DIEGO ARMANDO CASTILLO FRANCO

**ESTUDO DA DIVERSIDADE MOLECULAR DE BACTÉRIAS E
ARQUEIAS E ENRIQUECIMENTO DE COMUNIDADES
METANOGÊNICAS EM SEDIMENTOS MARINHOS ANTÁRTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia da USP / Instituto Butantã /
IPT, para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

São Paulo
2014

DIEGO ARMANDO CASTILLO FRANCO

**ESTUDO DA DIVERSIDADE MOLECULAR DE BACTÉRIAS E
ARQUEIAS E ENRIQUECIMENTO DE COMUNIDADES
METANOGÊNICAS EM SEDIMENTOS MARINHOS ANTÁRTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia da USP / Instituto Butantã /
IPT, para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Vivian Helena Pellizari

Versão original

São Paulo
2014

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

© reprodução total

Franco, Diego Armando Castillo.

Estudo da diversidade molecular de bactérias e arqueias e enriquecimento de comunidades metanogênicas em sedimentos marinhos antárticos / Diego Armando Castillo Franco. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Ecologia microbiana.

Versão do título para o inglês: Study of bacterial and archaeal molecular diversity and enrichment of methanogenic communities in Antarctic marine sediments.

1. Antártica 2. Diversidade microbiana 3. Sedimentos marinho 4. Metanogênese I. Pellizari, Profa. Dra. Vivian Helena II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós- Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB081/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Diego Armando Castillo Franco.

Título da Dissertação: Estudo da diversidade molecular de bactérias e arqueias e enriquecimento de comunidades metanogênicas em sedimentos marinhos antárticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

*A minha mãe **Clara**:
Por acreditar sempre em mim e
nunca deixar de torcer pelo nosso sucesso*

AGRADECIMENTOS

Ao BRASIL e ao povo brasileiro por ter me acolhido e por ter me ensinado tantas coisas novas.

À Dra. Vivian Helena Pellizari pelas inúmeras oportunidades, pela torcida e pela amizade em todos esses anos.

Ao Dr. Rubens Tadeu Duarte, *Sensei*, pelos ensinamentos desde o primeiro dia no laboratório, pela amizade.

À Rosa Gamba, *Mãe Brasileira*, pelas palavras, conselhos, dicas, piadas, por acreditar e confiar em mim,

Ao Dr. André Rosch Rodrigues pela ajuda constante ao longo do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia de Microrganismos pela ajuda no dia a dia, convivência, pelo sufoco na hora dos relatórios, pelos momentos inesquecíveis.

Ao pessoal do Instituto Oceanográfico, pela alegria e os excelentes momentos ao longo desses anos.

À CAPES pela bolsa durante o mestrado, ao CNPq pelos auxílios, ao MCT/MMA/SECIRM pelo apoio e suporte à pesquisa antártica Brasileira.

À minha família e amigos por ser sempre essa força invisível que ajuda nos momentos de fraqueza e alimentam a vida com essa alegria.

À Lina, pela longa caminhada, pelo amor e pela paciência

“Todo dura siempre un poco más de lo que debería”

Júlio Cortázar

RESUMO

FRANCO, D. C. **Estudo da diversidade molecular de bactérias e arqueias e enriquecimento de comunidades metanogênicas em sedimentos marinhos Antárticos**. 2014. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O sedimento marinho da Península Antártica representa uma área sensível a mudanças ambientais. No entanto, pouco se conhece sobre as comunidades microbianas que habitam esse ecossistema, incluindo a sua diversidade, distribuição e variações ao longo do tempo. O objetivo deste trabalho foi determinar a estrutura das comunidades microbianas nos sedimentos marinhos da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica, de modo a: 1) avaliar mudanças na comunidade microbiana em sedimentos coletados entre 2007 e 2012; 2) compreender as variações na diversidade microbiana ao longo de um gradiente de profundidade (de 100 m até 1100 m). Para complementar este objetivo, a produção biogênica de metano também foi avaliada. Métodos baseados no rRNA 16S (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante e pirosequenciamento) foram utilizados neste estudo, assim como técnicas anaeróbicas de cultivo. Os sedimentos marinhos da Baía do Almirantado apresentam uma predominância dos Filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes e Verrucomicrobia. Análise temporal revelou que comunidades microbianas em sedimentos próximos à estação antártica Comandante Ferraz são mais estáveis quando comparadas aos sedimentos em áreas de menor atividade antrópica. No gradiente de profundidade foi observado que a estrutura de comunidade não foi alterada, indicando que os microrganismos do sedimento marinho antártico suportam grandes variações de pressão hidrostática. Organismos heterotróficos dos gêneros *Psychrobacter*, *Psychromonas* e *Loktanella* foram os mais abundantes nos sedimentos marinhos, sugerindo uma alta concentração de matéria orgânica disponível no sedimento. Entretanto o enriquecimento de culturas metanogênicas foi realizado, produzindo entre 1,30 e 1,70 mmol de CH₄ após 120 dias de incubação. De uma maneira geral, este estudo sugere que as condições dos sedimentos marinhos antárticos favorecem os microrganismos psicrófilos de metabolismo heterotrófico.

Palavras-chave: Antártica. Diversidade Microbiana. Sedimentos Marinhos. Metanogênese.

ABSTRACT

FRANCO, D. C. **Study of bacterial and archaeal molecular diversity and enrichment of methanogenic communities in Antarctic marine sediments.** 2014. 115 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Marine sediment of the Antarctic Peninsula is a susceptible area to environmental changes. However, little is known about the microbial communities inhabiting this ecosystem, including its diversity, distribution and variations over time. The aim of this study was to determine the structure of microbial communities present in marine sediments of Admiralty Bay, King George Island, on the Antarctic Peninsula, in order to : 1) assess changes in the microbial community in sediments collected from 2007 to 2012; 2) understand the changes on microbial diversity through a depth gradient (100 m to 1100 m). In order to improve this approach, biogenic methane production was also evaluated. To this end, 16S rRNA based methods (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE, and Pyrosequencing) were used, as well as anaerobic cultivation techniques. Marine sediments from Admiralty Bay show a predominance of the Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes and Verrucomicrobia phyla. Temporal analysis revealed that microbial communities in sediment, near Antarctic station Comandante Ferraz, are more stable compared to that in the sediments in areas of lower human activity. No variation on the community structure was observed in depth gradient, indicating that the microorganisms of Antarctic marine sediment tolerate large variations of hydrostatic pressure. Heterotrophic organisms of the genera *Psychrobacter*, *Psychromonas* and *Loktanella* were the most abundant, suggesting a high concentration of organic matter in the sediment. However enrichment of methanogenic cultures was performed, yielding between 1.30 and 1.70 mmol of CH₄ after 120 days of incubation. Overall, this study suggests that conditions in Antarctic marine sediments favoring metabolism of heterotrophic and psychrophilic microorganisms.

Keywords: Antarctica. Microbial diversity. Marine sediments. Methanogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Três principais vias metanogênicas.	31
Figura 2 - Localização dos pontos coleta amostrados com pegador Van Veen nas enseadas MacKellar e Martel em três Operações Antárticas diferentes (OA XXVI, XXIX, XXX).	38
Figura 3 - Sequencia dos experimentos realizados com as amostras de sedimentos costeiros da Baía no Almirantado (Enseada Martel e MacKellar) em três verões austrais diferentes.	39
Figura 4 - Componentes do <i>Fusion Primers</i> usados na construção das bibliotecas de amplicons.	40
Figura 5 - Localização dos pontos de coleta amostrados com Box Corer na Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield.	43
Figura 6 - Sequência dos experimentos realizados com as amostras de sedimentos marinhos da Baía no Almirantado e Estreito de Bransfield.	45
Figura 8 - Sistema de distribuição simultânea de gases empregado para manipulação de microrganismos anaeróbios estritos.	47
Figura 9 - Dendrograma de distância dos perfis de bandas das amostras de sedimento marinho costeiro para o domínio Bactéria.	52
Figura 10 - Dendrograma de distância dos perfis de bandas das amostras de sedimento marinho costeiro para o domínio Archaea.	53
Figura 11 - Índices de riqueza Chao1 e Ace calculados para as amostras de sedimento marinho costeiro analisados sob um valor de <i>cutoff</i> 0,03.	57
Figura 12 - Índices de diversidade Shannon e Simpson calculados para as amostras de sedimento marinho costeiro analisados sob um valor de <i>cutoff</i> de 0,03.	57
Figura 13 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de sedimento marinho costeiro coletadas em 2007. Valor de <i>cutoff</i> utilizado 0,03.	59
Figura 14 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de sedimento marinho costeiro coletadas em 2010. Valor de <i>cutoff</i> utilizado 0,03.	60
Figura 15 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de sedimento marinho costeiro coletadas em 2012. Valor de <i>cutoff</i> utilizado 0,03.	61

Figura 16 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de sedimento marinho costeiro coletadas no Refúgio 2 em três verões austrais diferentes. Valor de <i>cutoff</i> utilizado 0,03.	62
Figura 17 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de sedimento marinho costeiro coletadas em Comandante Ferraz em três verões austrais diferentes. Valor de <i>cutoff</i> utilizado 0,03.	62
Figura 18 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de sedimento marinho costeiro coletadas em Ponta Ullman em três verões austrais diferentes. Valor de <i>cutoff</i> utilizado 0,03.	63
Figura 19 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de sedimento marinho costeiro coletadas em Botany Point em três verões austrais diferentes. Valor de <i>cutoff</i> utilizado 0,03.	63
Figura 20 - Dendrograma de similaridade entre as amostras de sedimento marinho costeiro das Enseadas Martel e MacKellar durante três verões antárticos. Método Bray-Curtis, algoritmo UPGMA	64
Figura 21 - Dendrograma de similaridade entre as amostras de sedimento marinho costeiro das Enseadas Martel e MacKellar durante três verões antárticos. Método Theta-YC, algoritmo UPGMA	65
Figura 22 - Abundância relativa dos filos e as classes de Proteobacteria para as amostras de sedimento marinho costeiro coletado em três verões austrais diferentes.	66
Figura 23 - Análise de Componentes Principais das comunidades microbianas dos sedimentos marinhos costeiros da Enseada Martel e MacKellar ao longo de três verões austrais no nível taxonômico Filo e classe para Proteobacteria.....	69
Figura 24 - Análise de Componentes Principais das comunidades microbianas dos sedimentos marinhos costeiros da Enseada Martel e MacKellar ao longo de três verões austrais no nível taxonômico gênero.....	70
Figura 25 - Dendrograma de distância dos perfis de bandas das amostras de sedimento das isóbatas para o domínio Bactéria.	73
Figura 26 - Dendrograma de distância dos perfis de bandas das amostras de sedimento das isóbatas para o domínio Archaea.	74
Figura 27 - Índices de riqueza Chao 1 e Ace calculados para as isóbatas analisados sob um valor de <i>cutoff</i> 0,03.....	77
Figura 28 - Índices de diversidade Shannon e Simpson calculados para as isóbatas analisados sob um valor de <i>cutoff</i> de 0,03	78

