) indicaram que cada Família de Crenarchaeota estudada exibiu uma via metabólica distinta para a fixação de CO₂. Como por exemplo, *Pyrobaculum*, que contém enzimas chaves para o Ciclo de Krebs reverso, consistindo com o encontrado para *Thermoproteus*. *Pyrodictium*, que contém 1,5-bifosfato carboxilase, ativa em água fervente, e *Ignicoccus*, que possui piruvato oxidoredutase, mas aparentemente não possui enzimas chaves de vias autotróficas conhecidas (HÜGLER et al., 2003; HAWKINS et al., 2013). Os resultados do presente trabalho indicam que provavelmente os genes relacionados à fixação de CO₂, abundantes essencialmente nas fumarolas acima 90 °C, correspondem a vias metabólicas de arqueias hipertermófilas quimioautotróficas e não a organismos fotossintetizantes, uma vez que não foram detectados como abundantes genes envolvidos em atividade fotossintética nessas amostras.

Por outro lado, as geleiras exibiram alta abundância de genes relacionados à obtenção de moléculas de carbono orgânico, como às enzimas glucoquinase e gluconato desidratase. A glucoquinase faz parte da via glicolítica, catalizando a reação de fosforilação de glucose para glucose-6-fosfato. A glucoquinase é um tipo de hexoquinase presente somente em alguns grupos de bactérias, tanto gram-negativas quanto gram-positivas (KAWAI et al., 2005). A gluconato desidratase catalisa a reação de D-gluconato para 2-dehidro-3-desoxi-D-gluconato, que faz parte da via das pentoses fostato. Essa via é paralela à glicólise e gera NADPH, diversas pentoses e Ribose 5-fosfato, um precursor para a síntese de nucleotídeos (MADIGAN et al., 2016).

Nas fumarolas de até 80 °C observa-se uma alta abundância de genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio (nível I SEED *subsystem*). Ao analisar os níveis I e II do SEED *subsystem* observa-se que genes relacionados à amonificação de nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻) estão mais abundantes nas comunidades associadas às fumarolas de todas as temperaturas, enquanto genes relacionados à denitrificação estão em maior abundância na fumarola de 98 °C e nas geleiras. Ainda, genes relacionados à nitrificação encontram-se mais abundantes nas amostras associadas às geleiras. A redução dissimilatória de nitrato compreende as vias metabólicas de amonificação e denitrificação (KONHAUSER, 2009). Na amonificação o nitrato é reduzido a nitrito pela nitrato redutase dependente de ferro-molibdênio, cuja síntese é reprimida na presença de O₂. O nitrito é, então, convertido à amônia (NH₄⁺) pela enzima nitrito redutase, completando a amonificação. Uma série de intermediários podem ser formados após o processo de conversão de nitrato à nitrito em condições anóxicas, dependendo da maquinaria enzimática de cada micro-organismo, como óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O) e gás

nitrogênio (N₂), resultando no processo denominado denitrificação. A nitrificação, por outro lado, consiste no processo de oxidação de amônia a nitrito e nitrato, sendo assim, um processo aeróbico (KONHAUSER, 2009; MADIGAN et al., 2016). Observa-se através dos resultados deste trabalho que a estrutura funcional das comunidades microbianas quanto ao metabolismo do nitrogênio também está diretamente relacionada com o gradiente temperatura.

4.5.3.3 Genes relacionados a resposta ao estresse ambiental

Foram analisados também genes envolvidos com a resposta a diferentes estresses ambientais e os principais resultados encontram-se nas Figuras 50 e 51. No primeiro quadro da Figura 50 estão descritos genes detectados nas amostras de *Deception* que estão relacionados ao estresse oxidativo. Nota-se que as amostras da fumarola de 98 °C foram as que apresentaram maior abundância de genes relacionados ao estresse oxidativo, como glutaredoxinas, tolerância à acidez por transporte de glutamato e glutathione.

A glutaredoxina é uma oxidoreductase responsável pela redução de dissulfetos em proteínas associadas ou não à glutathione, e está envolvida diretamente com a regulação do estado redox das células microbianas. Ainda pouco se sabe a respeito de suas atividades específicas (ALVES et al., 2009). Além disso, as glutaredoxinas podem exibir a importante função de facilitar o enovelamento de proteínas, agindo como chaperonas (BERNDT et al., 2008). A glutathione é responsável por manter o estado oxidativo ideal de proteínas com grupos tióis, atuando na proteção da célula à baixos valores de pH e estresse osmótico. Heinemann et al., (2014) detectaram recentemente a síntese de glutathione em arqueias hipertermófilas e destacaram a importância da glutathione na estabilidade proteica também em altas temperaturas. O glutamato está envolvido com um dos principais mecanismos de resistência microbiana à ambientes ácidos (FEEHILY; KARATZAS, 2013) e genes relacionados ao seu transporte também apresentaram alta abundância nas amostras da fumarola de 98 °C.

Estes resultados indicam que além da temperatura, as comunidades microbianas da fumarola de 98 °C respondem também ao estresse oxidativo e a condições de baixos valores de pH, provavelmente causados pela alta emissão de H₂S nas fumarolas expostas de *Fumarole Bay*. É provável que a outra fumarola presente em *Fumarole Bay*, de temperatura de ~80 °C, por estar submersa, esfrie rapidamente em contato com a água

fria da coluna d'água. Além disso, a água do mar atua tamponando a região adjacente à fumarola submersa, auxiliando a manter um pH não tão baixo nesta região. É provável que, por esse motivo, a estrutura funcional das comunidades microbianas varie tanto entre as fumarolas de *Fumarole Bay*. As fumarolas de *Whalers Bay* emitem principalmente CO₂ e suas temperaturas atingem no máximo 50 °C, o que provavelmente explica a diferença da estrutura funcional em relação às comunidades da fumarola de *Fumarole Bay* de 98 °C.

No segundo quadro da Figura 50 está descrita a proporção de sequências relacionadas ao estresse osmótico. Quando considerados todos os genes relacionados ao estresse osmótico e osmorregulação, observa-se que as geleiras são as que exibem maior abundância destes genes. O estresse osmótico está muitas vezes relacionado à condições de dessecação, muito comuns em ambientes gelados, onde a água líquida não encontram-se ativamente disponível (CHAN et al., 2013). Genes envolvidos com a síntese de trehalose foram detectados como mais abundantes nas amostras próximas às geleiras e nas fumarolas de até 80 °C. A trehalose é capaz de prevenir a desnaturação e agregação de proteínas e estabilizar a membrana celular em condições de baixas temperaturas (De MAAYER et al., 2014). Genes relacionados à síntese de prolina foram detectados em maior abundância nas fumarolas de até 80 °C, e em menor abundância nas geleiras, seguidas pela fumarola de 98 °C. A prolina é capaz de conferir resistência microbiana a condições de alta osmolaridade (MOSES et al., 2012). É provável que as fumarolas de até 80 °C respondam à estas condições por estarem próximas do ambiente marinho.

Figura 50 - Genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo e osmótico, detectados nas amostras de *Deception* através de ferramentas do MG-RAST e SEED *Subsystem* (níveis II e III). Foram selecionadas as funções mais relevantes para a discussão dos resultados.

Os principais genes envolvidos com a resposta às altas e baixas temperaturas estão destacados na Figura 51. No primeiro quadro, estão descritas as proteínas *heat-shock*, relacionadas à resistência microbiana em altas temperaturas. Genes relacionados à proteína GroES exibiram maior abundância nas amostras das fumarolas de até 80 °C e nas geleiras, enquanto GroEL mostrou-se mais abundantes na fumarola mais quente, de 98 °C. A proteína GroEL é uma chaperonina que atua normalmente em conjunto com a co-chaperonina GroES na maioria dos organismos. São responsáveis pelo enovelamento de proteínas, ajudando na sua estabilidade em altas temperaturas (MADIGAN et al., 2016). Contudo, organismos do Domínio Archaea não possuem a co-chaperonina GroES (KLUMPP; BAUSMEISTER, 1998) e é provável que, por este motivo, a abundância de GroES tenha sido tão baixa nas comunidades da fumarola de 98 °C, que são principalmente compostas por arqueias hipertermófilas. Além disso, as arqueias

hipertermófilas também não possuem a chaperonina DnaK (GRIBALDO et al., 1999), o que explica a baixa abundância desta proteína nas fumarolas de 98 °C. Desse modo, as arqueias hipertermófilas possuem uma chaperonina denominada termosso, que até o momento não foi detectada em nenhum membro do Domínio Bacteria (LARGE et al., 2009). Genes relacionados ao termosso foram abundantes somente nas fumarolas de 98 °C, mostrando que as adaptações hipertermofílicas são exclusivas para essas amostras.

No segundo quadro, estão descritas as proteínas *cold-shock* CspA (grupo I) e RecA (grupo II), relacionadas com a resposta à baixas temperaturas. CspA mostrou-se mais abundante nas amostras das fumarolas abaixo de 80 °C, em seguida, nas geleiras e menos abundante nas fumarolas mais quentes. A CspA é a principal da família de proteínas *cold-shock* e consiste em uma proteína pequena, que se liga a ácidos nucleicos que regulam uma variedade de processos na célula, incluindo a transcrição, tradução, enovelamento proteico e fluidez de membrana (MAAYER et al., 2014). É provável que a baixa abundância de CspA nas geleiras, em comparação com as fumarolas abaixo de 80 °C, seja devido à existência de outros mecanismos de resistência ao frio presentes nas comunidades associadas às geleiras, como os mecanismos de osmoregulação descritos anteriormente. Ainda, genes envolvidos com a recombinação genética podem ser induzidos como resposta à baixas temperaturas, como por exemplo o gene que codifica a proteína RecA, uma das principais no processo de recombinação (LIU et al., 2014; PHADTARE, 2004). Genes relacionados à proteína RecA foram detectados em maior abundância nas comunidades microbianas associadas às geleiras, seguidas pelas fumarolas abaixo de 80 °C, e pouco abundantes na fumarola de 98 °C.

Proteínas Heat-Shock

Proteínas Cold-Shock

Figura 51 - Genes relacionados à resposta à altas e baixas temperaturas ambientais, detectados nas amostras de *Deception* através de ferramentas do MG-RAST e SEED *Subsystem* (níveis II e III). Foram selecionadas as funções mais relevantes para a discussão dos resultados.

Os resultados indicam que as variações ambientais extremas em *Deception* fortemente selecionam micro-organismos funcionalmente distintos quanto a suas estratégias metabólicas e adaptativas. As principais respostas aos extremos ambientais das comunidades microbianas estão relacionadas aos extremos de temperatura, danos no DNA, ao estresse osmótico e oxidativo, e à disponibilidade de diferentes fontes de energia geoquímica. A diversidade de funções que as comunidades de *Deception* abrigam destacam sua importância em estudos futuros envolvendo sobretudo biogeografia e evolução microbiana nos ecossistemas geotermiais polares.