Figura 29 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as isóbatas de 100 m. Valor de <i>cutoff</i> utilizado 0,03	80
Figura 30 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as isóbatas de 300 m. Valor de <i>cutoff</i> utilizado 0,03	81
Figura 31 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as isóbatas de 500 m. Valor de <i>cutoff</i> utilizado 0,03	81
Figura 32 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as isóbatas de 700 m. Valor de <i>cutoff</i> utilizado 0,03	82
Figura 33 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as isóbatas de 1100 m. Valor de <i>cutoff</i> utilizado 0,03	82
Figura 34 - Dendrograma de similaridade entre as amostras das isóbatas da Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield. Método Bray-Curtis, algoritmo UPGMA.	84
Figura 35 - Dendrograma de similaridade entre as amostras das isóbatas da Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield. Método Theta-YC, algoritmo UPGMA ...	84
Figura 36 - Abundância relativa dos filos e as classes de Proteobacteria para as isóbatas.	90
Figura 37 - Abundância relativa dos filos menos abundantes das isóbatas.	91
Figura 38 - Análise de Componentes Principais correlacionando os gêneros encontrados com os parâmetros físico-químicos nas isóbatas da Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield.	92
Figura 39 - Produção de em cultivos de sedimento de todas as isóbatas em meio Methanogenium.....	93
Figura 40 - Produção de metano em cultivos de sedimento de todas as isóbatas em meio Marinho.....	94
Figura 41 - Microscopia de células metanogênicas autofluorescentes em meios de cultura diferentes. 1) Cultura da amostra 300 m em meio marinho apresentando morfologia de sarcinas. 2) 3) e 4). Culturas das amostras 300, 500 e 700 m em meio <i>Methanogenium</i>	95
Figura 42 - Microscopia de fluorescência de repiques das culturas obtidas a partir de sedimento da profundidade 300 m. 1) Morfologias observadas através de coloração live-dead 2) Bacilos metanogênicos autofluorescentes sob luz UV (aumento de 1000x).	96
Figura 43 - Gel de eletroforese de gradiente desnaturante (40%-60%) das culturas metanogênicas	97
Figura 44 - - Dendrograma de distância dos perfis das culturas metanogênicas. .	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Taxa de Bacteria encontrados em diversos estudos de ecologia microbiana de sedimentos marinhos	27
Tabela 2 - Descrição geral da malha amostral coletada com pegador Van Veen na Enseada Martel e MacKellar, Baía do Almirantado em diferentes Operações Antárticas.	38
Tabela 3- <i>Primers</i> utilizados na construção das bibliotecas de amplicons das amostras de sedimento costeiros da Baía do Almirantado (Enseada Martel e MacKellar) em três verões austrais diferentes.	41
Tabela 4 - Sequência de <i>primers</i> usados no DGGE.	42
Tabela 5 - Descrição geral da malha amostral coletada com Box Corer na Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield.	43
Tabela 6 - Primers utilizados na construção das bibliotecas de amplicons das amostras de sedimento das diferentes isóbatas ao longo da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield.	46
Tabela 7 - Composição do meio Methanogenium e do meio Marinho.	48
Tabela 8 - Composição da Solução Vitaminas e composição da solução traço de metais.....	48
Tabela 9 - Lista de amostras de sedimento marinho costeiro submetidas ao pirosequenciamento e número total de sequencias.	54
Tabela 10 - Número de OTUs únicas e índices de alfa-diversidade estimados para as sequências de sedimento marinho costeiro das enseadas MacKellar e Martel. Valor do <i>cutoff</i> 0,03.....	55
Tabela 11 - Lista das isóbatas submetidas ao pirosequenciamento e número total de sequencias	75
Tabela 12 - Número de OTU únicas e índices de alfa-diversidade estimados para as sequencias das isóbatas da Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield. Valor do <i>cutoff</i> 0,03.....	76
Tabela 13 - Índices de beta-diversidade calculados entre as isóbatas da Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield para um <i>cutoff</i> de 0,03.....	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Número de sequencias de sedimento marinho costeiro classificadas em cada filo a partir da ferramenta Classifier (RDP)	67
Quadro 2 Número de sequencias de sedimento marinho costeiro classificadas nos 50 gêneros mais abundantes, agrupadas segundo a ferramenta Classifier (RDP). <i>Cutoff</i> utilizado para gênero 0,03	71
Quadro 3 -. Número de sequencias das isóbatas classificadas em cada filo a partir da ferramenta Classifier (RDP)	87
Quadro 4 - Número de sequencias de sedimento marinho costeiro classificadas nos 50 gêneros mais abundantes, agrupadas segundo a ferramenta Classifier (RDP). <i>Cutoff</i> utilizado para gênero 0,03	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Adenosin Triphosphate (Adenosin Trifosfato)

BP: Botany Point

CF: Comandante Ferraz

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante)

DNA: Desoxirubonucleic Acid

m: metros

MBC: Mini Box Corer

mM: miliMolar

OAXXIX: Operação Antártica XXIX

OAXXVI: Operação Antártica XXVI

OAXXX: Operação Antártica XXX

OTU: Operational Taxonomic Unit (Unidade Taxonômica Operacional)

PCR: Polimerase chain reaction (Reação em cadeia da Polimerase)

PPi: Pirofosfato

PU: Ponta Ullman

R2: Refúgio 2

RDP: Ribossomal Data Project

TAE: Tris-Acetato-EDTA

UV: Ultra Violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVO	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 O Continente Antártico	21
3.1.1 Ilhas Shetland do Sul	22
3.1.2 Ilha Rei George	22
3.1.3 Baía do Almirantado.....	23
3.2 Microbiota nos Sedimentos Marinhos.....	24
3.3 Gás Metano e Arquéias Metanogênicas	30
3.4 Métodos independentes de cultivo	32
3.4.1 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE – <i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>)	33
3.4.2 Pirosequenciamento	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Coleta de Sedimento costeiro em diversos pontos da Enseada Martel e Enseada MacKellar ao longo três verões austrais diferentes.....	37
4.1.1 Desenho Experimental.....	39
4.1.2 Extração de DNA das amostras de sedimento marinho costeiro	39
4.1.3 Pirosequenciamento das amostras de sedimento das diferentes amostras de sedimentos costeiros da Baía no Almirantado (Enseada Martel e MacKellar) em três verões austrais diferentes	40
4.1.3.1 Construção da biblioteca de amplicons do gene 16S rRNA para pirosequenciamento.....	40
4.1.4 Amplificação do gene 16S rRNA do sedimento marinho costeiro para DGGE	41
4.2 Coleta de Sedimento das diferentes isóbatas ao longo da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield (Operação Antártica XXVII).....	42
4.2.1 Desenho experimental	44

4.2.2 Pirosequenciamento das amostras de sedimento das diferentes isóbatas ao longo da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield (Operação Antártica XXVII)	45
4.2.2.1 Construção da biblioteca de amplicons do gene rRNA 16S para pirosequenciamento	45
4.2.2.2 Análise dos dados	46
4.3.1 Cultivo para enriquecimento de Arquéias metanogênicas presentes nos sedimentos marinhos da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield	47
4.3.2 Análise molecular das amostras de sedimento e culturas de enriquecimento	49
4.3.2.1 Extração de DNA das culturas enriquecidas	49
4.3.2.1 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Diversidade microbiana em sedimento marinho costeiro nas enseadas Martel e MacKellar	52
5.1.1 Caracterização da estrutura de comunidade de Bactéria dos sedimentos marinhos costeiros através da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)	52
5.1.2 Caracterização da estrutura de comunidade de Arquéia dos sedimentos marinhos costeiros através da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)	53
5.1.3 Análise da estrutura microbiana dos sedimentos marinhos costeiros das enseadas MacKellar e Martel através da técnica de pirosequenciamento	54
5.1.3.1 Estimativa de riqueza e abundância das amostras de sedimento marinho costeiro das enseadas MacKellar e Martel	55
5.1.3.3 Composição dos membros da comunidade microbiana das amostras de sedimento marinho costeiro obtidas por pirosequenciamento	65
5.2 Diversidade microbiana em sedimentos marinhos da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield	73
5.2.1 Caracterização da estrutura de comunidade de Bactéria das isóbatas através da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)	73
5.2.2 Caracterização da estrutura de comunidade de Arquéia das isóbatas através da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)	73
5.2.3 Análise da estrutura microbiana das isóbatas ao longo da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield através da técnica de pirosequenciamento	74

<i>5.2.3.1 Estimativa de riqueza e abundância das isóbatas ao longo da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield</i>	<i>76</i>
<i>5.2.3.2 Comparação da estrutura de comunidade das isóbatas ao longo da Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield através de métodos baseados em OTU.....</i>	<i>78</i>
<i>5.2.3.3 Composição dos membros da comunidade microbiana das isóbatas obtidas por pirosequenciamento</i>	<i>85</i>
5.3 Cultivo para enriquecimento de Arquéias metanogênicas presentes nos sedimentos marinhos da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield.....	93
<i>5.3.1 Caracterização da estrutura de comunidade de Arquéias metanogênicas enriquecidas através da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)</i>	<i>96</i>
6 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS.....	101
ANEXOS	114
ANEXO A	114
ANEXO B	115

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios da área de ecologia microbiana tem sido o estudo da diversidade e da distribuição de comunidades microbianas naturais em sedimentos marinhos. Os microrganismos nesses ecossistemas possuem um papel fundamental reciclando macro e micronutrientes e fornecendo biomassa e energia para as cadeias tróficas, atuando como patógenos ou simbioses de outros organismos e influenciando os ciclos biogeoquímicos e a disponibilidade de oxigênio, dióxido de carbono, metano, entre outros gases.

A utilização de técnicas tradicionais de cultivo, como o enriquecimento, permitem a caracterização e o estudo dos microrganismos presentes nesses ambientes, mas possuem a limitação das próprias condições experimentais, como a seletividade do meio e a determinação de parâmetros como temperatura e salinidade, que levam a uma resposta da microbiota nem sempre condizente com os processos microbianos tais como ocorrem na natureza. Por outro lado, as técnicas moleculares, como a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e sequenciamento do gene RNAr 16S, permitem analisar a diversidade microbiana em amostras ambientais, sem a necessidade de submetê-las à etapa de cultivo, mas muitas informações sobre a ecologia e fisiologia das sequências encontradas não podem ser obtidas. Recentemente, as técnicas de sequenciamento de nova geração aumentaram o volume de sequências obtidas, possibilitando avanços no entendimento na ecologia de ambientes antes desconhecidos. Dessa forma, a estratégia de estudo das comunidades microbianas em amostras ambientais envolvem uma caracterização molecular das amostras e as técnicas de cultivo tradicionais, com o objetivo de determinar a estrutura e diversidade microbiana nesses ecossistemas.

No caso dos ambientes antárticos, a informação existente sobre a microbiota dos sedimentos marinhos ainda é bastante escassa. Bowman et al., (2003) analisaram as comunidades bacterianas na região leste de Antártica e observaram metabolismo psicofílico ativo das comunidades microbianas principalmente nas faixas de sedimento de 1 a 4cm. Os sedimentos marinhos antárticos estão sujeitos a grandes variações ambientais, principalmente de temperatura, concentração de nutrientes, alta incidência

de luz ultravioleta e condições meteorológicas. Nos últimos 30 anos, o aquecimento da porção noroeste da Península Antártica, resultou na diminuição da extensão da cobertura de gelo e consequentemente o derretimento das geleiras continentais. Esses processos de degelo são responsáveis pelo aumento na concentração de nutrientes e da turbidez da coluna d'água. (MONTES-HUGO et al., 2009)

As regiões costeiras da Península Antártica estão sujeitas à influência antrópica, através da presença das estações de pesquisa, como a Estação Antártica Comandante Ferraz, provocando variações ambientais no local (RIBEIRO et al., 2011) o que pode influenciar perfis obtidos para a estrutura de comunidade microbiana.

O objetivo deste projeto é estudar a estrutura das comunidades microbianas nos diferentes sedimentos marinhos ao longo da Baía do Almirantado, sendo avaliados: a) Distribuição espaço-temporal da microbiota nos sedimentos marinhos costeiros; b) Caracterização das comunidades microbianas ao longo de um gradiente de profundidade; c) Enriquecimento de arqueias metanogênicas.

O trabalho foi desenvolvido dentro dos projetos MABIREH: “Vida Marinha Antártica: Biodiversidade em Relação à Heterogeneidade Ambiental na Baía do Almirantado, Ilha Rei George e áreas adjacentes” e do INCT – APA (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Antártico de Pesquisas Ambientais)

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi estudar a comunidade microbiana presente nos sedimentos marinhos da Baía do Almirantado, na Ilha Rei George.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a distribuição espacial e temporal das comunidades microbianas presentes em sedimentos marinhos costeiros das Enseadas MacKellar e Martel;
- avaliar a diversidade microbiana ao longo de um gradiente de profundidade na Baía do Almirantado e no Estreito de Bransfield;
- enriquecer comunidades metanogênicas presentes em sedimentos marinhos usando técnicas dependentes de cultivo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Continente Antártico

O continente Antártico possui a maior camada de gelo do mundo, cobrindo cerca de 90% do continente. Essa camada possui uma espessura média de 2700 m. Essa quantidade de gelo faz com que a Antártica seja o maior reservatório de água doce do planeta e seu sorvedouro de calor. O gelo não cobre só territórios continentais, também as águas circundantes, sendo que no inverno, a área total do continente chega a cerca de 22 milhões de quilômetros quadrados (BRASIL, 2012).

A Antártica é um habitat “extremo”. Apesar da grande quantidade de água, é considerado o continente mais seco, pois as baixas temperaturas não permitem a evaporação. Possui também uma alta incidência de radiações ultravioleta, escassez de nutrientes e longos períodos de ausência de luz. O clima da Antártica é caracterizado por temperaturas extremamente baixas nas altitudes centrais; na Estação Russa de "Vostok", situada a 1240 km do polo sul geográfico, foi registrada a temperatura mínima de -89°C (BRASIL, 2012).

Nas altitudes mais baixas, próximo ao litoral e com a influência das águas, a temperatura média anual é de -10°C . Fortes e frequentes ventos, com intensidade de até 51,4 m/s afetam as condições climáticas e, no conjunto, contribuem para a rarefação da vida natural terrestre, além de fazer aumentar a sensação de frio. A maior velocidade registrada dos ventos foi de 327 quilômetros por hora, em Dumont d’Urville, em julho de 1972 (BRASIL, 2012; VINCENT, 2000).

Ao longo dos últimos trinta anos, importantes observações científicas foram feitas na Antártica, especialmente na península Antártica, local de atuação deste trabalho. Algumas delas, tais como a redução da camada protetora de ozônio da atmosfera, o aumento da concentração dos gases-estufa e a desintegração parcial do gelo evidenciaram a sensibilidade daquele continente às mudanças climáticas globais. Hoje, compreende-se que a região polar austral é uma das partes mais importantes dos processos que afetam o sistema terrestre, em especial a América do Sul e o território brasileiro. A formação das friagens originadas na região Antártica, por exemplo, afetam

o clima e consequentemente as culturas agrícolas em todo o território Brasileiro. Além disso, a circulação atmosférica e as massas de água geradas no oceano austral podem influir diretamente na produção de nutrientes e energia na zona econômica exclusiva brasileira, especialmente nas regiões sul e sudeste (INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA-CRIOSFERA, 2013).

3.1.1 Ilhas Shetland do Sul

O arquipélago das ilhas Shetland do Sul possui 62 ilhas localizadas ao largo da Península Antártica, região ocidental do continente Antártico, em uma zona de transição entre o clima antártico e subantártico.

A plataforma continental em torno do arquipélago alcança profundidades de até 1200 m, estendendo-se tanto para o norte (interior da Passagem de Drake) quanto para o sul (Estreito de Bransfield). O litoral destas ilhas é profundamente recortado, apresentando muitas passagens e baías, principalmente no lado do Estreito de Bransfield (RAKUSA-SUSZCZEWSKI, 1995).

3.1.2 Ilha Rei George

A ilha Rei George é a maior ilha do arquipélago e está localizada ao centro do Arquipélago das Ilhas Shetland do Sul e apresenta características oceanográficas predominantemente Antárticas (RAKUSA-SUSZCZEWSKI, 1995).

Também chamada de Ostrow Waterloo ou Isla 25 de Mayo, possui uma área de 1310 km² aproximadamente e cerca de 95% coberta de glaciais. Registros meteorológicos indicam um rápido aumento na temperatura atmosférica local, ao longo dos últimos 50 anos (quatro vezes maior do que a média mundial).

A linha de costa é fortemente heterogênea, especialmente na região sul da ilha, onde as baías (Baía Vênus, Destruction, Rei George, Almirantado e Maxwell) foram formadas como consequência de predisposição tectônica e atividade glacial (KEJNA, 1999).

3.1.3 Baía do Almirantado

A Baía do Almirantado é a maior baía da ilha Rei George e cobre uma área de 122,1 km², com volume total estimado em 24,1km³, profundidade média de 201,7 m e linha de costa de 83,4 km (ROBAKIEWICZ; RAKUSA-SUSZCZEWSKI, 1999).

A temperatura e a salinidade das águas da baía são relativamente uniformes espacial e batimetricamente, o que permite intensa mistura vertical (LIPSKI, 1987, SZANFRANSKI; LIPSKI, 1982).

Possui padrões de maré irregulares e semi-diurnos e os movimentos das ondas tem influência eólica. O clima é influenciado principalmente pelos ciclones que se deslocam na direção oeste-leste. A média da temperatura do ar nas últimas décadas aumentou de 0,2 para 0,6 °C, provocando uma retração das geleiras ao redor da costa da baía (JAZDZEWSKI et al., 1986).

A temperatura da água varia anualmente de -2,0 a 3,4 °C. A salinidade do corpo de água da baía fica em torno de 34 na superfície (até os 25 m de profundidade) e 34,5 aos 500 m metros de profundidade (PRUSZAK, 1980).

A baía apresenta um canal principal em forma de U semelhante a um fiorde, com profundidade superior à 500 m voltado para o Estreito de Bransfield, por onde ocorrem trocas de água que influenciam fortemente as condições hidrográficas de toda a baía (RODRIGUES, 2008). A baía ainda é caracterizada pela presença de três grandes enseadas com profundidades entre 100 m e 300 m, Martel e MacKellar ao norte e Ezcurra, a mais estreita das três, voltada para o lado oeste (BATTKE, 1990).

As áreas internas da baía possuem papel especial no fluxo de energia e na circulação de matéria, devido à grande concentração de organismos em toda a cadeia trófica do ecossistema. A presença de geleiras contribui com a dinâmica sazonal e suas mudanças, em longo prazo, nas zonas marginais, tem importante influência nas condições hidrológicas da baía e no desenvolvimento das comunidades marinhas e terrestres da área costeira (RAKUSA-SUSZCZEWSKI, 1980).

A linha de costa é diversificada, onde na parte oeste da baía ocorrem praias rochosas e com grânulos, enquanto na parte leste e norte ocorrem praias glaciais

(RAKUSA-SUSZCZEWSKI, 1980). Menos da metade da costa da baía é ocupada por estas geleiras que vem se retirando nas últimas décadas (BRAUN; GOSSMAN, 2002).

A circulação é caracterizada pela entrada de um grande volume de água do Estreito de Bransfield na região central através da grande abertura localizada ao sul da Baía. A entrada de águas menos salinas se dá através do escoamento de águas originadas do degelo continental, gerando uma contracorrente de grande velocidade que separa os corpos de água da zona costeira e da zona central (ABSHER et al., 2003).

O regime de ventos pode influenciar a produção primária, uma vez que ocasiona pequenas ressurgências costeiras que reduzem a estabilidade da coluna de água e causam perturbação e posterior ressuspensão dos sedimentos (BRANDINI; REBELLO, 1994).

3.2 Microbiota nos Sedimentos Marinhos

Os sedimentos são camadas de partículas minerais e orgânicas, geralmente com fina granulometria, formado por intemperismo, erosão de rochas, solos minerais e orgânicos transportadas pela água, ar ou gelo, que se encontram em contato com a parte inferior dos corpos de água (SEDNET, 2013). A composição da matéria particulada nos sedimentos depende da origem do material depositado, que pode ser de origem biogênico (biomassa microbiana, conchas de diatomáceas, etc.), autigênico (minerais e compostos inorgânicos presentes nos corpos de água) e detritico (constituído por material terrígeno, vulcânico e cosmogênico). Sedimentos marinhos cobrem aproximadamente 70% da superfície total da Terra e ademais é considerado o maior ecossistema contínuo da superfície do planeta, embora seja um dos menos conhecidos. A profundidade média dos sedimentos é por volta de 500 m, mas pode ser de até 10 km com uma coluna d'água subjacente de 3800 m aproximadamente. (SEIBOLD et al., 1982).