4.6 Síntese dos resultados e perspectivas no estudo das comunidades microbianas em *Deception*

Neste trabalho, diferentes técnicas independentes de cultivo foram empregadas para entender como as comunidades microbianas respondem às variações extremas de temperatura e composição geoquímica presentes na Ilha vulcânica *Deception*, na Antártica. As comunidades microbianas em diferentes fumarolas e geleiras de *Deception* foram avaliadas quanto a sua abundância, composição, diversidade e potencial metabólico e adaptativo, através das técnicas de PCRq, sequenciamento do gene do RNAr 16S e Metagenoma. Os principais resultados obtidos através dessas técnicas foram reunidos e estão apresentados nas figuras a seguir (Figuras 52, 53, 54). Na Tabela 17 estão listados os fatores ambientais que mostraram influenciar a diversidade e composição microbiana em *Deception*. Observa-se que em todas as análises realizadas, a estrutura taxonômica e funcional das comunidades microbianas é diretamente influenciada pelos gradientes geoquímicos e de temperatura.

Fumarola de 98 °C	
qPCR	
Bacteria	Não detectadas por este método
Archaea	
Sequenciamento 16S	
Bacteria	Não detectadas
Archaea	Hipertermófilos: Desulfurococcales (<i>Pyrodictium</i>)
Metagenoma	
Bacteria	Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Aquificae
Archaea	Hipertermófilos: Desulfurococcales
Metabolismo energético	Redução de sulfato, fixação de CO ₂ , Amonificação
Adaptações	Estresse oxidativo (glutaredoxinas e glutatona), reparo de DNA por excisão de bases,DNA helicase, Topoisomerase I, mecanismos de adaptação a altas temperaturas específicos de arqueias (termossomos, girase reversa e GroEL)

Figura 52 - Síntese dos principais resultados obtidos através das técnicas de qPCR, sequenciamento 16S e Metagenoma, para as amostras da fumarola de 98 °C.

Fumarolas de até 80 °C	
qPCR	
Bacteria	$2,69 \cdot 10^4$ a $1,38 \cdot 10^5$ células/g
Archaea	$7,7 \cdot 10^4$ a $2,36 \cdot 10^5$ células/g
Sequenciamento 16S	
Bacteria	Proteobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes, Caldithrix, Chloroflexi, Planctomycetes, Gammaproteobacteria
Archaea	<i>Nitrosopumilus</i> , <i>Nitrososphaera</i>
Metagenoma	
Bacteria	Proteobacteria e Bacteroidetes
Archaea	Nitrosopumilales
Metabolismo energético	Fotossíntese, oxidação de enxofre, metabolismo do Nitrogênio em geral (nitrificação, denitrificação e amonificação)
Adaptações	Reparo por fotoliase, estresse osmótico (prolina e trealose), proteínas <i>heat-shock</i> (GroES, GroEL e DnaK), e <i>cold-shock</i> (CspA e RecA)

Figura 53 - Síntese dos principais resultados obtidos através das técnicas de qPCR, sequenciamento 16S e Metagenoma, para as amostras das fumarolas de até 80 °C.

Geleiras	
qPCR	
Bacteria	$5,94 \cdot 10^3$ a $1,51 \cdot 10^7$ células/g
Archaea	$1,40 \cdot 10^4$ a $5,39 \cdot 10^5$ células/g
Sequenciamento 16S	
Bacteria	Proteobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes, Verrucumicrobia, Actinobacteria, OD1, FBP, Acidobacteria, TM7, Nitrospirae, Gemmatimonadetes e Elusimicrobia
Archaea	Metanogênicas: <i>Methanomassillicoccus</i>
Metagenoma	
Bacteria	Proteobacteria e Bacteroidetes
Archaea	Metanogênicas: <i>Methanosarcinales</i> e <i>Methanomicrobiales</i>
Metabolismo energético	Fotossíntese, glicogênese, nitrificação e denitrificação
Adaptações	Reparo por fotoliase, estresse osmótico (prolina e trealose), proteínas <i>heat-shock</i> (GroES, GroEL e DnaK), e <i>cold-shock</i> (CspA e RecA)

Figura 54 - Síntese dos principais resultados obtidos através das técnicas de qPCR, sequenciamento 16S e Metagenoma, para as amostras das geleiras.

Tabela 17 - Fatores ambientais que mostraram influenciar significativamente ($p < 0,05$) a composição e diversidade de bactérias e arqueias na Ilha *Deception*.

Fatores ambientais		
	Bacteria	Archaea
Composição	Temperatura, matéria orgânica, carbono orgânico, condutividade elétrica, B, P, Na, K, Ca, Mg, Al, sulfato e amônia.	Temperatura, pH, matéria orgânica, Cu, Fe, Na, K, Si, B, Mg, nitrato, amônia e sulfato
Diversidade	Temperatura, pH, Na, nitrato e sulfato	Temperatura, pH e sulfato

Estes resultados representam os primeiros avanços sobre a diversidade taxonômica e funcional das comunidades microbianas de *Deception*. Ainda, a detecção das estratégias adaptativas de arqueias hipertermófilas nas fumarolas de *Deception* fornece dados inéditos para a ecologia microbiana nos ecossistemas geotermiais antárticos.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, novas questões são consideradas principalmente em relação à atividade microbiana nas fumarolas e geleiras de *Deception*. As análises baseadas em DNA não respondem se os genes detectados estavam realmente ativos e se os micro-organismos estavam de fato sobrevivendo às condições extremas encontradas em *Deception*. Muitos organismos podem facilmente dispersar-se através dos fortes ventos antárticos, condições de maré, deposição de neve ou pelo *spray* marinho, e é possível que alguns dos genes detectados tenham sido coletados de células em estado latente ou inativo. Técnicas baseadas em RNA, como a metatranscriptômica, estão sendo empregadas em trabalhos recentes para responder quais genes são efetivamente expressos pelas comunidades microbianas para garantir sua sobrevivência nas condições ambientais extremas. Até o momento, nenhum trabalho utilizou a metatranscriptômica para avaliar a atividade microbiana nos ecossistemas geotermiais antárticos.

Além disso, novas perspectivas em estudos de ecologia microbiana indicam a importância de entender as relações ecológicas inter- e intra-específicas dentro de uma comunidade. Para isso, são frequentemente empregadas análises de redes de co-ocorrência para explicar quais processos ecológicos atuam nos padrões de distribuição das espécies (OTUs) detectadas. Desse modo, é importante entender como os micro-organismos que habitam as geleiras e fumarolas de *Deception* interagem entre si e quais as relações ecológicas estão presentes (p. ex. mutualismo, competição ou amensalismo).

Responder a essas questões é de grande relevância para os estudos de ecologia microbiana em ambientes extremos.

Ainda, os dados obtidos por meio do Metagenoma podem ser futuramente explorados de diversas maneiras, como através da reconstrução de genomas completos de micro-organismos ainda não cultivados. A reconstrução de genomas de micro-organismos extremófilos detectados em *Deception*, como as arqueias hipertermófilas, pode fornecer informações importantes sobre seus aspectos biogeográficos e evolutivos. Além disso, através das informações obtidas com o Metagenoma, novos meios de cultura podem ser produzidos com a finalidade de favorecer o isolamento de micro-organismos ainda não cultivados em laboratório. A obtenção de isolados de *Deception* é de grande importância para estudos relacionados à fisiologia de micro-organismos extremófilos. O isolamento dos micro-organismos metabolicamente versáteis de *Deception*, em especial quimiolitotróficos anaeróbios, possui grande aplicabilidade em estudos de Astrobiologia, sobretudo para entender a sobrevivência desses micro-organismos em ambientes fora da Terra, como Marte e Europa.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, diferentes técnicas independentes de cultivo foram utilizadas para o estudo das comunidades microbianas de *Deception* visando entender: (i) qual é a abundância de bactérias e arqueias ao longo dos gradientes ambientais, (ii) quais os grupos microbianos estão presentes, (iii) qual é a diversidade nas fumarolas e geleiras e que grupos são únicos e compartilhados entre elas, (iv) e como as comunidades atuam, funcionam e estão adaptadas aos extremos ambientais.

5.1 Parâmetros ambientais

- Os parâmetros físico-químicos analisados mostram que o mosaico ambiental de *Deception* não está relacionado somente aos extremos de temperatura, mas também aos muitos compostos e elementos (como por exemplo, sulfato, ferro e amônia) que se distribuem em diferentes concentrações de acordo com a proximidade das fumarolas ou geleiras. As concentrações de sulfato e ferro são consideravelmente maiores nos pontos próximos às fumarolas, enquanto os compostos de nitrogênio são mais abundantes nos pontos próximos às geleiras.

5.2 Abundância de bactérias e arqueias na Ilha *Deception*

- A abundância de arqueias parece ser maior ou igual à abundância de bactérias na maior parte dos sedimentos analisados (com exceção da geleira de *Whalers Bay*), sugerindo uma proporção incomum para a maior parte dos solos antárticos estudados até o momento. Esse resultado sinaliza a importância das arqueias no microbioma dos ambientes geotermiais polares.
- A proporção de arqueias e bactérias está diretamente relacionada aos gradientes ambientais produzidos pela atividade vulcânica. Em temperaturas muito elevadas (acima de 90 °C) é provável que a abundância de bactérias e arqueias seja tão baixa que sua quantificação não foi possível através da técnica empregada. Compostos relacionados ao nitrogênio influenciam positivamente a abundância das comunidades microbianas relacionadas às geleiras, enquanto compostos de

origem vulcânica (p. ex. sulfato) e marinha (p. ex. sódio) influenciam a abundância de bactérias e arqueias nas fumarolas.

5.3 Composição taxonômica das comunidades microbianas em *Deception*

- As comunidades microbianas em *Deception* são compostas por grupos de bactérias e arqueias comumente encontrados em ambientes antárticos frios e geotermiais do continente, mas também por grupos não comuns em ambientes antárticos (arqueias hipertermófilas e bactérias do Filo *Caldithrix*), descritos principalmente em áreas de ventos hidrotermais de oceano profundo.
- Alguns grupos bacterianos são abundantes ao longo de todo o gradiente ambiental, indicando a sua versatilidade adaptativa (p. ex. membros de *Proteobacteria*). Outros são abundantes especificamente nas fumarolas, como *Caldithrix* e *Chloroflexi*, ou abundantes somente nos sedimentos associados às geleiras (p. ex. *Acidobacteria* e *Verrucomicrobia*). Temperaturas acima de 90 °C parecem não selecionar micro-organismos do Domínio Bacteria.
- Nenhum grupo de Archaea foi abundante ao longo de todo o gradiente ambiental, indicando os nichos específicos que esses organismos atuam. Arqueias metanogênicas dominam os sedimentos das geleiras, enquanto nas fumarolas de até 80 °C prevalecem as arqueias marinhas oxidadoras de amônia (*Nitrosopumilus*). Fumarolas de temperatura acima de 90 °C são prevalentemente colonizadas por arqueias hipertermófilas marinhas (*Pyrodictium*, Ordem Desulfurococcales), comuns em ventos hidrotermais de oceano profundo. A presença de hipertermófilos na Antártica, que até o momento só foram detectados na Ilha *Deception*, é de grande importância para estudos envolvendo biogeografia e evolução desses organismos no planeta.
- Os grupos de bactérias e arqueias encontrados na Ilha *Deception* mostraram uma combinação taxonômica única quando comparados a outros ambientes geotermiais, uma vez que são compostos por micro-organismos que habitam tanto ambientes geotermiais continentais, quanto marinhos rasos e profundos.