As comunidades bentônicas dependem principalmente da entrada de matéria orgânica proveniente da coluna d'água e das zonas fóticas. Entretanto, cerca de 95% da matéria orgânica produzida fotossinteticamente nas águas superficiais é reciclada nos primeiros 100 a 300 m e apenas 1% alcança o sedimento em grandes profundidades (KATO; HORIKOSHI, 1999).

Por isso, de uma maneira geral, o fundo oceânico é um ambiente essencialmente oligotrófico, frio, escuro e submetido a altas pressões e, até recentemente, considerava-se que esses atributos eram os únicos existentes. Atualmente sabemos que as águas marinhas, os exsudados e especialmente as fontes hidrotermais também contribuem significativamente para a variedade existente de ambientes de mar profundo. Assim, as atividades metabólicas dos microrganismos nos sedimentos dependem da disponibilidade de doadores de elétrons (compostos oxidáveis) e aceptores de elétrons (compostos reduzíveis) (ORCUTT et al., 2011; YAYANOS, 1995).

Os microrganismos não só dominam os sedimentos em termos de abundância e biomassa, também têm um papel chave nos ciclos biogeoquímicos globais devido à capacidade rápida de degradação da matéria orgânica particulada e como componentes importantes na estrutura da cadeia alimentar (BOWMAN et al., 2003; D'HONDT et al., 2002; FRY et al., 2008 ; GOODAY; TURLEY, 1990; KOSTKA et al., 1999; RYSGAARD et al., 1999).

Pesquisas têm demonstrado que a fração de microrganismos na biosfera bêntica pode constituir entre um décimo e um terço da biomassa total da terra e cerca de 70% da biomassa procarionte total (PARKES et al., 1994; WHITMAN et al., 1998).

As populações microbianas são geralmente mais abundantes e mais diversas em ambientes de águas rasas, cuja produtividade é maior e nos quais a quantidade de carbono orgânico do sedimento é alta (NEWBERRY et al., 2004). A abundância de células microbianas em sedimentos marinhos é correlacionada com as taxas de sedimentação e a distância da costa. A densidade celular nos sedimentos superficiais aumenta em direção às margens continentais e declinam em direção ao mar aberto (KALLMEYER et al., 2012).

O entendimento da diversidade, distribuição e atividade das comunidades microbianas nos sedimentos marinhos é por tanto um passo essencial para entender o funcionamento do ecossistema bêntico e sua influência sobre os ciclos biogeoquímicos globais (DEMING; BAROSS, 1993).

Nos últimos anos, vários estudos moleculares foram realizados para descrever a diversidade microbiana empregando técnicas de sequenciamento de nova geração, obtendo dados que permitem fazer análises filogenéticas e funcionais dos processos

biogeoquímicos. Os taxa mais relatados como dominantes nos sedimentos marinhos são *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Acidobacteria*, e *Actinobacteria*. No entanto, algumas diferenças podem ser observadas nos taxa e na abundancia relativa entre as diferentes regiões oceânicas (Tabela 1).

A alta prevalência do filo Proteobacteria, especificamente a classe *Gammaproteobacteria*, já foi observada em diversos estudos. Este filo apresenta uma ampla diversidade fenotípica e filogenética, o que poderia explicar a colonização de diversos nichos (DANOVARO et al., 2010; LYRA et al., 2013; SOGIN et al., 2006; WILLIAMS et al., 2010; ZINGER et al., 2013).

A classe *Deltaproteobacteria* agrupa as bactérias do ciclo do enxofre. São encontradas regularmente em sedimentos com características anôxicas e possuem metabolismos anaeróbicos, sendo capazes de reduzir o sulfato. Esse grupo já foi descrito em diversos trabalhos como parte ativa em relações sintróficas com arqueias metanogênicas em sedimentos com emissões de metano (BOWMAN; McCUAIG, 2003; HAMDAN et al., 2012; NUNOURA et al., 2012; ORPHAN et al., 2001).

Nos ambientes pelágicos e nos sedimentos superficiais com maior disponibilidade de oxigênio, a classe *Alphaproteobacteria* é mais abundante. Já foram descritos organismos quimioorganotróficos, capazes de oxidar amônio, monóxido de carbono, ferro e manganês. Os grupos mais abundantes em ambientes marinhos são *Rhodobacter* e *Rizobiales* (KONNEKE et al., 2005; MORAN; MILLER, 2007; ORCUTT et al., 2011; SOGIN et al., 2006).

Tabela 1 - Taxa de Bactéria¹ encontrados em diversos estudos de ecologia microbiana de sedimentos marinhos

Local	Método	Taxa mais comum	Referencia
Antártica	Biblioteca do gene 16S RNAr	Gamma-, Delta, Flavobacteria, Planctomyces	(Bowman, 2003)
Ártico	Biblioteca do gene 16S RNAr	Delta-, Gamma-, Alpha-, Cytophaga, Flavobacteria	(Ravenschlag et al., 1999)
Ártico	Biblioteca do gene 16S RNAr	Gamma-, Alpha-, Delta-, Beta-	(Tian et al., 2009)
Atlântico Sul	Biblioteca do gene 16S RNAr	Gamma-, Delta-, Alpha-, Planctomyces, Acidobacteria	(Schauer et al, 2010)
<i>East Pacific Rise</i>	Sequências 16SV3 de DNAr/DGGE	Chloroflexi, Gamma-, Actinobacteria	(Li et al., 2008)
Leste mediterraneo	Biblioteca do gene 16S RNAr	Chloroflexi, Alpha-, Delta-, Acido-	(Heijs et al., 2008)
Leste mediterraneo	Biblioteca do gene 16S RNAr	Acidobacteria, Gamma-, Actinobacteria	(Kouridaki et al 2010)
Leste mediterraneo (Mar de Marmara)	Pirosequenciamento 454	Planctomycetes, Delta -, Gamma, Acidobacteria	(Quaiser el al., 2011)
Oceano Ártico-Pacífico	Biblioteca do gene 16S RNAr	Gamma-, Beta-, Alpha-, Delta-	(Li et al., 2009)
Pacífico	Biblioteca do gene 16S RNAr	Gamma-, Cytophaga, Delta-, Alpha-	(Li et al., 1999)
Pacífico (Sagami Bay, Japão)	Biblioteca do gene 16S RNAr	Gamma-, Delta-, Epsilon-, Verrucomicrobia	(Urakawa et al, 1999)
Pacífico leste	Biblioteca do gene 16S RNAr	Gamma-, Alpha-, Delta-, Choloroflexi	(Dang et al., 2009)
Pacífico Norte	Biblioteca do gene 16S RNAr	Gamma -, Delta-, Actinobacteria	(Kouridaki et al 2010)
Pacifico Sul	Pirosequenciamento 454	Gamma-, Delta-, Alpha-, Acidobacteria	(Sun et al, 2013)

As arqueias são um grupo único de microrganismos, com propriedades metabólicas específicas e filogenia particular. A criação do domínio *Archaea* baseou-se em 20 sequências de rRNA 16S obtidas de organismos cultivados (ROBERTSON et al., 2005). As primeiras arqueias foram relatadas em artigos científicos há cerca de 130 anos e por

¹ Classes de Proteobacteria I *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* são abreviados como Alpha-, Beta-, Delta-, Epsilon- e Gamma-

um longo tempo foram chamadas de arqueobactérias por serem consideradas habitantes da Terra primitiva (CAVICCHIOLI, 2010). A razão disso é que são frequentemente encontrados em locais extremos (do ponto de vista antropogênico) à vida, como ambientes de alta salinidade, elevada pressão, alta ou baixa temperatura e baixo pH (KLENK et al., 2007).

As arqueias foram inicialmente consideradas habitantes apenas de regiões inóspitas, mas com a ajuda de técnicas moleculares independentes de cultivo, muitas envolvendo a amplificação de genes rRNA 16S diretamente de amostras ambientais, foi demonstrado que as arqueias não estão confinadas estritamente em ambientes extremos (KLENK et al., 2007), mas espalhadas por diversos ambientes como sedimentos de rios (ARAÚJO, 2010), estuários contaminados (SAIA et al., 2010), solos (OCHSENREITER et al., 2003) e oceanos (WUCHTER et al., 2006).

A maioria das arqueias cultivadas estão agrupadas em dois filos principais: *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*, definidos originalmente por Woese e colaboradores (1990). No entanto, o surgimento e a expansão dos estudos em ecologia molecular, principalmente baseada em sequências de rRNA 16S, levaram à descoberta de muitas linhagens ainda não cultivadas. (Figura 1).

Euryarchaeota inclui oito classes taxonômicas (*Methanopyri*, *Methanococci*, *Methanobacteria*, *Methanomicrobia*, *Archaeoglobi*, *Halobacteria*, *Thermococci*, e *Thermoplasmata*) as quais incluem metanogênicas, arqueias oxidadores do metano, denitrificadoras, redutoras de sulfato, oxidadores do ferro e organotróficas (JURGENS; JONUSCHEIT, 2005; KLETZIN, 2007; SCHLEPER; TESKE; SØRENSEN, 2008).

A arqueia termofílica *Nanoarchaeum equitans* encontrada em relação parasítica com outra arqueia, *Ignococcus*, foi proposta inicialmente como representante de um novo filo teve sua filogenia revista quando genes codificadores de proteínas ribossomais foram empregados para análise filogenética do domínio *Archaea*, sendo agrupada no filo *Euryarchaeota* (BROCHIER et al., 2005; HUBER et al., 2002)

Baseados em dados genômicos, diferentes filos de *Archaea* têm sido propostos, incluindo *Korarchaeota*, *Aigarchaeota* e *Geoarchaeota*. A filiação de diversas linhagens recentemente descobertas como *Miscellaneous Crenarchaeotal Group* (MCG), *Deep Sea Archaeal Group* (DSAG) e *Ancient Archaeal Group* (AAG) ainda não está esclarecida.

Membros desses filios têm sido encontrados em ambientes terrestres, marinhos, no entanto, ainda não foram descritos em ambientes considerados “extremos” como fontes hidrotermais e mar profundo, assim como ainda não foram cultivados em laboratório (BARNES et al., 1996; ELKINS et al., 2008; GUY; ETTEMA, 2011; KOBUZAL et al., 2013; NONOURA et al. 2011; TESKE; SORENSEN, 2008).

Figura 1 - Esquema da diversidade filogenética de *Archaea*

Fonte: OFFRE e colaboradores (2013).

Crenarchaeota possui só uma classe taxonômica (*Thermoprotei*) e cinco ordens taxonômicos (*Acidilobales*, *Desulfurococcales*, *Fervidicoccales*, *Sulfolobales*, e *Thermoproteales*) dois dos quais foram descobertos recentemente (*Acidilobales* e *Fervidicoccales*). Todos os Crenarchaeota foram encontrados em ambientes quentes como fontes hidrotermais submarinas e aterros sanitários (KLETZIN, 2007).

Alguns organismos do filo recentemente definido como *Thaumarchaeota* foram cultivados, todos os quais obtêm energia a partir da oxidação de amônia. Organismos deste filo são distribuídos globalmente e são encontrados em grande número em

ambientes marinhos e de água doce, solos e sedimentos e também ocorrem em ambientes extremos, incluindo fontes termais (STAHL; DE LA TORRE. 2012).

No entanto, a maioria da diversidade de arqueias atualmente referenciada em bases de dados públicas permanece “não-cultivável” e só foram descritas a partir das sequências do gene rRNA 16S obtidas através de abordagens moleculares.

Assim, está bem estabelecido que as arqueias metanogênicas são ecologicamente importantes na biodegradação da matéria orgânica na natureza levando em consideração que a metanogênese é o último passo da redução total do carbono.

3.3 Gás Metano e Arqueias Metanogênicas

O metano (CH_4) é o gás orgânico mais abundante na atmosfera terrestre e perdendo apenas para o dióxido de carbono (CO_2), é o segundo mais importante gás causador do efeito estufa (WUEBBLES; HAYHOE, 2002). Estima-se também que a molécula de CH_4 é 24 vezes mais eficiente em absorver radiação infravermelha e causar efeito estufa que a molécula de CO_2 (WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION, 1999).

As arqueias metanogênicas são microrganismos que vivem em condições anaeróbias estritas e são encontradas em diversos ambientes como rúmen, rios, oceano, plantações de arroz, solos alagados, sedimentos, lagos, aterros sanitários (FERRY et al., 2007).

Nestas condições elas são capazes de transformar alguns compostos C_1 (que possuem apenas um carbono) em CH_4 por um processo chamado de metanogênese. A metanogênese é totalmente inibida por oxigênio, por isso a estrita anaerobiose. Estes microrganismos foram os primeiros identificados por Carl Woese a ser filogeneticamente distinto de todos os outros tipos celulares e que posteriormente alavancou a pesquisa não só sobre os organismos metanogênicos, mas também sobre o domínio *Archaea* (WOESE; CAVICCHIOLI, 2007).

Morfologicamente, os metanogênicos exibem uma ampla variedade de formas e tamanhos, incluindo bacilos regulares, cocos regulares e irregulares, bacilos de longas cadeias, espirilos, sarcinas e placas irregulares achatadas (KLETZIN et al., 2007). A motilidade está presente algumas vezes. Algumas espécies podem se agregar em

clusters. Várias espécies de *Methanosarcina* e *Methanosaeta* contêm vesículas gasosas. A coloração de Gram pode ser positiva ou negativa mesmo em células do mesmo gênero (BEVERIDGE; SCHULTZE-LAM, 1996).

A metanogênese é uma forma de respiração anaeróbica que utiliza uma variedade de compostos C1 ou ácido acético comoceptor final de elétrons. Existem basicamente três vias para a metanogênese (Figura 2) e todas convergem para a redução de metil-CoM (coenzima M) a CH_4 .

Figura 2 - Três principais vias metanogênicas².

Fonte: Adaptado de Galagan e colaboradores (2002).

Muitos metanogênicos podem reduzir CO_2 a metano usando elétrons derivados da oxidação do H_2 , esta via é chamada de hidrogenotrófica. Outros podem utilizar compostos C1 tais como metanol ou metilaminas sendo oxidada para fornecer elétrons à redução de três moléculas adicionais de metano, sendo esta via denominada metilotrófica. Há também uma terceira via, chamada acetoclastica, onde o acetato é quebrado em um grupo metil que é reduzido a metano. Nas três vias um gradiente eletroquímico é gerado

²² Hidrogenotrófica nas setas vermelhas, metilotrófica em setas verdes e acetilotróficas em setas azuis. CoM, coenzima M; H_4SPT , tetrahidrosarcinapterina; MF, metanofurano (Galagan et al., 2002).

para o uso na síntese de ATP (GARCIA et al., 2000). Um resumo das três vias é ilustrado na figura 2.

3.4 Métodos independentes de cultivo

Métodos moleculares independentes de cultivo têm reforçado bastante o nosso conhecimento sobre a diversidade microbiana. Tem sido revelado que a maioria dos microrganismos documentados por métodos moleculares não podiam ou não tinham sido cultivado em condições de laboratório (AMMAN et al., 1995).

A maioria dos métodos moleculares empregados em ecologia microbiana envolve o estudo do gene 16S ribossomal (16S rRNA). Várias características do gene 16S rRNA tais como sua presença em todas as células vivas, ocorrência em elevado número de cópias, estabilidade, função no metabolismo celular e ubiquidade o tornaram um dos marcadores moleculares mais aceitos e utilizados em ecologia microbiana, além de ser utilizado como marcador evolutivo (CASE et al., 2007; HEAD et al., 1998).

Uma das principais características para o gene 16s rRNA ser considerado um marcador filogenético é o fato de possuir regiões altamente conservadas, o que possibilita o desenho de *primers* específicos de PCR e regiões hipervariáveis, as quais são utilizadas para inferir relações filogenéticas entre os microrganismos (WARD et al., 1990).

De maneira geral, os métodos moleculares podem ser divididos em dois grupos principais. O primeiro inclui métodos que analisam a estrutura de uma comunidade a partir de um perfil de amplificação de genes 16S rRNA via PCR. Os perfis são gerados pelas características físico-químicas dos *amplicons* (tamanho do fragmento em número de pares de bases, porcentagem de Guanina – Citosina, sítios de clivagem por endonucleases, etc.). O perfil obtido a partir das análises é chamado de *fingerprint* (MUYZER et al., 1995)

O segundo grupo de métodos envolvem o sequenciamento do gene 16S rRNA dos membros da comunidade e posterior identificação destas sequências em bancos de dados. Ao contrário das técnicas de *fingerprint*, o sequenciamento permite tanto a identificação de microrganismos, como também inferir a função no ambiente estudado (CHENEY et al., 2000).

3.4.1 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE – *Denaturing gradient gel electrophoresis*)

O DGGE foi introduzido por Myuzer e colaboradores (1993), os quais estudaram a diversidade microbiana em águas marinhas a partir do produto de PCR do gene 16S rRNA.

As principais características do DGGE incluem a alta resolução na comparação de comunidades microbianas, a possibilidade de identificar microrganismos por meio de sequenciamento das bandas obtidas, a análise de várias amostras no mesmo gel e o acompanhamento da dinâmica de populações específicas em função de variáveis ambientais (MUYZER; RAMSING, 1995).

O princípio da técnica de DGGE é separar, por meio de eletroforese, os produtos de PCR do mesmo tamanho com base em sua composição de nucleotídeos. A separação ocorre à medida que os fragmentos de DNA migram em um gel de poliacrilamida contendo agentes desnaturantes, como a ureia e a formamida. Estes agentes são distribuídos na forma de um gradiente percentual, pré-estabelecido pelo pesquisador, que causam o rompimento das pontes de hidrogênio que interligam as fitas de DNA. Durante a eletroforese, os fragmentos de DNA (dupla fita, fita simples ou parcialmente desnaturados) migram com velocidades diferentes, o que permite a separação das moléculas segundo sua composição de nucleotídeos (MUYZER et al., 1993).

No início do desenvolvimento da técnica, a sensibilidade da separação de nucleotídeos por DGGE era estimada em apenas 50% de mudanças de base em fragmentos de DNA de 50 a 1000 pares de bases (MYERS et al., 1985).

Atualmente, esta sensibilidade foi aumentada com a inserção de adaptadores moleculares em uma das extremidades dos produtos de PCR a serem analisados. O adaptador constitui uma sequência de aproximadamente 40 nucleotídeos ricos em Guanina e Citosina que, em condições não desnaturantes, formam pontes de hidrogênio sobre si e é denominado grampo de GC. A presença deste grampo de GC aumenta o ponto de desnaturação da molécula e posteriormente, aumenta a sensibilidade da técnica em separar dois fragmentos de DNA de conteúdo genético similar. A simples inserção de um grampo de GC em um dos *primers* utilizados no PCR permitiu o aumento de 40%

para aproximadamente 100% na detecção de mutantes em sequências de DNA (MYERS et al., 1985; SHEFFIELD et al., 1989)

3.4.2 Pirosequenciamento

As análises de sequenciamento de DNA foram dominadas por quase duas décadas pelo método de Sanger. Este método é baseado em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), clonagem bacteriana, eletroforese capilar e síntese de DNA com dideoxynucleotídeos marcados com sondas fluorescentes que interrompem a extensão da cadeia. Entretanto, a demanda por sequenciamento de genomas cresceu muito e novos métodos foram desenvolvidos a fim de aumentar o rendimento da análise, a cobertura genômica, e também de diminuir o custo e o número de corridas.

Estes novos métodos foram então chamados de sequenciamento de nova geração (sigla NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*). Uma destas novas tecnologias é o pirosequenciamento. Descrito em 1996 por Ronaghi e colaboradores, o método tem como premissa a incorporação de nucleotídeos específicos detectados pela molécula de pirofostato (PPi) produzida durante a reação de polimerização do DNA. Esse processo foi denominado “sequenciamento por síntese” uma vez que a sequência alvo é determinada à medida que é sintetizada a fita complementar.

Todo o processo envolve a participação de quatro enzimas: DNA polimerase, sulfúrilase, luciferase e apirase. Inicialmente a reação de pirosequenciamento é montada contendo o tampão de reação, *primers*, o DNA molde, o conjunto de enzimas e seus substratos (Adenosina 5'fosfosulfato – APS e luciferina). Essas enzimas são responsáveis pela síntese da fita complementar através da incorporação de nucleotídeos e da conversão do PPi em ATP e consequentemente em sinal luminoso, detectado posteriormente pelo equipamento (RONAGHI, 2001).

O uso da técnica de pirosequenciamento do gene rRNA 16S foi usado pela primeira vez por Jonasson et al. (2002) para explorar a diversidade microbiana em larga escala, criando o conceito de “assinaturas” (*Signature matching*).

Essa técnica foi aperfeiçoada com o uso de *primers* marcados na PCR (BINLADEN et al., 2007). De forma semelhante Parameswaran et al. (2007) propuseram a adição de

uma sequência curta de nucleotídeos (*tag* ou *barcode*) ao primer utilizado na reação de PCR para a detecção do gene alvo. Este código de barras permitiu o uso da técnica de pirosequenciamento para várias amostras diferentes em paralelo, pois as sequências podem ser utilizadas posteriormente como referência na identificação e separação de diferentes amostras por ferramentas de bioinformática.