5.4 Diversidade das comunidades microbianas em *Deception*

- A riqueza e alfa diversidade de bactérias parece não ser influenciada pelos gradientes ambientais. Contudo, as análises de beta diversidade para Bacteria indicam que os grupos presentes nas fumarolas são filogeneticamente muito distintos dos grupos que habitam as geleiras.
- A riqueza e alfa diversidade de arqueias parece ser fortemente influenciada pelos gradientes ambientais. As geleiras abrigam uma diversidade de arqueias significativamente maior em relação às fumarolas. Ainda, em temperaturas acima de 90 °C, a diversidade de arqueias parece ser ainda menor. As análises de beta diversidade para Archaea mostram que *Deception* abriga comunidades de arqueias filogeneticamente muito distintas ao longo dos gradientes ambientais.

5.5 Influência dos parâmetros ambientais nas composição e diversidade das comunidades microbianas

- Um conjunto de parâmetros ambientais moldam a composição e diversidade de bactérias e arqueias na Ilha *Deception*.
- A composição de bactérias das geleiras é influenciada positivamente por cálcio, alumínio, amônia, e negativamente por temperatura, pH, condutividade elétrica, boro, sódio, potássio, cobre, magnésio e sulfato. A composição de arqueias das geleiras é influenciada positivamente pelos parâmetros pH, Ca, NO₃⁻ e NH₃ e negativamente pela temperatura.
- A composição de bactérias nas fumarolas de até 80 °C é influenciada positivamente pela temperatura, condutividade elétrica, sódio, potássio, magnésio e sulfato, e negativamente por matéria orgânica, carbono orgânico, cálcio, alumínio e amônia. A composição de arqueias nas fumarolas de até 80 °C é influenciada positivamente por boro, silício, sódio, magnésio e sulfato, e negativamente por matéria orgânica, carbono orgânico e amônia.

- A composição de arqueias nas fumarolas de 98 °C é influenciada positivamente pela temperatura, ferro e matéria orgânica, e negativamente por pH, sílica e cálcio.
- Os parâmetros que influenciam positivamente a diversidade de bactérias são pH e nitrato, e os que influenciam negativamente são temperatura, sulfato e sódio. Os baixos valores de correlação ($R^2 < 0,40$) indicam que a diversidade de bactérias é controlada pela atuação conjunta desses parâmetros.
- Os parâmetros que influenciam positivamente a diversidade de arqueias são pH, amônia e nitrato, enquanto os que influenciam negativamente são temperatura e sulfato. Contudo, os valores de correlação sugerem que a temperatura é o parâmetro que mais controla a diversidade de arqueias em *Deception*.

5.6 Respostas metabólicas e adaptativas das comunidades microbianas ao longo dos gradientes de temperatura

- As comunidades microbianas de *Deception* possuem diferentes respostas metabólicas e adaptativas de acordo os gradientes de temperatura.
- As comunidades microbianas associadas as geleiras estão envolvidas principalmente no ciclo do nitrogênio (nitrificação e desnitrificação) e carbono (fotossíntese, quimiorganotrofia e metanogênese). Apresentam mecanismos de resposta ao estresse osmótico, a baixas temperaturas (proteínas *cold-shock*) e a danos no DNA (reparo através de luz pela fotoliase).
- As comunidades microbianas das fumarolas de até 80 °C estão sobretudo envolvidas no ciclo do nitrogênio (amonificação, nitrificação e denitrificação), do carbono (fotossíntese) e do enxofre (oxidação de enxofre). É provável que o principal modo de obtenção de energia desses micro-organismos seja por autotrofia, uma vez que tanto a fotossíntese quanto a oxidação de enxofre (quimiolitoautotrofia) estão presentes. Apresentam mecanismos de resposta ao estresse osmótico, a baixas (proteínas *cold-shock*) e altas (proteínas *heat-shock*) temperaturas e a danos no DNA (reparo através de luz pela fotoliase).

- As comunidades microbianas associadas à fumarola de 98 °C estão principalmente envolvidas no ciclo do enxofre, através da redução de sulfato (anaerobiose), no ciclo do carbono (fixação de CO₂ – quimiolitotrofia) e no ciclo do nitrogênio (ammonificação), sendo compostas majoritariamente por arqueias hipertermófilas. Apresentam mecanismos de resposta ao estresse oxidativo (glutathione e glutaredoxina), a altas temperaturas (helicases e topoisomerasas) e a danos no DNA, através do reparo por excisão de bases. Ainda, essas comunidades exibem estratégias adaptativas a altas temperaturas específicas de arqueias hipertermófilas, como mecanismos específicos de recombinação, chaperoninas do tipo thermosomes e girase reversa.
- Este trabalho forneceu dados inéditos sobre a diversidade microbiana e suas estratégias adaptativas em ecossistemas geotermais polares.
- As condições ambientais extremas em *Deception* selecionam grupos de extremófilos funcionalmente distintos e potencialmente interessantes para estudos futuros sobre biogeografia, evolução microbiana e Astrobiologia.

REFERÊNCIAS¹

AISLABIE, J.; JORDAN, S.; AYTON, J.; KLASSEN, J. L.; BARKER, G. M.; TURNER, S. Bacterial diversity associated with ornithogenic soil of the Ross Sea region, Antarctica. **Canadian journal of microbiology**, v. 55, n. 1, p. 21-36, 2009.

AKANUMA, S.; NAKAJIMA, Y.; YOKOBORI, S.-I.; KIMURA, M.; NEMOTO, N.; MASE, T.; MIYAZONO, K.-I.; TANOKURA, M.; YAMAGISHI, A. Experimental evidence for the thermophilicity of ancestral life. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 27, p. 11067-11072, 2013.

ALBERS, S. V.; VAN DE VOSSENBERG, J. L.; DRIESSEN, A. J.; KONINGS, W. N. Adaptations of the archaeal cell membrane to heat stress. **Frontiers in bioscience**, v. 5, n. 1, p. 813-820, 2000.

ALBUQUERQUE, L.; RAINEY, F. A.; NOBRE, M. F.; DA COSTA, M. S. *Oceanicella actignis* gen. Nov., Sp. Nov., a halophilic slightly thermophilic member of the Alphaproteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 385-389, 2012.

ALVES, R.; VILAPRINYO, E.; SORRIBAS, A.; HERRERO, E. Evolution based on domain combinations: the case of glutaredoxins. **BMC evolutionary biology**, v. 9, p. 66-66, 2009.

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

AMENÁBAR, M. J.; FLORES, P. A.; PUGIN, B.; BOEHMWALD, F. A.; BLAMEY, J. M. Archaeal diversity from hydrothermal systems of Deception Island, Antarctica. **Polar Biology**, v. 36, n. 3, p. 373-380, 2013.

ARMIENTI, P.; TRIPODO, A. Petrography and chemistry of lavas and comagmatic xenoliths of Mt. Rittmann, a volcano discovered during the IV Italian expedition in Northern Victoria Land (Antarctica). **Mem Soc Geol It**, v. 46, p. 427-451, 1991.

ATLAS, R. M. **Handbook of Media for Environmental Microbiology**. 2005. 664 p.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AYALA-DEL-RÍO, H. L.; CHAIN, P. S.; GRZYMSKI, J. J.; PONDER, M. A.; IVANOVA, N.; BERGHOLZ, P. W.; BARTOLO, G. D.; HAUSER, L.; LAND, M.; BAKERMANS, C.; RODRIGUES, D.; KLAPPENBACH, J.; ZARKA, D.; LARIMER, F.; RICHARDSON, P.; MURRAY, A.; THOMASHOW, M.; TIEDJE, J. M. The genome sequence of psychrobacter arcticus 273-4, a psychroactive siberian permafrost bacterium, reveals mechanisms for adaptation to low-temperature growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2304-2312, 2010.

BABALOLA, O. O.; KIRBY, B. M.; LE ROES-HILL, M.; COOK, A. E.; CARY, S. C.; BURTON, S. G.; COWAN, D. A. Phylogenetic analysis of actinobacterial populations associated with Antarctic Dry Valley mineral soils. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 566-576, 2009.

BARAHONA, S.; DORADOR, C.; ZHANG, R.; AGUILAR, P.; SAND, W.; VERA, M.; REMONSELLEZ, F. Isolation and characterization of a novel Acidithiobacillus ferrivorans strain from the Chilean Altiplano: Attachment and biofilm formation on pyrite at low temperature. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 9, p. 782-793, 2014.

BARGAGLI, R.; BROADY, P. A.; WALTON, D. W. H. Preliminary investigation of the thermal biosystem of Mount Rittmann fumaroles (northern Victoria Land, Antarctica). **Antarctic Science**, v. 8, n. 2, p. 121-126, 1996.

BAYER, K.; KAMKE, J.; HENTSCHEL, U. Quantification of bacterial and archaeal symbionts in high and low microbial abundance sponges using real-time PCR. **FEMS microbiology ecology**, v. 89, n. 3, p. 679-690, 2014.

BECERRA, A.; RIVAS, M.; GARCÍA-FERRIS, C.; LAZCANO, A.; PERETÓ, J. A phylogenetic approach to the early evolution of autotrophy: the case of the reverse TCA and the reductive acetyl-CoA pathways. **International Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 91-97, 2014.

BERG, I. A. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 6, p. 1925-1936, 2011.

BERGMANN, G. T.; BATES, S. T.; EILERS, K. G.; LAUBER, C. L.; CAPORASO, J. G.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R.; FIERER, N. The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 1450-1455, 2011.

BERNDT, C.; LILLIG, C. H.; HOLMGREN, A. Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 4, p. 641-650, 2008.

BHAYA, D.; GROSSMAN, A. R.; STEUNOU, A.-S.; KHURI, N.; COHAN, F. M.;

HAMAMURA, N.; MELENDREZ, M. C.; BATESON, M. M.; WARD, D. M.; HEIDELBERG, J. F. Population level functional diversity in a microbial community revealed by comparative genomic and metagenomic analyses. **The ISME journal**, v. 1, n. 8, p. 703-713, 2007.

BLANCO, Y.; PRIETO-BALLESTEROS, O.; GÓMEZ, M. J.; MORENO-PAZ, M.; GARCÍA-VILLADANGOS, M.; RODRÍGUEZ-MANFREDI, J. A.; CRUZ-GIL, P.; SÁNCHEZ-ROMÁN, M.; RIVAS, L. A.; PARRO, V. Prokaryotic communities and operating metabolisms in the surface and the permafrost of Deception Island (Antarctica). **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 2495-2510, 2012.

BLOEM, J.; VENINGA, M.; SHEPHERD, J. Fully-Automatic Determination of Soil Bacterium Numbers, Cell Volumes, and Frequencies of Dividing Cells by Confocal Laser-Scanning Microscopy and Image-Analysis. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 926-936, 1995.

BOETIUS, A.; ANESIO, A. M.; DEMING, J. W.; MIKUCKI, J.; RAPP, J. Z. Microbial ecology of the cryosphere: sea ice and glacial habitats. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 677-690, 2014.

BOITEAU, L.; PASCAL, R. Energy Sources, Self-organization, and the Origin of Life. **Origins of Life and Evolution of Biospheres**, v. 41, n. 1, p. 23-33, 2011.

BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A. High-Temperature Deep-Subsurface Microbial Communities as a Possible Equivalent of Ancient Ecosystems. **Paleontological Journal**, v. 44, n. 7, p. 851-859, 2010.