Um dos primeiros trabalhos a usar a técnica de pirosequenciamento em ecologia teve por objetivo caracterizar a diversidade em amostras de solo de América do Norte (EUA e Canadá) e da América do Sul (Brasil), obtendo de 26.000 a 53.000 sequências de 16S rRNA de cada amostra. Após análises estatísticas, a estimativa de espécies bacterianas variou de 6.000 (solos do Brasil e EUA) a 20.000 (Canadá), segundo os índices de riqueza de Ace e Chao1. Esta estratégia permitiu detectar organismos raros (com baixa abundância) nas populações, que era uma limitação das técnicas tradicionais de clonagem e sequenciamento (ROESCH et al., 2007).

Várias abordagens estatísticas têm sido utilizadas para estimar e comparar a diversidade microbiana, bem como as estruturas das suas comunidades em diferentes ambientes. Geralmente a estrutura e diversidade microbiana é analisada em função da ocorrência de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU – *Operational Taxonomic Units*) ou filotipos, uma vez que o conceito de espécie, principalmente para procariotos, é bastante controverso (HAUSDORF, 2011; KÄMPER et al., 2012; OGUNSEITAN, 2007; ROSSELLÓ-MORA et al., 2001).

No entanto, os critérios para definição das OTUs não são consensuais, principalmente quando se discute a distância evolutiva limite para que uma sequência represente uma OTU. Normalmente as sequências com similaridade >97% são consideradas da mesma espécie, >95% são consideradas do mesmo gênero, >90% são consideradas da mesma família e >80% do mesmo filo. Estes valores de *cutoff* são os que mais se adequam à taxonomia bacteriana, mas não podem ser considerados rigorosamente válidos para uma classificação hierárquica fiel (KONSTANTINIDIS et al., 2006; MCINERNEY et al., 2008; ROSSELLÓ-MORA, 2012. SCHLEIFER, 2009; SCHLOSS et al., 2005).

A técnica de pirosequenciamento também já foi utilizada para análise da diversidade do gene 16S rRNA em sedimentos marinhos ao redor do mundo. Mills e colaboradores

(2012) em amostras de sedimento da Grande Barreira de Coral, na Austrália; Zhu e colaboradores (2013) no mar da China; Biddle e colaboradores (2011) no golfo do México; Ruff e colaboradores (2013) em uma exsudação fria “*cold seep*” na Nova Zelândia; Hamdan e colaboradores (2012) em sedimentos do Pacífico sul, entre outros.

Em sedimentos de regiões polares, poucos trabalhos foram realizados usando esta abordagem. Jorgensen e colaboradores (2013) utilizaram a técnica de pirosequenciamento para determinar os perfis das comunidades microbianas e sua relação com processos biogeoquímicos em regiões árticas da Noruega. Kirchman e colaboradores (2010) realizaram um trabalho similar com amostras de sedimento marinho do ártico Canadense. Entretanto, no mar de Ross, Antártica Oriental, Carr e colaboradores (2013) foram os primeiros em estimar a diversidade microbiana em sedimentos marinhos antárticos.

Assim, a informação da diversidade microbiana nos sedimentos marinhos antárticos possibilita o estudo dos ciclos biogeoquímicos em áreas consideradas sensíveis à mudanças climáticas no planeta (INCT-Criosfera, 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta de Sedimento costeiro em diversos pontos da Enseada Martel e Enseada MacKellar ao longo três verões austrais diferentes

Com o objetivo de realizar uma análise de distribuição espacial e temporal das comunidades microbianas em sedimento costeiro na Baía do Almirantado foi coletado sedimento da zona costeira nos pontos denominados: Refugio (R2) localizado na enseada MacKellar; Comandante Ferraz (CF), Ponta Ullman (PU) e Botany Point (BP) localizados na enseada Martel (Tabela 2; Figura 3) em verões austrais diferentes. A coleta foi realizada utilizando-se a embarcação Skua, pertencente a EACF e o auxílio de um BOX CORER ou *van veen* e as amostras foram coletadas com colher estéril, colocadas em sacos de coleta *whirlpack*. Todas as amostras foram congeladas a -20 °C e mantidas assim até o processamento.

Tabela 2 - Descrição geral da malha amostral coletada com pegador Van Veen na Enseada Martel e MacKellar, Baía do Almirantado em diferentes Operações Antárticas

Local Coleta	Coordenadas		Prof. (m)	Localização Geográfica
	Lat. S	Long W		
Comandante Ferraz (CF)	62° 05. 131" S	58° 23.369" W	20 m	Enseada Martel
Botany Point (BP)	62° 05. 701" S	58° 19.849" W	20 m	Enseada Martel
Ponta Ullman (PU)	62° 05. 015" S	58° 23.987" W	20 m	Enseada Martel
Refugio 2 (R2)	62° 04. 210" S	58° 25.335" W	20 m	Enseada MacKellar

Figura 3 - Localização dos pontos coleta amostrados com pegador Van Veen nas enseadas MacKellar e Martel em três Operações Antárticas diferentes (OA XXVI, XXIX, XXX)

4.1.1 Desenho Experimental

A figura 4 apresenta o fluxograma da metodologia empregada nesse estudo.

Figura 4 - Sequencia dos experimentos realizados com as amostras de sedimentos costeiros da Baía no Almirantado (Enseada Martel e MacKellar) em três verões austrais diferentes.

4.1.2 Extração de DNA das amostras de sedimento marinho costeiro

O DNA das amostras de sedimento marinho costeiro coletado nas enseadas MacKellar e Martel foi extraído usando PowerSoil DNA kit® (MoBIO), utilizando-se alíquotas de até 0,5 g, segundo as especificações do fabricante.

4.1.3 Pirosequenciamento das amostras de sedimento das diferentes amostras de sedimentos costeiros da Baía no Almirantado (Enseada Martel e MacKellar) em três verões austrais diferentes

4.1.3.1 Construção da biblioteca de amplicons do gene 16S rRNA para pirosequenciamento

O sistema de sequenciamento 454 oferece uma alternativa na hora de sequenciar diferentes amostras simultaneamente. Usando o software *GS Amplicon Variant Analyzer* (AVA) é possível obter leituras de diversas sequências. Empregando *fusion primers*, os quais são compostos de três partes diferentes (Figura 5) é possível sequenciar várias amostras em uma única placa de sequenciamento, sabendo que cada amostra possui uma identificação própria para análises posteriores.

Figura 5 - Componentes do *Fusion Primers* usados na construção das bibliotecas de amplicons.

Fonte: (ROCHE, 2011)

Na extremidade 5' se encontra uma sequência de 25 nucleotídeos (Letras azuis) que atende os requerimentos do sistema de sequenciamento 454 para ser hibridizada com o mecanismo de microesferas de captura onde acontece a PCR em emulsão. Além disso, a extremidade 5' dever terminar com uma sequência denominada chave TCAG (vermelho) usada para o sequenciamento do amplicon.

A extremidade 3' de cada *primer* é desenhada para se anelar com uma sequência específica da amostra de DNA, no caso específico, o gene 16S rRNA. Para identificar cada amostra, são usados "MID", ou seja, *barcodes*, apresentados na figura 5 em laranja

e amarelo. No caso do *primer* reverso, não é necessário sintetizar o oligonucleotídeo com a região MID (Roche, 2011).

Os *primers* utilizados para a construção da biblioteca de amplicons estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 -*Primers* utilizados na construção das bibliotecas de amplicons das amostras de sedimento costeiros da Baía do Almirantado (Enseada Martel e MacKellar) em três verões austrais diferentes

Nome Primer	Sequencia	Amostras
U519F-A1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTATATCAGCMGCCGCGGTAATWC	OAXXVI R2 2007 OAXXX BP 2012
U519F-A2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTACTGCAGCMGCCGCGGTAATWC	OAXXVI BP 2007 OAXXX CF 2012
U519F-A3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACATATCAGCMGCCGCGGTAATWC	OAXXVI PU 2007
U519F-A4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAGCGCAGCMGCCGCGGTAATWC	OAXXVI CF 2007
U519F-A5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGATATCAGCMGCCGCGGTAATWC	OAXXIX R2 2010
U519F-A6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGACACCAGCMGCCGCGGTAATWC	OAXXIX BP 2010
U519F-A7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGAGTCAGCMGCCGCGGTAATWC	OAXXIX PU 2010
U519F-A8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGCTCCAGCMGCCGCGGTAATWC	OAXXIX CF 2010
U519F-A9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATACACAGCMGCCGCGGTAATWC	OAXXX R2 2012
U519F-A10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAGAGCAGCMGCCGCGGTAATWC	OAXXX BP 2012
U1068R-B	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGCTGACGRCRGCCATGC	

4.1.4 Amplificação do gene 16S rRNA do sedimento marinho costeiro para DGGE

O perfil das comunidades de Bactéria e Arqueia dos sedimentos marinhos costeiros foram comparados em DGGE. Usando primers específicos para o domínio *Bactéria* (338FGC-518R) e *Archaea* (344F-958R), que amplificam a região V3 e V3-V5 do gene 16S rRNA respectivamente. A tabela 4 apresenta todas as sequencias dos primers e condições de PCR usadas neste trabalho para fazer DGGE.

Tabela 4 - Sequência de *primers* usados no DGGE.

	Primer		Sequencia
Sedimento	338FGC	Bactéria	5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3' ³
	518R		5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3'
			Sequencia
	344FGC	Archaea	5' ACGGGGYGCAGCAGGCGC 3' ¹
	958R		5' GTGCTCCCCGCCAATTCCT 3'
Cultivos	1100F		5' AACCGTCGACAGTCAGGYAACGAGCGAG 3'
	1400R		5' CGGCGAATTCGTGCAAGGGAC 3'

4.2 Coleta de Sedimento das diferentes isóbatas ao longo da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield (Operação Antártica XXVII)

Para determinar os perfis das comunidades microbianas ao longo de um gradiente de profundidade na baía do Almirantado e no Estreito de Bransfield, foram utilizadas amostras de sedimento coletadas com Mini Box Corer (MBC) durante a Operação Antártica XXVII (2008/2009), em 15 pontos da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield, localizados em cinco profundidades diferentes (100 m, 300 m, 500 m, 700 m e 1100 m) (Figura 6). Para as coletas utilizou-se o guincho principal do Navio de Apoio Oceanográfico Ary Rongel para a operação com o Box Corer. As amostras de sedimento da MCB foram sub-amostradas utilizando-se seringas descartáveis de 60 mL acopladas a válvulas de três vias em apenas um lançamento do Box Corer de cada profundidade. Além das coletas de sedimentos utilizando-se seringas, foram feitas amostragens com sacos estéreis tipo whirl Pack – dois sacos por amostra coletada de Box Corer, incluindo-se as réplicas de lançamento em cada profundidade.

As subamostragens foram feitas com colheres de metal previamente limpas com álcool 70° GL. A descrição geral das amostras é apresentada na tabela 5.

³ Grampo de GC: CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G. (Muyzer et al., 1993).

Figura 6 - Localização dos pontos de coleta amostrados com Box Corer na Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield. Pontos 1, 2, 3 em 100 m; 4, 5, 6 em 300 m; 7, 8, 9 em 500 m; 10, 11, 12 em 700 m; 13, 14, 15 em 1100 m. Criado por Dr. André Rosch Rodrigues.

Tabela 5 - Descrição geral da malha amostral coletada com Box Corer na Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield.

ID	# whirl-pack	Data Coleta	Hora	GPS		Prof. Teor	Prof. Real (m)	Temp		Localização Geografica
				Lat S	Long W			Ar	Agua	
1	100.1S	1/DEZ/2008	08:00	62° 5' 11.800''	58° 22' 19.300''	Prof. 100m	100	4	1	Enseada Martel
2	100.2S	2/DEZ/2008	08:00	62° 6' 14.000''	58° 24' 38.000''	Prof. 100m	158	1	1	Enseada Martel
3	100.3S	2/DEZ/2008	12:29	62° 5' 56.000''	58° 26' 15.000''	Prof. 100m	105	6,5	2,5	Enseada McKellar
4	300.1S	2/DEZ/2008	15:45	62° 6' 15.800''	58° 23' 49.700''	Prof. 300m	277	7	3	Baía do Almirantado
5	300.2S	3/DEZ/2008	13:50	62° 8' 27.800''	58° 28' 33.200''	Prof. 300m	296	4	1	Baía do Almirantado
6	300.3S	3/DEZ/2008	16:20	62° 8' 17.700''	58° 24' 8.100''	Prof. 300m	305	4	1	Baía do Almirantado
7	500.1S	2/DEZ/2008	22:50	62° 9' 30.945''	58° 25' 25.501''	Prof. 500m	493	3	1	Baía do Almirantado
8	500.2S	3/DEZ/2008	00:15	62° 10' 26.000''	58° 23' 41.001''	Prof. 500m	502	3	1	Baía do Almirantado
9	500.3S	4/DEZ/2008	18:31	62° 12' 38.888''	58° 21' 54.300''	Prof. 500m	483	3	1	Baía do Almirantado
10	700.1S	4/DEZ/2008	21:45	62° 16' 21.300''	58° 18' 3.003''	Prof. 700m	693	3	1	Estreito de Bransfield
11	700.2S	4/DEZ/2008	23:15	62° 16' 28.900''	58° 10' 10.800''	Prof. 700m	724	3	1	Estreito de Bransfield
12	700.3S	5/DEZ/2008	18:47	62° 15' 59.900''	58° 13' 29.800''	Prof. 700m	708	4	2	Estreito de Bransfield
13	1100.1S	5/DEZ/2008	23:05	62° 17' 11.800''	58° 15' 50.002''	Prof. 1100m	1054	2,5	0	Estreito de Bransfield
14	1100.2S	6/DEZ/2008	02:50	62° 17' 33.360''	58° 18' 12.600''	Prof. 1100m	1147	2,5	0	Estreito de Bransfield
15	1100.3S	6/DEZ/2008	11:55	62° 17' 15.400''	58° 14' 26.100''	Prof. 1100m	1140	2	1	Estreito de Bransfield

4.2.1 Desenho experimental

A Figura 7 sumariza as análises realizadas a partir das amostras de sedimento coletadas. O enriquecimento das culturas metanogênicas foi feito através de técnicas específicas de cultivo de microrganismos anaeróbios estritos, em frascos lacrados, com atmosfera controlada contendo meios de cultura livres de oxigênio.

A produção de metano pelas culturas ao longo dos períodos de incubação foi monitorada através de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC/FID) e serviu de parâmetro para os tempos de tomada de amostras para os repiques.

Para a caracterização da estrutura de comunidade de bactérias e arqueias nas amostras de sedimento e culturas de enriquecimento foi empregada a técnica molecular de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), que permite obter perfis de bandas (*fingerprintings*) representativos da diversidade de grupos microbianos nas amostras de interesse.

Figura 7 - Sequência dos experimentos realizados com as amostras de sedimentos marinhos da Baía no Almirantado e Estreito de Bransfield.

4.2.2 Pirosequenciamento das amostras de sedimento das diferentes isóbatas ao longo da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield (Operação Antártica XXVII)

4.2.2.1 Construção da biblioteca de amplicons do gene rRNA 16S para pirosequenciamento

Para a construção da biblioteca de amplicons do gene rRNA 16S das amostras de sedimento das isóbatas ao longo de Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield foi usada a metodologia descrita no item 4.1.3.1

As sequências dos *primers* usados para a elaboração das bibliotecas de *amplicons* são mostradas na tabela 6.

Tabela 6 - Primers utilizados na construção das bibliotecas de amplicons das amostras de sedimento das diferentes isóbatas ao longo da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield.

Nome Primer	Sequencia	Amostras
U519F-A1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTATATCAGCMGCCGCGGTAATWC	9
U519F-A2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTACTGCAGCMGCCGCGGTAATWC	10
U519F-A3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACATATCAGCMGCCGCGGTAATWC	1 - 11
U519F-A4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGCGCAGCMGCCGCGGTAATWC	2 - 12
U519F-A5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGATATCAGCMGCCGCGGTAATWC	3 - 13
U519F-A6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGACACCAGCMGCCGCGGTAATWC	4 - 14
U519F-A7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGAGTCAGCMGCCGCGGTAATWC	5 - 15
U519F-A8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGCTCCAGCMGCCGCGGTAATWC	6
U519F-A9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATACACAGCMGCCGCGGTAATWC	7
U519F-A10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAGAGCAGCMGCCGCGGTAATWC	8
U1068R-B	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGCTGACGRCRGCCATGC	

4.2.2.2 Análise dos dados

As sequencias do gene 16S rRNA geradas por pirosequenciamento foram submetidas à identificação no banco de dados do *Ribosomal Data Project* (RDP). O software MOTHUR v. 1.30.0 (SCHLOSS et al., 2009) foi usado para realizar o alinhamento das sequencias, a construção da matriz de distância, o agrupamento das OTUs (Operational Taxonomic Unit), o cálculo dos índices de alfa e beta diversidade.

O método de análise baseado em OTUs permite analisar a frequência de distribuição de sequências de uma ou mais amostras através de matriz de distância. Esta estratégia possibilita calcular os índices de riqueza e diversidade de uma comunidade microbiana (DUARTE, 2010). Para a análise de diversidade foram calculados os índices de riqueza compartilhada (riqueza observada, Ace e Chao1), diversidade (Shannon e Simpson) e similaridade de estrutura de comunidade (abundância de Bray-Curtis e Theta de Yue-Clayton)

4.3.1 Cultivo para enriquecimento de Arqueias metanogênicas presentes nos sedimentos marinhos da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield

Toda manipulação das amostras e culturas foi realizada empregando o sistema de distribuição simultânea de gases (Figura 8), de modo a proteger as células do contato com o oxigênio atmosférico.

Figura 8 - Sistema de distribuição simultânea de gases empregado para manipulação de microrganismos anaeróbios estritos.

O enriquecimento de arqueias metanogênicas foi realizado em frascos de antibiótico de 30 mL contendo 15 mL de meio de cultura. Para o presente trabalho, foram testados dois meios de cultura distintos: (1) Meio *Methanogenium* (DMSZ, 2008), elaborado para o cultivo deste gênero de metanogênicas, de composição definida, salino e rico em fontes orgânicas e cofatores de crescimento (Tabela 7); e (2) Meio marinho, elaborado com água do mar da Baía do Almirantado esterilizada, acrescida de fontes orgânicas metanogênicas e vitaminas (Tabela 8). Este meio foi elaborado com o objetivo de aproximar as condições de incubação das características locais. Princípio semelhante foi empregado por KENDALL et al., (2006) em amostras de ambientes profundos e frios, com condições similares às encontradas na península antártica.

Tabela 7 - Composição do meio Methanogenium e do meio Marinho.

Meio Methanogenium (DSMZ, 2008)		Meio Marinho	
KCl	0,335 g	Acetato de Sodio	1,000 g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	4,000 g	Formiato de Sodio	1,000 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	3,450 g	Metanol	1,000 ml
NH ₄ Cl	0,250 g	NaHCO ₃	5,000 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,140 g	Solução de Vitaminas	10,000 ml
K ₂ HPO ₄	0,140 g	Cisteina-HCl .H ₂ O	0,500 g
NaCl	18,000 g	Na ₂ S.9H ₂ O	0,500 g
Elementos traço	10,000 ml	Resarzurina	1,000 mg
Solução de vitaminas	10,000 ml	Água de mar filtrada e autoclavada	1000,000 ml
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ . 7H ₂ O	2,000 mg		
NaHCO ₃	5,000 g		
Acetato de Sodio	1,000 g		
Metanol	1,000 ml		
Formiato de Sodio	1,000 g		
Extrato de levedura	2,000 g		
Trypticase	2,000 mg		
Resarzurina	1,000 g		
Cisteina-HCl. H ₂ O	0,500 g		
Na ₂ S. 9H ₂ O	0,500 g		
	q.s.p.		
Água destilada	1000,00 ml		

Tabela 8 - Composição da Solução Vitaminas e composição da solução traço de metais.

Solução de Vitaminas		Solução traço de metais	
Biotina	0,002 g	Ácido nitriloacético	1,500 g
Ácido fólico	0,002 g	FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,556 g
Tiamina.HCl	0,005 g	MgSO ₄	0,500 g
Riboflavina	0,005 g	MnSO ₄ . 7H ₂ O	0,500 g
Ácido nicotínico	0,005 g	Na ₂ MoO ₄	0,240 g
Pantetonato de cálcio	0,005 g	Na ₂ WO ₄ . 2H ₂ O	0,240 g
Piridoxina.HCl	0,01 g	Na ₂ SeO ₃	0,150 g
Vitamina B12	0,0001 g	NiCl ₂ . 6H ₂ O	0,100 g
Ácido lipóico (tióico)	0,005 g	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,100 g
Água destilada	q.s.p. 1000,00 ml	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,100 g
		CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,010 g
		AlK(SO ₄) ₂	0,010 g
		H ₃ BO ₃	0,010 g
		KOH	10%
		Água Milli-Q	q.s.p. 1000,00 ml

Para a preparação dos meios de cultura, os componentes minerais (e, no caso do meio *Methanogenium*, extrato de levedura e a tripticase) foram dissolvidos em água previamente fervida sob atmosfera de nitrogênio, distribuídos em frascos de borossilicato

de 100 mL e fechados com tampas de borracha de butila e lacres de alumínio, também sob atmosfera de N₂.