BOOTHROYD, I. K. G. Ecological characteristics and management of geothermal systems of the Taupo Volcanic Zone, New Zealand. **Geothermics**, v. 38, n. 1, p. 200-209, 2009.

BORREL, G.; LEHOURS, A. C.; CROUZET, O.; JÉZÉQUEL, D.; ROCKNE, K.; KULCZAK, A.; DUFFAUD, E.; JOBLIN, K.; FONTY, G. Stratification of Archaea in the deep sediments of a freshwater meromictic lake: Vertical shift from methanogenic to uncultured Archaeal lineages. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

BOTTOS, E. M.; SCARROW, J. W.; ARCHER, S. D. J.; MCDONALD, I. R.; CARY, S. C. Bacterial community structures of Antarctic soils. In: COWAN, D. (Ed.). **Antarctic terrestrial microbiology**. New York, Springer, 2014. p. 9-33.

BOWMAN, J. P.; MCMEEKIN, T. A. Alteromonadales ord. nov. In: BRENNER, D.; KRIEG, N.; STALEY, J.; GARRITY, G.; BOONE, D.; VOS, P.; GOODFELLOW, M.; RAINEY, F.; SCHLEIFER, K. (Eds.). **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. New York, Springer, 2005. p. 443-491.

BROCK, T. D. **Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures**. Berlin, Springer-Verlag, 1978. 465 p.

CANGANELLA, F.; WIEGEL, J. Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. **Naturwissenschaften**, v. 98, n. 4, p. 253-279, 2011.

CAO, P.; ZHANG, L. M.; SHEN, J. P.; ZHENG, Y. M.; DI, H. J.; HE, J. Z. Distribution and diversity of archaeal communities in selected Chinese soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 1, p. 146-158, 2012.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; PEÑA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J. R.; TURNBAUGH, P. J.; WALTERS, W. A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S. M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J. A.; SMITH, G.; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621-1624, 2012.

CARRIÓN, O.; MIÑANA-GALBIS, D.; MONTES, M. J.; MERCADÉ, E. *Pseudomonas deceptionensis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium from the antarctic. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 2401-2405, 2011.

CASAMAYOR, E. O.; MASSANA, R.; BENLLOCH, S.; ØVREÅS, L.; DÍEZ, B.; GODDARD, V. J.; GASOL, J. M.; JOINT, I.; RODRÍGUEZ-VALERA, F.; PEDRÓS-ALIÓ, C. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 338-348, 2002.

CASANUEVA, A.; TUFFIN, M.; CARY, C.; COWAN, D. A. Molecular adaptations to psychrophily: The impact of 'omic' technologies. **Trends in microbiology**, v. 18, n. 8, p. 374-381, 2010.

CASELLI, A. T.; DOS SANTOS AFONSO, M.; RISSO, C.; GARCÍA, A.; ORTIZ, R. Caracterización geoquímica de los gases volcánicos de la isla Decepción (Shetland del Sur, Antártida). **Revista de la Asociacion Geologica Argentina**, v. 57, n. 1, p. 69-79, 2002.

CAVICCHIOLI, R. Extremophiles and the search for extraterrestrial life. **Astrobiology**, v. 2, n. 3, p. 281-292, 2002.

_____. Microbial ecology of Antarctic aquatic systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 691-706, 2015.

CHAN, Y.; VAN NOSTRAND, J. D.; ZHOU, J.; POINTING, S. B.; FARRELL, R. L. Functional ecology of an Antarctic Dry Valley. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 22, p. 8990-8995, 2013.

CHATTOPADHYAY, M. K. Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. **Journal of biosciences**, v. 31, n. 1, p. 157-165, 2006.

CHEN, W.; ZHANG, C. K.; CHENG, Y.; ZHANG, S.; ZHAO, H. A comparison of methods for clustering 16S rRNA sequences into OTUs. **PloS one**, v. 8, p. e70837-e70837, 2013.

CHEN, Z.; YU, H.; LI, L.; HU, S.; DONG, X. The genome and transcriptome of a newly described psychrophilic archaeon, *Methanlobus psychrophilus* R15, reveal its cold adaptive characteristics. **Environmental microbiology reports**, v. 4, n. 6, p. 633-641, 2012.

CHEVRIER, V. F.; RIVERA-VALENTIN, E. G. Formation of recurring slope lineae by liquid brines on present-day Mars. **Geophysical Research Letters**, v. 39, n. 21, p. 1944-8007, 2012.

CHOWN, S. L.; CLARKE, A.; FRASER, C. I.; CARY, S. C.; MOON, K. L.; MCGEOCH, M. A. The changing form of Antarctic biodiversity. **Nature**, v. 522, n. 7557, p. 431-438, 2015.

CHRISTNER, B. C.; PRISCU, J. C.; ACHBERGER, A. M.; BARBANTE, C.; CARTER, S. P.; CHRISTIANSON, K.; MICHAUD, A. B.; MIKUCKI, J. A.; MITCHELL, A. C.; SKIDMORE, M. L.; VICK-MAJORS, T. J.; ADKINS, W. P.; ANANDAKRISHNAN, S.; BARCHECK, G.; BEEM, L.; BEHAR, A.; BEITCH, M.; BOLSEY, R.; BRANECKY, C.; EDWARDS, R.; FISHER, A.; FRICKER, H. A.; FOLEY, N.; GUTHRIE, B.; HODSON, T.; JACOBEL, R.; KELLEY, S.; MANKOFF, K. D.; MCBRYAN, E.; POWELL, R.; PURCELL, A.; SAMPSON, D.; SCHERER, R.; SHERVE, J.; SIEGFRIED, M.; TULACZYK, S. A microbial ecosystem beneath the West Antarctic ice sheet. **Nature**, v. 512, n. 7514, p. 310-313, 2014.

CLARK, B. C.; VAN HART, D. C. The salts of Mars. **Icarus**, v. 45, n. 2, p. 370-378, 1981.

COMOLLI, L. Intra-and inter-species interactions in microbial communities. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-3, 2014.

CONNON, S. A.; GIOVANNONI, S. J. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3878-3885, 2002.

COSTELLO, E. K.; HALLOY, S. R. P.; REED, S. C.; SOWELL, P.; SCHMIDT, S. K. Fumarole-supported islands of biodiversity within a hyperarid, high-elevation landscape on socompa volcano, puna de atacama, andes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 735-747, 2009.

COWAN, D. **Antarctic Terrestrial Microbiology: Physical and Biological Properties of Antarctic Soils**. New York, Springer, 2014. 328 p.

COWAN, D. A.; TOW, L. A. Endangered antarctic environments. **Annual review of microbiology**, v. 58, p. 649-690, 2004.

COWIE, R. O. M. **Bacterial community structure, function and diversity in Antarctic sea ice**. 2011. 285 f. Tese (Doutorado). Victoria University of Wellington, Nova Zelândia, 2011.

DARCY, J. L.; LYNCH, R. C.; KING, A. J.; ROBESON, M. S.; SCHMIDT, S. K. Global distribution of Polaromonas phylotypes - evidence for a highly successful dispersal capacity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

DE MAAYER, P.; ANDERSON, D.; CARY, C.; COWAN, D. A. **Some like it cold: Understanding the survival strategies of psychrophiles**: Nature Publishing Group. v. 15, p. 508-517, 2014.

DEBRUYN, J. M.; NIXON, L. T.; FAWAZ, M. N.; JOHNSON, A. M.; RADOSEVICH, M. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of Gemmatimonadetes in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6295-6300, 2011.

DEMING, J. W. Psychrophiles and polar regions. **Current opinion in microbiology**. v.5, p. 301-309, 2002.

DES MARAIS, D. J.; NUTH, J. A.; ALLAMANDOLA, L. J.; BOSS, A. P.; FARMER, J. D.; HOEHLER, T. M.; JAKOSKY, B. M.; MEADOWS, V. S.; POHORILLE, A.; RUNNEGAR, B.; SPORMANN, A. M. The NASA Astrobiology Roadmap. **Astrobiology**, v. 8, n. 4, p. 715-730, 2008.

DESANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E. L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSEN, G. L. Greengenes, a

chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069-5072, 2006.

DONG, H.; MUKAIYAMA, A.; TADOKORO, T.; KOGA, Y.; TAKANO, K.; KANAYA, S. Hydrophobic Effect on the Stability and Folding of a Hyperthermophilic Protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 378, n. 1, p. 264-272, 2008.

DRIDI, B.; FARDEAU, M. L.; OLLIVIER, B.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 1902-1907, 2012.

DUARTE, R. T. D. **Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras, e permafrost polares**. 2010. 201 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DUCEY, T. F.; VANOTTI, M. B.; SHRINER, A. D.; SZOGI, A. A.; ELLISON, A. Q. Characterization of a microbial community capable of nitrification at cold temperature. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 491-500, 2010.

DUNFIELD, P. F.; YURYEV, A.; SENIN, P.; SMIRNOVA, A. V.; STOTT, M. B.; HOU, S.; LY, B.; SAW, J. H.; ZHOU, Z.; REN, Y.; WANG, J.; MOUNTAIN, B. W.; CROWE, M. A.; WEATHERBY, T. M.; BODELIER, P. L.; LIESACK, W.; FENG, L.; WANG, L.; ALAM, M. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 879-882, 2007.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

_____. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, p. 996-998, 2013.

EISEN, Jonathan A. Environmental shotgun sequencing: its potential and challenges for studying the hidden world of microbes. **PLoS Biology**, v. 5, n. 3, p. e82, 2007.

ELCOCK, A. H. The stability of salt bridges at high temperatures: implications for hyperthermophilic proteins. **Journal of molecular biology**, v. 284, n. 2, p. 489-502, 1998.

ELOE-FADROSH, E. A.; IVANOVA, N. N.; WOYKE, T.; KYRPIDES, N. C. Metagenomics uncovers gaps in amplicon-based detection of microbial diversity. **Nature Microbiology**, v. 1, n. February, p. 15032-15032, 2016.

ELSHAHEED, M. S.; YOUSSEF, N. H.; LUO, Q.; NAJAR, F. Z.; ROE, B. A.; SISK, T. M.; BÜHRING, S. I.; HINRICHS, K. U.; KRUMHOLZ, L. R. Phylogenetic and metabolic diversity of Planctomycetes from anaerobic, sulfide- and sulfur-rich Zodletone Spring, Oklahoma. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 15, p. 4707-4716, 2007.

EMPADINHAS, N.; COSTA, M. S. D. Diversity and biosynthesis of compatible solutes in hyper/thermophiles. **International Microbiology**, v. 9, p. 199-206, 2006.

ERCOLINI, D. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 10, p. 3148-3155, 2013.

FEDOSOV, D. V.; PODKOPAEVA, D. A.; MIROSHNICHENKO, M. L.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A.; LEBEDINSKY, A. V.; GRABOVICH, M. Y. Investigation of the catabolism of acetate and peptides in the new anaerobic thermophilic bacterium *Caldithrix abyssi*. **Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 119-124, 2006.

FEEHILY, C.; KARATZAS, K. A. G. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 1, p. 11-24, 2013.

FERNÁNDEZ-GÓMEZ, B.; RICHTER, M.; SCHÜLER, M.; PINHASSI, J.; ACINAS, S. G.; GONZÁLEZ, J. M.; PEDRÓS-ALIÓ, C. Ecology of marine Bacteroidetes: A comparative genomics approach. **The ISME Journal**, v. 7, p. 1026-1037, 2013.

FERRER, M.; GUAZZARONI, M. E.; RICHTER, M.; GARCÍA-SALAMANCA, A.; YARZA, P.; SUÁREZ-SUÁREZ, A.; SOLANO, J.; ALCAIDE, M.; VAN DILLEWIJN, P.; MOLINA-HENARES, M. A.; LÓPEZ-CORTÉS, N.; AL-RAMAH, Y.; GUERRERO, C.; ACOSTA, A.; DE EUGENIO, L. I.; MARTÍNEZ, V.; MARQUES, S.; ROJO, F.; SANTERO, E.; GENILLOU, O.; PÉREZ-PÉREZ, J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; RAMOS, J. L. Taxonomic and Functional Metagenomic Profiling of the Microbial Community in the Anoxic Sediment of a Sub-saline Shallow Lake (Laguna de Carrizo, Central Spain). **Microbial Ecology**, v. 62, n. 4, p. 824-837, 2011.

FINNERAN, K. T.; JOHNSEN, C. V.; LOVLEY, D. R. *Rhodoferax ferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 669-673, 2003.

FISHER, W. On grouping for maximum homogeneity. **American Statistical Association Journal**, v. 53, n. June, p. 789-798, 1958.

FRANZMANN, P. D.; STACKEBRANDT, E.; SANDERSON, K.; VOLKMAN, J. K.;

CAMERON, D. E.; STEVENSON, P. L.; MCMEEKIN, T. A.; BURTON, H. R. *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., a Halophilic Bacterium Isolated from Deep Lake, Antarctica. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 20-27, 1988.

FUERST, J. A.; SAGULENKO, E. Beyond the bacterium: Planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 403-413, 2011.

GANTNER, S.; ANDERSSON, A. F.; ALONSO-SÁEZ, L.; BERTILSSON, S. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n. 1, p. 12-18, 2011.

GELSINGER, D.; CASSANI, M.; JEWELL, T.; DE LA TORRE, J. Inhibition of ammonia oxidation in the thermophilic ammonia-oxidizing archaeon *Nitrosocaldus yellowstonii* (617.6). **The FASEB Journal**, v. 28, n. 1, 2014.

GHAH, R.; RODRÍGUEZ-VALERA, F.; MCMAHON, K. D.; TOYAMA, D.; RINKE, R.; DE OLIVEIRA, T. C. S.; GARCIA, J. W.; DE MIRANDA, F. P.; HENRIQUE-SILVA, F. Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon river. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

GILLAN, D. C.; DANIS, B. The archaeobacterial communities in Antarctic bathypelagic sediments. **Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 54, n. 16-17, p. 1682-1690, 2007.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.

GLASS, E. M.; MEYER, F. The metagenomics RAST server: a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. In: DE BRUIJN, F. **Handbook of molecular microbial ecology II: metagenomics and complementary approaches**. New York, John Wiley & Sons, 2011. p. 325-331.

GONZALEZ-GIL, G.; SOUGRAT, R.; BEHZAD, A. R.; LENS, P. N. L.; SAIKALY, P. E. Microbial Community Composition and Ultrastructure of Granules from a Full-Scale Anammox Reactor. **Microbial Ecology**, p. 118-131, 2014.

GOSINK, J. J.; HERWIG, R. P.; STALEY, J. T. *Octadecabacter arcticus* gen. nov., sp. nov., and *O. antarcticus*, sp. nov., Nonpigmented, Psychrophilic Gas Vacuolate Bacteria from Polar Sea Ice and Water. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 356-365, 1997.

GRABOVICH, M.; GAVRISH, E.; KUEVER, J.; LYSENKO, A. M.; PODKOPAEVA,

D.; DUBININA, G. Proposal of *Giesbergeria voronezhensis* gen. nov., sp. nov. and *G. kuznetsovii* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, p. 569-576, 2006.

GRASSO, S.; TELL, G. Base excision repair in Archaea: Back to the future in DNA repair. **Elsevier**. v. 21, p. 148-157, 2014.

GREENE, A. C.; PATEL, B. K.; SHEEHY, A. J. *Deferribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic manganese- and iron-reducing bacterium isolated from a petroleum reservoir. **International journal of systematic bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 505-509, 1997.

GRIBALDO, S.; LUMIA, V.; CRETI, R.; CONWAY DE MACARIO, E.; SANANGELANTONI, A.; CAMMARANO, P. Discontinuous occurrence of the hsp70 (dnaK) gene among Archaea and sequence features of HSP70 suggest a novel outlook on phylogenies inferred from this protein. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 2, p. 434-443, 1999.

GROGAN, D. Understanding DNA repair in hyperthermophilic Archaea: persistent gaps and other reasons to focus on the fork. **Archaea**, v. 2015, p. 1-12, 2015.

HAWKINS, A. S.; HAN, Y.; BENNETT, R. K.; ADAMS, M. W. W.; KELLY, R. M. Role of 4-hydroxy butyrate co a synthetase in the CO₂ fixation cycle in thermoacidophilic archaea. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 6, p. 4012-4022, 2013.

HEINEMANN, J.; HAMERLY, T.; MAATY, W. S.; MOVAHED, N.; STEFFENS, J. D.; REEVES, B. D.; HILMER, J. K.; THERIEN, J.; GRIECO, P. A.; PETERS, J. W.; BOTHNER, B. Expanding the paradigm of thiol redox in the thermophilic root of life. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 1, p. 80-85, 2014.

HERBOLD, C. W.; LEE, C. K.; MCDONALD, I. R.; CARY, S. C. Evidence of global-scale aeolian dispersal and endemism in isolated geothermal microbial communities of Antarctica. **Nature communications**, v. 5, p. 3875-3875, 2014.

HERBOLD, C. W.; MCDONALD, I.; CARY, C. Microbial Ecology of Geothermal Habitats in Antarctica. In: COWAN, D. (Ed.). **Antarctic Terrestrial Microbiology**. New York, Springer, 2014. p. 181-215.

HILL, T. C. J.; WALSH, K. A.; HARRIS, J. A.; MOFFETT, B. F. Using ecological diversity measures with bacterial communities. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, n. 1, p. 1-11, 2003.

HOPKINS, D. W.; SPARROW, A. D.; ELBERLING, B.; GREGORICH, E. G.; NOVIS,

P. M.; GREENFIELD, L. G.; TILSTON, E. L. Carbon, nitrogen and temperature controls on microbial activity in soils from an Antarctic dry valley. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 3130-3140, 2006.

HORIKOSHI, K.; ANTRANIKIAN, G.; BULL, A. T.; ROBB, F. T.; STETTER, K. O. (Eds.). **Extremophiles handbook**. New York, Springer, 2010. 1246 p.

HUBER, H.; STETTER, K. O. Order II. Desulfurococcales ord. nov. In: GARRITY, G.; BOONE, D.; CASTENHOLZ, R. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York, Springer, 2001. v. 1, p. 179-180.

_____. Desulfurococcales. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Eds.). **The prokaryotes**. New York, Springer, 2006. p. 52-68.

HUG, L. A.; CASTELLE, C. J.; WRIGHTON, K. C.; THOMAS, B. C.; SHARON, I.; FRISCHKORN, K. R.; WILLIAMS, K. H.; TRINGE, S. G.; BANFIELD, J. F. Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. **Microbiome**, v. 1, n. 1, p. 22-22, 2013.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W.; WEBB, R. I.; WAGNER, A. M.; BLACKALL, L. L. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain Bacteria, with no known pure-culture representatives. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 411-419, 2001.

HÜGLER, M.; HUBER, H.; STETTER, K. O.; FUCHS, G. Autotrophic CO₂ fixation pathways in archaea (Crenarchaeota). **Archives of microbiology**, v. 179, n. 3, p. 160-173, 2003.

HUMPHRY, D. R.; GEORGE, A.; BLACK, G. W.; CUMMINGS, S. P. *Flavobacterium frigidarium* sp. nov., an aerobic, psychrophilic, xylanolytic and laminarinolytic bacterium from Antarctica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1235-1243, 2001.

IINO, T.; TAMAKI, H.; TAMAZAWA, S.; UENO, Y.; OHKUMA, M.; SUZUKI, K. I.; IGARASHI, Y.; HARUTA, S. *Candidatus Methanogranum caenicola*: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class Thermoplasmata. **Microbes and Environments**, v. 28, n. 2, p. 244-250, 2013.

INSKEEP, W. P.; RUSCH, D. B.; JAY, Z. J.; HERRGARD, M. J.; KOZUBAL, M. A.; RICHARDSON, T. H.; MACUR, R. E.; HAMAMURA, N.; JENNINGS, R. D. M.;

FOUKE, B. W.; REYSENBACH, A. L.; ROBERTO, F.; YOUNG, M.; SCHWARTZ, A.; BOYD, E. S.; BADGER, J. H.; MATHUR, E. J.; ORTMANN, A. C.; BATESON, M.; GEESEY, G.; FRAZIER, M. Metagenomes from high-temperature chemotrophic systems reveal geochemical controls on microbial community structure and function. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 2010.

JAY, Z. J.; BEAM, J. P.; KOZUBAL, M. A.; DEM JENNINGS, R.; RUSCH, D. B.; INSKEEP, W. P. The distribution, diversity and function of predominant Thermoproteales in high-temperature environments of Yellowstone National Park. **Environmental microbiology**, 2016.

JEAN, W. D.; SHIEH, W. Y.; LIU, T. Y. *Thalassomonas agarivorans* sp. nov., a marine agarolytic bacterium isolated from shallow coastal water of An-Ping Harbour, Taiwan, and emended description of the genus *Thalassomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1245-1250, 2006.

JIANG, F.; LI, W.; XIAO, M.; DAI, J.; KAN, W.; CHEN, L.; LI, W.; FANG, C.; PENG, F. *Luteolibacter luojiensis* sp. nov., isolated from Arctic tundra soil, and emended description of the genus *Luteolibacter*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 2259-2263, 2012.

JOSHI, N.; FASS, J. Sickel: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33), p. 2011-2011, 2011.

JUNG, D. O.; ACHENBACH, L. A.; KARR, E. A.; TAKAICHI, S.; MADIGAN, M. T. A gas vesiculate planktonic strain of the purple non-sulfur bacterium *Rhodospirillum rubrum* isolated from lake Fryxell, Dry Valleys, Antarctica. **Archives of Microbiology**, v. 182, n. 2-3, p. 236-243, 2004.

JUNGBLUT, A. D.; LOVEJOY, C.; VINCENT, W. F. Global distribution of cyanobacterial ecotypes in the cold biosphere. **The ISME Journal**, v. 4, n. 2, p. 191-202, 2010.

KÄMPFER, P.; LODDERS, N.; FALSEN, E. *Hydrocolea flava* gen. nov., sp. nov., a new member of the phylum Bacteroidetes and allocation of the genera *Chitinophaga*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 61, n. 3, p. 518-523, 2011.

KARAEVSKAYA, E. S.; DEMCHENKO, L. S.; DEMIDOV, N. E.; RIVKINA, E. M.; BULAT, S. A.; GILICHINSKY, D. A. Archaeal diversity in permafrost deposits of Bunge Hills Oasis and King George Island (Antarctica) according to the 16S rRNA gene sequencing. **Microbiology**, v. 83, n. 4, p. 398-406, 2014.

KAWAI, S.; MUKAI, T.; MORI, S.; MIKAMI, B.; MURATA, K. Hypothesis: structures,

evolution, and ancestor of glucose kinases in the hexokinase family. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 320-330, 2005.

KENDRICK, M. G.; KRAL, T. A. Survival of methanogens during desiccation: implications for life on Mars. **Astrobiology**, v. 6, n. 4, p. 546-551, 2006.

KIELAK, A. M.; BARRETO, C. C.; KOWALCHUK, G. A.; VAN VEEN, J. A.; KURAMAE, E. E. The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 744, 2016.

KIM, A. R.; LEE, S.; HAN, K.; AHN, T. Y. *Arenimonas aquaticum* sp. nov., a Member of the Gammaproteobacterium, Isolated from a Freshwater Reservoir. **The Journal of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 354-358, 2012.

KIM, O. S.; CHAE, N.; LIM, H. S.; CHO, A.; KIM, J. H.; HONG, S. G.; OH, J. Bacterial diversity in ornithogenic soils compared to mineral soils on King George Island, Antarctica. **Journal of Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1081-1085, 2012.

KING, G. M. Chemolithotrophic Bacteria: Distributions, Functions and Significance in Volcanic Environments. **Microbes and Environments**, v. 22, n. 4, p. 309-319, 2007.

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST, C.; HORN, M.; GLÖCKNER, F. O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, 2013.

KLUMPP, M.; BAUMEISTER, W. The thermosome: Archetype of group II chaperonins. **FEBS letters**, v. 430, p.73-77, 1998.

KONHAUSER, K. **Introduction to geomicrobiology**. 2007. New York, John Wiley & Sons. 425 p.

KÖNNEKE, M.; BERNHARD, A. E.; DE LA TORRE, J. R.; WALKER, C. B.; WATERBURY, J. B.; STAHL, D. A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature**, v. 437, n. 7058, p. 543-546, 2005.

KORMAS, K. A.; TAMAKI, H.; HANADA, S.; KAMAGATA, Y. Apparent richness and community composition of Bacteria and Archaea in geothermal springs. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 57, n. 2, p. 113-122, 2009.

KOZICH, J. J.; WESTCOTT, S. L.; BAXTER, N. T.; HIGHLANDER, S. K.; SCHLOSS, P. D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 17, p. 5112-5120, 2013.

KRAUSE, L.; DIAZ, N. N.; GOESMANN, A.; KELLEY, S.; NATTKEMPER, T. W.; ROHWER, F.; EDWARDS, R. A.; STOYE, J. Phylogenetic classification of short environmental DNA fragments. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 7, p. 2230-2239, 2008.

KREBS, J. E.; VAISHAMPAYAN, P.; PROBST, A. J.; TOM, L. M.; MARTEINSSON, V. T.; ANDERSEN, G. L.; VENKATESWARAN, K. Microbial Community Structures of Novel Icelandic Hot Spring Systems Revealed by PhyloChip G3 Analysis. **Astrobiology**, v. 14, n. 3, p. 229-240, 2014.

KUHN, E. Toward understanding life under subzero conditions: the significance of exploring psychrophilic "cold-shock" proteins. **Astrobiology**, v. 12, p. 1078-1086, 2012.

KWON, S. W.; KIM, B. Y.; WEON, H. Y.; BAEK, Y. K.; GO, S. J. *Arenimonas donghaensis* gen. nov., sp. nov., isolated from seashore sand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 954-958, 2007.

KYLE, P. R.; MOORE, J. A.; THIRLWALL, M. F. Petrologic evolution of anorthoclase phonolite lavas at Mount Erebus, Ross island, Antarctica. **Journal of Petrology**, v. 33, n. 4, p. 849-875, 1992.

LABRENZ, M.; TINDALL, B. J.; LAWSON, P. A.; COLLINS, M. D.; SCHUMANN, P.; HIRSCH, P. *Staleyella guttiformis* gen. nov., sp. nov. and *Sulfitobacter brevis* sp. nov., α -3-proteobacteria from hypersaline, heliothermal and meromictic antarctic Ekho Lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 303-313, 2000.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, p. 125-175, 1991.

LARGE, A. T.; GOLDBERG, M. D.; LUND, P. A. Chaperones and protein folding in the archaea. **Biochemical Society transactions**, v. 37, n. 1, p. 46-51, 2009.

LEARMAN, D. R.; HENSON, M. W.; THRASH, J. C.; TEMPERTON, B.; BRANNOCK, P. M.; SANTOS, S. R.; MAHON, A. R.; HALANYCH, K. M. Biogeochemical and microbial variation across 5500 km of Antarctic surface sediment implicates organic matter as a driver of benthic community structure. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-11 2016.

LEBEDINSKY, A. V.; CHERNYH, N. A.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A. Phylogenetic systematics of microorganisms inhabiting thermal environments. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 72, n. 12, p. 1299-1312, 2007.

LEE, K. C. Y.; HERBOLD, W.; DUNFIELD, P. F.; MORGAN, X. C.; MCDONALD, I. R.; STOTT, M. B. Phylogenetic delineation of the novel Phylum *armatimonadetes*

(former candidate division OP10) and definition of two novel candidate divisions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 7, p. 2484-2487, 2013.

LEFEVRE, C. T.; FRANKEL, R. B.; ABREU, F.; LINS, U.; BAZYLINSKI, D. A. Culture-independent characterization of a novel, uncultivated magnetotactic member of the Nitrospirae phylum. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 538-549, 2011.

LEGENDRE, P.; ANDERSSON, M. J. Distance-based redundancy analysis: Testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. **Ecological Monographs**, v. 69, n. 1, p. 1-24, 1999.

LENTINI, V.; GUGLIANDOLO, C.; BUNK, B.; OVERMANN, J.; MAUGERI, T. L. Diversity of prokaryotic community at a shallow marine hydrothermal site elucidated by illumina sequencing technology. **Current Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 457-466, 2014.

LIM, J. H.; BAEK, S. H.; LEE, S. T. Ferruginibacter alkalilentus gen. nov., sp. nov. and ferruginibacter lapsinanis sp. nov., novel members of the family 'chitinophagaceae' in the phylum Bacteroidetes, isolated from freshwater sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 2394-2399, 2009.

LIN, T. J.; EL SEBAE, G.; JUNG, J. H.; JUNG, D. H.; PARK, C. S.; HOLDEN, J. F. Pyrodictium delaneyi sp. nov., a hyperthermophilic autotrophic archaeon that reduces Fe (III) oxide and nitrate. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, p. 3372-3376, 2016.

LIU, B.; ZHANG, Y.; ZHANG, W. RNA-seq-based analysis of cold shock response in Thermoanaerobacter tengcongensis, a bacterium harboring a single cold shock protein encoding gene. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e93289-e93289, 2014.

LLARCH, A.; LOGAN, N. A.; CASTELLVÍ, J.; PRIETO, M. J.; GUINEA, J. Isolation and characterization of thermophilic Bacillus spp. from geothermal environments on Deception Island, South Shetland archipelago. **Microbial Ecology**, v. 34, n. 1, p. 58-65, 1997.

LÓPEZ-GARCI, P.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; MOREIRA, D.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Diversity of free-living prokaryotes from a deep-sea site at the Antarctic Polar Front. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 36, n. 2-3, p. 193-202, 2001.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228-8235, 2005.

LOZUPONE, C.; LLADSER, M. E.; KNIGHTS, D.; STOMBAUGH, J.; KNIGHT, R. UniFrac: An effective distance metric for microbial community comparison. **The ISME**

Journal, v. 5, n. 2, p. 169-172, 2011.

LÜCKER, S.; WAGNER, M.; MAIXNER, F.; PELLETIER, E.; KOCH, H.; VACHERIE, B.; RATTEL, T.; DAMSTÉ, J. S. S.; SPIECK, E.; LE PASLIER, D.; DAIMS, H. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 30, p. 13479-13484, 2010.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H.; YADHUKUMAR, A.; BUCHNER, A.; LAI, T.; STEPPI, S.; JACOB, G.; FÖRSTER, W.; BRETTSCHE, I.; GERBER, S.; GINHART, A. W.; GROSS, O.; GRUMANN, S.; HERMANN, S.; JOST, R.; KÖNIG, A.; LISS, T.; LÜBBMANN, R.; MAY, M.; NONHOFF, B.; REICHEL, B.; STREHLOW, R.; STAMATAKIS, A.; STUCKMANN, N.; VILBIG, A.; LENKE, M.; LUDWIG, T.; BODE, A.; SCHLEIFER, K. H. ARB: A software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 4, p. 1363-1371, 2004.

LULCHEV, P.; KLOSTERMEIER, D. Reverse gyrase - Recent advances and current mechanistic understanding of positive DNA supercoiling. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 13, p. 8200-8213, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. *Microbiologia de Brock*. 14th ed. São Paulo, **Artmed Editora**, 2016. 1032 p.

MAGALHÃES, C.; MACHADO, A.; FRANK-FAHLE, B.; LEE, C. K.; CARY, C. S. The ecological dichotomy of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the hyper-arid soils of the Antarctic Dry Valleys. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-11, 2014.

MANCUSO NICHOLS, C. A.; GUEZENNEC, J.; BOWMAN, J. P. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the Southern Ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: A review. **Marine biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 253-271, 2005.

MCCAMMON, S. A.; BOWMAN, J. P. Taxonomy of Antarctic *Flavobacterium* species: description of *Flavobacterium gillisiae* sp. nov., *Flavobacterium tegetincola* sp. nov., and *Flavobacterium xanthum* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 50, n. 3, p. 1055-1063, 2000.

MENZEL, P.; GUDBERGSDÓTTIR, S. R.; RIKE, A. G.; LIN, L.; ZHANG, Q.; CONTURSI, P.; MORACCI, M.; KRISTJANSSON, J. K.; BOLDUC, B.; GAVRILOV, S.; RAVIN, N.; MARDANOV, A.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.; YOUNG, M.; KROGH, A.; PENG, X. Comparative Metagenomics of Eight Geographically Remote Terrestrial Hot Springs. **Microbial Ecology**, v. 70, n. 2, p. 411-424, 2015.

METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature reviews. Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.

MILLER, S. R.; STRONG, A. L.; JONES, K. L.; UNGERER, M. C. Bar-coded pyrosequencing reveals shared bacterial community properties along the temperature gradients of two alkaline hot springs in Yellowstone National Park. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 13, p. 4565-4572, 2009.

MIROSHNICHENKO, M. L.; KOLGANOVA, T. V.; SPRING, S.; CHERNYH, N.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A. *Caldithrix palaeochoryensis* sp. nov., a thermophilic, anaerobic, chemo-organotrophic bacterium from a geothermally heated sediment, and emended description of the genus *Caldithrix*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 60, n. 9, p. 2120-2123, 2010.

MIROSHNICHENKO, M. L.; SLOBODKIN, A. I.; KOSTRIKINA, N. A.; L'HARIDON, S.; NERCESSIAN, O.; SPRING, S.; STACKEBRANDT, E.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A.; JEANTHON, C. *Deferribacter abyssi* sp. nov., an anaerobic thermophile from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1637-1641, 2003.

MOROZOVA, D.; MÖHLMANN, D.; WAGNER, D. Survival of methanogenic archaea from Siberian permafrost under simulated Martian thermal conditions. **Origins of Life and Evolution of the Biosphere**, v. 37, n. 2, p. 189-200, 2007.

MOSES, S.; SINNER, T.; ZAPRASIL, A.; STÖVEKEN, N.; HOFFMANN, T.; SONENSHEIN, B. R. B.; BORIS, R. B.; BREMER, E. Proline utilization by *Bacillus subtilis*: Uptake and catabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 4, p. 745-758, 2012.

MOYER, C. L.; DOBBS, F. C.; KARL, D. M. Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi seamount, Hawaii. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1555-1562, 1995.

MUMMA, M. J.; VILLANUEVA, G. L.; NOVAK, R. E.; HEWAGAMA, T.; BONEV, B. P.; DISANTI, M. A.; MANDELL, A. M.; SMITH, M. D. Strong release of methane on Mars in northern summer 2003. **Science**, v. 323, n. 5917, p. 1041-1045, 2009.

MUÑOZ, P. A.; FLORES, P. A.; BOEHMWALD, F. A.; BLAMEY, J. M. Thermophilic bacteria present in a sample from Fumarole Bay, Deception Island. **Antarctic Science; Antarctic Science Ltd**, v. 23, n. 6, p. 549-555, 2011.

MUNSHI, S.; STANLEY, R. J. Extremophile Enzymatic DNA Repair. **Biophysical Journal**, v. 104, n. 2, p. 490a-490a, 2013.

MURRAY, A. E.; PENG, V.; TYLER, C.; WAGH, P. Marine bacterioplankton biomass,

activity and community structure in the vicinity of Antarctic icebergs. **Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 58, n. 11-12, p. 1407-1421, 2011.

MUYZER G UITTERLINDEN AG, D. W. E. C. U. A. G. D. W. E. C. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Apply Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

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

NAKAGAWA, T.; TAKAI, K.; SUZUKI, Y.; HIRAYAMA, H.; KONNO, U.; TSUNOGAI, U.; HORIKOSHI, K. Geomicrobiological exploration and characterization of a novel deep-sea hydrothermal system at the TOTO caldera in the Mariana Volcanic Arc. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 37-49, 2006.

NATHAN, S.; SCHULTE, F. J. Recent thermal and volcanic activity on Mount Melbourne, northern Victoria Land, Antarctica. **New Zealand journal of geology and geophysics**, v. 10, n. 2, p. 422-430, 1967.

NELSON, M. C.; MORRISON, H. G.; BENJAMINO, J.; GRIM, S. L.; GRAF, J. Analysis, optimization and verification of illumina-generated 16s rRNA gene amplicon surveys. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

NEWCOMBE, R. G. Improved confidence intervals for the difference between binomial proportions based on paired data. **Statistics in Medicine**, v. 17, n. 22, p. 2635-2650, 1998.

NG, C.; DEMAERE, M. Z.; WILLIAMS, T. J.; LAURO, F. M.; RAFTERY, M.; GIBSON, J. A. E.; ANDREWS-PFANNKOCH, C.; LEWIS, M.; HOFFMAN, J. M.; THOMAS, T.; CAVICCHIOLI, R. Metaproteogenomic analysis of a dominant green sulfur bacterium from Ace Lake, Antarctica. **The ISME journal**, v. 4, n. 8, p. 1002-1019, 2010.

NIEDERBERGER, T. D.; PERREAULT, N. N.; LAWRENCE, J. R.; NADEAU, J. L.; MIELKE, R. E.; GREER, C. W.; ANDERSEN, D. T.; WHYTE, L. G. Novel sulfur-oxidizing streamers thriving in perennial cold saline springs of the Canadian high Arctic. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 616-629, 2009.

NORTON, C.; GRANT, W. Survival of Halobacteria Within Fluid Inclusions in Salt Crystals. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 1365-1271, 1988.

OCHSENREITER, T.; SELEZI, D.; QUAISER, A.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, L.; SCHLEPER, C. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied

by 16S RNA surveys and real time PCR. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 787-797, 2003.

OREN, A.; ELEVI BARDAVID, R.; MANA, L. Perchlorate and halophilic prokaryotes: Implications for possible halophilic life on Mars. **Extremophiles**, v. 18, n. 1, p. 75-80, 2014.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, 1997.

PARKS, D. H.; BEIKO, R. G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, v. 26, n. 6, p. 715-721, 2010.

PEREIRA, I. A.; RAMOS, A. R.; GREIN, F.; MARQUES, M. C.; DA SILVA, S. M.; VENCESLAU, S. S. A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate reducing bacteria and archaea. **Frontiers on Microbiology**, v. 2, p. 88-109, 2011.

PESSI, I. S.; OSORIO-FORERO, C.; GALVEZ, E. J. C.; SIMOES, F. L.; SIMOES, J. C.; JUNCA, H.; MACEDO, A. J. Distinct composition signatures of archaeal and bacterial phylotypes in the Wanda Glacier forefield, Antarctic Peninsula. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 1, p. 1-10, 2015.

PEURA, S.; EILER, A.; BERTILSSON, S.; NYKÄNEN, H.; TIROLA, M.; JONES, R. I. Distinct and diverse anaerobic bacterial communities in boreal lakes dominated by candidate division OD1. **The ISME Journal**, v. 6, n. 9, p. 1640-1652, 2012.

PHADTARE, S. Recent developments in bacterial cold-shock response. **Current issues in molecular biology**, v. 6, n. 2, p. 125-136, 2004.

PRAKASH, O.; GREEN, S. J.; JASROTIA, P.; OVERHOLT, W. A.; CANION, A.; WATSON, D. B.; BROOKS, S. C.; KOSTKA, J. E. *Rhodanobacter denitrificans* sp. nov., isolated from nitrate-rich zones of a contaminated aquifer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 2457-2462, 2012.

PRESTON, C. M.; WU, K. Y.; MOLINSKI, T. F.; DELONG, E. F. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 13, p. 6241-6246, 1996.

PRIETO-BALLESTEROS, O.; KARGEL, J. S.; FAIRÉN, A. G.; FERNÁNDEZ-REMOLAR, D. C.; DOHM, J. M.; AMILS, R. Interglacial clathrate destabilization on Mars: Possible contributing source of its atmospheric methane. **Geology**, v. 34, n. 3, p.

149-152, 2006.

PROSSER, J. I.; NICOL, G. W. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 11, p. 2931-2941, 2008.

PRUESSE, E.; QUAST, C.; KNITTEL, K.; FUCHS, B.; LUDWIG, W. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 21, p. 7188-7196, 2007.

QINGLONG, S. Molecular progresses of marine Planctomycetes: A review. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 33, p. 6018-6023, 2011.

RAGUENES, G.; PIGNET, P.; GAUTHIER, G.; PERES, A.; CHRISTEN, R.; ROUGEAUX, H.; BARBIER, G.; GUEZENNEC, J. Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 67-73, 1996.

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 62, n. 2, p. 142-160, 2007.

RAMPELOTTO, P. H. Extremophiles and extreme environments. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 3, p. 482-485, 2013.

RASKIN, L.; STROMLEY, J. M.; RITTMANN, B. E.; STAHL, D. A. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 1232-1240, 1994.

ROTHSCHILD, L. J.; MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1092-1101, 2001.

SAKO, Y.; NOMURA, N.; UCHIDA, A.; ISHIDA, Y.; MORII, H.; KOGA, Y.; HOAKI, T.; MARUYAMA, T. *Aeropyrum pernix* gen. nov., sp. nov., a Novel Aerobic Hyperthermophilic Archaeon Growing at Temperatures up to 100°C. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 4, p. 1070-1077, 1996.

SALCHER, M. M.; NEUENSCHWANDER, S. M.; POSCH, T.; PERNTHALER, J. The ecology of pelagic freshwater methylotrophs assessed by a high-resolution monitoring and isolation campaign. **The ISME Journal**, v. 9, p. 2442-2453, 2015.

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

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing TreeClimber, a test to compare microbial community structures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2379-2384, 2006.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L. Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3219-3226, 2011.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n. 6, p. 863-864, 2011.

SCHWARTZMAN, D. W.; LINEWEAVER, C. H. The hyperthermophilic origin of life revisited. **Biochemical Society transactions**, v. 32, p. 168-171, 2004.

SHARP, C. E.; BRADY, A. L.; SHARP, G. H.; GRASBY, S. E.; STOTT, M. B.; DUNFIELD, P. F. Humboldt's spa: microbial diversity is controlled by temperature in geothermal environments. **The ISME journal**, v. 8, n. 6, p. 1166-1174, 2014.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135-1145, 2008.

SIMON, C.; WIEZER, A.; STRITTMATTER, A. W.; DANIEL, R. Phylogenetic diversity and metabolic potential encoded by a glacial ice metagenome. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7519-7526, 2009.

SINHA, N.; NEPAL, S.; KRAL, T.; KUMAR, P. Survivability and Growth Kinetics of Methanogenic Archaea at various pHs and Pressures: Implications for Deep Subsurface Life on Mars. **Planetary and Space Science**, 2016.

SMELLIE, J. L. Lithostratigraphy and volcanic evolution of deception island, South Shetland Islands. **Antarctic Science**, v. 13, n. 2, p. 188-209, 2001.

ŠMILAUER, P.; LEPSŠ, J. Multivariate analysis of ecological data using CANOCO 5. 2. Reino Unido, **Cambridge University Press**, 2014. 362 p.

SÖLLINGER, A.; SCHWAB, C.; WEINMAIER, T.; LOY, A.; TVEIT, A. T.; SCHLEPER, C.; URICH, T. Phylogenetic and genomic analysis of Methanomassiliicoccales in wetlands and animal intestinal tracts reveals clade-specific habitat preferences. **FEMS microbiology ecology**, v. 92, n. 1, p. 1-12, 2016.

SOO, R. M.; WOOD, S. A.; GRZYMSKI, J. J.; MCDONALD, I. R.; CARY, S. C. Microbial biodiversity of thermophilic communities in hot mineral soils of Tramway Ridge, Mount Erebus, Antarctica. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 715-728,

2009.

STAHL, D. A.; AMANN, R. Development and application of nucleic acid probes. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (ed.), **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York, John Wiley & Sons, 1991. p. 205-248.

STANLEY, S. O.; ROSE, A. H. Bacteria and yeasts from lakes on Deception Island. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 252, n. 777, p. 199-207, 1967.

STETTER, K. O. **Extremophiles and their adaptation to hot environments**. FEBS letters, v. 452, n. 1, p. 22-25, 1999.

_____. A brief history of the discovery of hyperthermophilic life. **Biochemical Society transactions**, v. 41, n. 1, p. 416-20, 2013.

STETTER, K. O.; KÖNIG, H.; STACKEBRANDT, E. Pyrodictium gen. nov., a New Genus of Submarine Disc-Shaped Sulphur Reducing Archaeobacteria Growing Optimally at 105°C. **Systematic and applied microbiology**, v. 4, n. 4, p. 535-551, 1983.

STIBAL, M.; HASAN, F.; WADHAM, J. L.; SHARP, M. J.; ANESIO, A. M. Prokaryotic diversity in sediments beneath two polar glaciers with contrasting organic carbon substrates. **Extremophiles**, v. 16, n. 2, p. 255-265, 2012.

STIBAL, M.; WADHAM, J. L.; LIS, G. P.; TELLING, J.; PANCOST, R. D.; DUBNICK, A.; SHARP, M. J.; LAWSON, E. C.; BUTLER, C. E. H.; HASAN, F.; TRANTER, M.; ANESIO, A. M. Methanogenic potential of Arctic and Antarctic subglacial environments with contrasting organic carbon sources. **Global Change Biology**, v. 18, n. 11, p. 3332-3345, 2012.

SUNAGAWA, S.; COELHO, L. P.; CHAFFRON, S.; KULTIMA, J. R.; LABADIE, K.; SALAZAR, G.; DJAHANSCHIRI, B.; ZELLER, G.; MENDE, D. R.; ALBERTI, A.; CORNEJO-CASTILLO, F. M.; COSTEA, P. I.; CRUAUD, C.; D'OVIDIO, F.; ENGELN, S.; FERRERA, I.; GASOL, J. M.; GUIDI, L.; HILDEBRAND, F.; KOKOSZKA, F.; LEPOIVRE, C.; LIMA-MENDEZ, G.; POULAIN, J.; POULOS, B. T.; ROYO-LLONCH, M.; SARMENTO, H.; VIEIRA-SILVA, S.; DIMIER, C.; PICHERAL, M.; SEARSON, S.; KANDELS-LEWIS, S.; BOWLER, C.; DE VARGAS, C.; GORSKY, G.; GRIMSLEY, N.; HINGAMP, P.; IUDICONE, D.; JAILLON, O.; NOT, F.; OGATA, H.; PESANT, S.; SPEICH, S.; STEMMANN, L.; SULLIVAN, M. B.; WEISSENBAACH, J.; WINCKER, P.; KARSENTI, E.; RAES, J.; ACINAS, S. G.; BORK, P.; BOSS, E.; FOLLOWS, M.; KARP-BOSS, L.; KRZIC, U.; REYNAUD, E. G.; SARDET, C.; SIERACKI, M.; VELAYOUDON, D. Structure and function of the global ocean microbiome. **Science**, v. 348, n. 6237, p. 1261359-1261359, 2015.

TAKAI, K.; KOMATSU, T.; INAGAKI, F.; HORIKOSHI, K. Distribution of Archaea in a Black Smoker Chimney Structure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3618-3629, 2001.

TAKAI, K.; SAKO, Y. A molecular view of archaeal diversity in marine and terrestrial hot water environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 28, n. 2, p. 177-188, 1999.

TAKAKI, Y.; SHIMAMURA, S.; NAKAGAWA, S.; FUKUHARA, Y.; HORIKAWA, H.; ANKAI, A.; HARADA, T.; HOSOYAMA, A.; OGUCHI, A.; FUKUI, S.; FUJITA, N.; TAKAMI, H.; TAKAI, K. Bacterial lifestyle in a deep-sea hydrothermal vent chimney revealed by the genome sequence of the thermophilic bacterium *Deferribacter desulfuricans* SSM1. **DNA Research**, v. 17, n. 3, p. 123-137, 2010.

TAMAKI, H.; TANAKA, Y.; MATSUZAWA, H.; MURAMATSU, M.; MENG, X. Y.; HANADA, S.; MORI, K.; KAMAGATA, Y. *Armatimonas rosea* gen. nov., sp. nov., of a novel bacterial phylum, *Armatimonadetes* phyl. nov., formally called the candidate phylum OP10. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 1442-1447, 2011.

TEAM, R. D. C.; R DEVELOPMENT CORE TEAM, R. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, v. 1, p. 409-409, 2005.

TEIXEIRA, L. C. R. S.; PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. **The ISME journal**, v. 4, n. 8, p. 989-1001, 2010.

THOMBRE, R. S.; OKE, R. S. Study of stress proteins induced by temperature stress in extremely halophilic archaea, *Haloferax mediterranei* RT18. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, p. 199-209, 2015.

TOURNA, M.; STIEGLMEIER, M.; SPANG, A.; KÖNNEKE, M.; SCHINTLMMEISTER, A.; URICH, T. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, n. 20, p. 8420-8425, 2011.

TRINGE, S. G.; VON MERING, C.; KOBAYASHI, A.; SALAMOV, A. A.; CHEN, K.; CHANG, H. W.; PODAR, M.; SHORT, J. M.; MATHUR, E. J.; DETTER, J. C.; BORK, P.; HUGENHOLTZ, P.; RUBIN, E. M. Comparative metagenomics of microbial communities. **Science**, v. 308, n. 5721, p. 554-557, 2005.

TYTGAT, B.; VERLEYEN, E.; SWEETLOVE, M.; D'HONDT, S.; CLERCX, P.; VAN RANST, E.; PEETERS, K.; ROBERTS, S.; NAMSARAEV, Z.; WILMOTTE, A.; VYVERMAN, W.; WILLEMS, A. Bacterial community composition in relation to bedrock type and macrobiota in soils from the Sør Rondane Mountains, East Antarctica.

FEMS Microbiology Ecology, v. 92, n. 9, p. 1-13, 2016.

VALENTINE, D. L. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 316-23, 2007.

VAN DIJK, E. L.; AUGER, H.; JASZCZYSZYN, Y.; THERMES, C. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 9, p. 418-426, 2014.

VAN TRAPPEN, S.; MERGAERT, J.; SWINGS, J. *Flavobacterium gelidilacus* sp. nov., isolated from microbial mats in Antarctic lakes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1241-1245, 2003.

VAN WOLFEREN, M.; AJON, M.; DRIESSEN, A. J. M.; ALBERS, S. V. How hyperthermophiles adapt to change their lives: DNA exchange in extreme conditions. **Extremophiles**, v. 17, n. 4, p. 545-563, 2013.

VARIN, T.; LOVEJOY, C.; JUNGBLUT, A. D.; VINCENT, W. F.; CORBEIL, J. Metagenomic profiling of Arctic microbial mat communities as nutrient scavenging and recycling systems. **Limnology and Oceanography**, v. 55, n. 5, p. 1901-1911, 2010.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.

VETTONE, A.; PERUGINO, G.; ROSSI, M.; VALENTI, A.; CIARAMELLA, M. Genome stability: recent insights in the topoisomerase reverse gyrase and thermophilic DNA alkyltransferase. **Extremophiles**, v. 18, n. 5, p. 895-904, 2014.

VICKERS, C. **Investigating the Physiological and Metabolic Requirements of the Tramway Ridge Microbial Community, Mt Erebus, Antarctica**. 2012. (Tese de Doutorado). University of Waikato, Hamilton, New Zealand.

VIDYALAKSHMI, R.; SRIDAR, R. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SULPHUR OXIDIZING BACTERIA. **Journal of Culture Collections**, v. 5, p. 73-77, 2007.

WALKER, C. B.; DE LA TORRE, J. R.; KLOTZ, M. G.; URAKAWA, H.; PINEL, N.; ARP, D. J.; BROCHIER-ARMANET, C.; CHAIN, P. S. G.; CHAN, P. P.; GOLLABGIR, A.; HEMP, J.; HÜGLER, M.; KARR, E. A.; KÖNNEKE, M.; SHIN, M.; LAWTON, T. J.; LOWE, T.; MARTENS-HABBENA, W.; SAYAVEDRA-SOTO, L. A.; LANG, D.; SIEVERT, S. M.; ROSENZWEIG, A. C.; MANNING, G.; STAHL, D. A. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 19, p. 8818-8823,

2010.

WANG, J.; MUYZER, G.; BODELIER, P. L. E.; LAANBROEK, H. J. Diversity of iron oxidizers in wetland soils revealed by novel 16S rRNA primers targeting Gallionella-related bacteria. **The ISME Journal**, v. 3, n. 6, p. 715-725, 2009.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.

WANG, S.; HOU, W.; DONG, H.; JIANG, H.; HUANG, L.; WU, G.; ZHANG, C.; SONG, Z.; ZHANG, Y.; REN, H.; ZHANG, J.; ZHANG, L. Control of Temperature on Microbial Community Structure in Hot Springs of the Tibetan Plateau. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e62901, 2013.

WARD, D. M.; CASTENHOLZ, R. W.; MILLER, S. R. Cyanobacteria in geothermal habitats. In: WHITTON, B.A., POTTS, M. (Eds). **The ecology of Cyanobacteria**. Netherlands, Springer, 2000. p. 37-59.

WEBSTER, G.; O'SULLIVAN, L. A.; MENG, Y.; WILLIAMS, A. S.; SASS, A. M.; WATKINS, A. J.; PARKES, R. J.; WEIGHTMAN, A. J. Archaeal community diversity and abundance changes along a natural salinity gradient in estuarine sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 2, p. 1-18, 2015.

WEI, S. T.; FERNANDEZ-MARTINEZ, M. A.; CHAN, Y.; VAN NOSTRAND, J. D.; DE LOS RIOS-MURILLO, A.; CHIU, J. M.; GANESHRAM, A.; CARY, C.; ZHOU, J.; POINTING, S. B. Diverse metabolic and stress-tolerance pathways in chasmoendolithic and soil communities of Miers Valley, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. **Polar Biology**, v. 38, n. 4, p. 433-443, 2015.

WERNER, J. J.; ZHOU, D.; CAPORASO, J. G.; KNIGHT, R.; ANGENENT, L. T. Comparison of Illumina paired-end and single-direction sequencing for microbial 16S rRNA gene amplicon surveys. **The ISME Journal**, v. 6, n. 10, p. 1273-1276, 2011.

WILLIAMS, T. J.; ALLEN, M. A.; DEMAERE, M. Z.; KYRPIDES, N. C.; TRINGE, S. G.; WOYKE, T.; CAVICCHIOLI, R. Microbial ecology of an Antarctic hypersaline lake: genomic assessment of ecophysiology among dominant haloarchaea. **The ISME journal**, v. 8, n. 8, p. 1645-1658, 2014.

WINSLEY, T. J.; SNAPE, I.; MCKINLAY, J.; STARK, J.; VAN DORST, J. M.; JI, M.; FERRARI, B. C.; SICILIANO, S. D. The ecological controls on the prevalence of candidate division TM7 in polar regions. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 345, 2014.

WYNN-WILLIAMS, D. D. Antarctic microbial diversity: the basis of polar ecosystem

processes. **Biodiversity and Conservation**, v. 5, p. 1271-1293, 1996.

YANG, S. J.; CHO, J. C. *Gaetbulibacter marinus* sp. nov., isolated from coastal seawater, and emended description of the genus *Gaetbulibacter*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 315-318, 2008.

YI, H.; OH, H. M.; LEE, J. H.; KIM, S. J.; CHUN, J. *Flavobacterium antarcticum* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium isolated from the Antarctic. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 637-641, 2005.

ZENG, Y. X.; YU, Y.; QIAO, Z. Y.; JIN, H. Y.; LI, H. R. Diversity of bacterioplankton in coastal seawaters of Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 2, p. 137-147, 2014.

ZHANG, J.; KOBERT, K.; FLOURI, T.; STAMATAKIS, A. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. **Bioinformatics**, v. 30, n. 5, p. 614-620, 2014.