Depois de esterilizado, o meio foi tamponado com bicarbonato de sódio 0,1%, reduzido com sulfeto de sódio 0.05%, acrescido com 0,1% (v/v) de solução de vitaminas (NAKAYAMA, 2005) e suplementado com fontes de carbono e energia para grupos metanogênicos (metanol, formiato de sódio e acetato de sódio na concentração de 20 mM cada, sob atmosfera de H₂:CO₂ 80:20). Os frascos foram inoculados com 5% (p/v) de sedimento.

A concentração do metano produzido na atmosfera dos frascos foi medida em cromatógrafo a gás HP6850, equipado com detector de ionização de chama (FID). A corrida foi isotérmica a 40°C em coluna capilar HP-5, utilizando hidrogênio como gás de arraste. As amostras foram retiradas dos frascos de cultivo com seringa “gas tight” e a agulha flambada ao rubro entre as retiradas de amostra. O volume de injeção foi de 0,1 mL.

Além da produção de metano, o crescimento celular foi observado através do aumento de turbidez do meio de cultura e análises em microscópio de contraste de fase e fluorescência Olympus BX-51. A confirmação da presença de células metanogênicas foi feita através da detecção de autofluorescência sob luz UV, característica do cofator F₄₂₀, específico do metabolismo metanogênico. As observações em microscópio de fase e fluorescência também foram feitas com o objetivo de se descrever as morfologias celulares das arqueias cultivadas.

4.3.2 Análise molecular das amostras de sedimento e culturas de enriquecimento

4.3.2.1 Extração de DNA das culturas enriquecidas

A extração de DNA das amostras de sedimento foi feita através do PowerSoil DNA kit® (MoBIO), utilizando-se alíquotas de até 0,5g, segundo as especificações do fabricante.

No caso dos cultivos, a extração do DNA foi feita conforme protocolo descrito por Massana (1997), modificado por Piza (2004). Partiu-se de 2 mL de culturas crescidas,

que foram então centrifugados a 13000 rpm por 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ao precipitado foram adicionados 900 μL de tampão de lise (EDTA, 40 mM; tris.HCl pH 8, 50 mM; sacarose, 0,75 M). As células foram ressuspensas no tampão e adicionou-se lisozima em concentração final de 1 mg mL^{-1} . Os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos. Ao final desse tempo de incubação, foram adicionados SDS – concentração final de 1% – e proteinase K – concentração final de 0,5 mg mL^{-1} – e nova incubação foi realizada, a 55 °C por 2 horas. A separação do DNA foi feita com 2 lavagens com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e uma lavagem com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1).

Cada lavagem consistiu em adicionar 600 μL da referida solução, homogeneizar, centrifugar os tubos por 5 minutos a 13000 rpm e transferir a fase superior – aquosa – para um novo tubo. Ao final da última lavagem procedeu-se a precipitação do DNA que foi realizada pela adição de 0,1 volume de NaCl 5M e 2 volumes de etanol absoluto gelado e incubação a -20 °C por 2 horas. Os tubos foram então centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos e o DNA precipitado foi lavado com etanol 70% gelado. Deixaram-se os tubos abertos para evaporação dos resíduos de etanol e, após secagem, ressuspendeu-se o DNA em 30 μL de água livre de nucleases.

Após extração, o DNA total foi quantificado por eletroforese em gel de agarose 0.8% (g/mL) em tampão TAE 1X e por espectrômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA)

4.3.2.1 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

A diversidade de bactérias e arqueias nos cultivos e amostras de sedimento foi analisada por análise de cluster a partir do padrão de bandas obtidos pelo DGGE. Os *primers* utilizados e a condição de amplificação são apresentados na Tabela 3.

Os experimentos de DGGE foram realizados segundo o manual da BioRad, do equipamento *The DCode™ Universal Mutation Detection System*. Alíquotas de 10 μL dos produtos de PCR foram aplicadas em gel de poliacrilamida contendo gradiente linear de desnaturantes, formado pela mistura das soluções estoque de poliacrilamida 8%

contendo 0 ou 100% de agentes desnaturantes (ureia e formamida deionizada com resina AG-501- X8 {BioRad, Inc.}, em concentrações de até 7M e 40%, respectivamente).

Para os cultivos foram empregados gradientes de 40-60% e para as amostras de sedimento, gradientes de 30-70%. Após submeter o gel à eletroforese a 60V / 60 °C *overnight*, foi aplicada a coloração com prata (MACEK et al., 1997) e documentado com o equipamento *Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 290 – EDAS 290*. A partir dos perfis de bandas obtidos construiu-se uma matriz de similaridade e um dendrograma de distância através do *software* PC-Ord v4.30, empregando-se o coeficiente de Jaccard e o modelo de agrupamento de Nearest Neighbor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diversidade microbiana em sedimento marinho costeiro nas enseadas Martel e MacKellar

5.1.1 Caracterização da estrutura de comunidade de Bactéria dos sedimentos marinhos costeiros através da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

O produto de amplificação com os primers GC338F – 518R das amostras de sedimento marinho costeiro foi submetido à análise em DGGE com gradiente de desnaturação de 40% a 60% (Figura 9).

Figura 9 - Dendrograma de distância dos perfis de bandas das amostras de sedimento marinho costeiro para o domínio Bactéria. Método UPMG, coeficiente de Jaccard.

O dendrograma de distância mostrou um agrupamento temporal dos padrões de banda para o domínio Bactéria, sendo que três amostras do ano 2007 (CF, PU, BP) e uma do ano 2010 (BP) estão agrupadas no primeiro *cluster*. No segundo *cluster*, encontram-se agrupadas as amostras do ano 2010 (PU, CF, R2) e do ano 2012 (R2, CF, PU, BP) sugerindo que a estrutura da comunidade bacteriana varia ao longo do tempo. Essa provável variação pode ser explicada devido à disponibilidade da matéria orgânica ao longo do tempo, do degelo e um aumento consequente de nutrientes devido ao aumento da temperatura no verão e à hidrodinâmica das enseadas.

5.1.2 Caracterização da estrutura de comunidade de *Arqueia* dos sedimentos marinhos costeiros através da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

O dendrograma de distância construído para analisar os padrões de bandas do domínio *Archaea* foi similar ao perfil obtido com as amostras de *bactéria*. (Figura 10). Dois *clusters* foram gerados, sendo que um deles agrupa 9 das 12 amostras (Amostras de todos os anos) e um outro cluster com amostras de BP (2007 e 2010) junto com R2 (2010).

Figura 10 - Dendrograma de distância dos perfis de bandas das amostras de sedimento marinho costeiro para o domínio *Archaea*. Método UPMG, coeficiente de Jaccard.

Os resultados apresentados usando a técnica de DGGE sugerem um ambiente homogêneo, sem muitas mudanças tanto em termos biogeográficos quanto em termos cronológicos.

Cabe ressaltar que tanto nos dendrogramas realizados para o domínio *Bactéria* quanto para *Archaea*, as amostras BP 2007 e BP 2010 encontram-se agrupadas no mesmo *cluster*, sugerindo uma estrutura de comunidade microbiana estabelecida ao longo do tempo em Botany Point.

5.1.3 Análise da estrutura microbiana dos sedimentos marinhos costeiros das enseadas MacKellar e Martel através da técnica de pirosequenciamento

O DNA extraído das amostras de sedimento marinho costeiro coletadas em três verões austrais diferentes (2007, 2010 e 2012), foi submetido ao pirosequenciamento no Centro Avançado de Tecnologias em Genômica – CATG do departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Inicialmente as sequências de *primers* e *barcode* foram removidas. A tabela 9 apresenta o número de sequências obtidas para cada amostra.

Tabela 9 - Lista de amostras de sedimento marinho costeiro submetidas ao pirosequenciamento e número total de sequências.

Amostra	Número de Sequências
BP 2007	6507
BP 2010	0 ⁴
BP 2012	8498
CF 2007	7924
CF 2010	15693
CF 2012	11914
R2 2007	8207
R2 2010	9622
R2 2012	11355
PU 2007	19908
PU 2010	8248
PU 2012	6936
Total Sequências	114812
Média Sequências	10437

O número total de sequências obtidas foi de 114.812 com a média de 9.568 por amostra. A amostra BP 2010 não apresentou nenhuma sequência pode ser consequência da baixa quantidade de DNA obtido após a purificação da biblioteca do amplicon, sendo insuficiente para realizar a reação de pirosequenciamento.

⁴ Não foram obtidas sequências para a amostra BP 2010

5.1.3.1 Estimativa de riqueza e abundância das amostras de sedimento marinho costeiro das enseadas MacKellar e Martel.

Os índices de riqueza e diversidade para as amostras de sedimento marinho costeiro das enseadas MacKellar e Martel foram calculados a partir de uma matriz de distância entre as sequências. O intervalo de *cutoff* de 0,03% foi selecionado e encontra-se na tabela 10.

Tabela 10 - Número de OTUs únicas e índices de alfa-diversidade estimados para as sequências de sedimento marinho costeiro das enseadas MacKellar e Martel. Valor do *cutoff* 0,03.

0,03	Sobs	Ace	Chao	Simpson	Shannon
BP_2007	226	588	380	0,234	2,379
BP_2012	524	2841	1422	0,058	3,871
CF_2007	369	1150	748	0,153	3,325
CF_2010	356	1001	738	0,178	3,198
CF_2012	293	1185	692	0,171	2,887
PU_2007	288	1060	691	0,126	3,059
PU_2010	405	1091	746	0,176	3,273
PU_2012	304	1112	767	0,125	3,073
R2_2007	375	1268	805	0,119	3,302
R2_2010	392	1234	943	0,175	3,147
R2_2012	355	1385	781	0,085	3,514

As amostras de BP (2007 e 2012) apresentaram valores diferentes quando comparados entre eles tanto nos índices de riqueza (Ace e Chao) quanto nos índices de diversidade (Simpson e Shannon).

A falta de dados de 2010 dificulta as análises, embora existam registros meteorológicos da temperatura média (-1,7 °C) particularmente baixa do mês de novembro de 2007 comparada com anos anteriores (INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2014) provavelmente a disponibilidade de nutrientes, incidência de luz e quantidade de oxigênio disponível, alterando a composição da comunidade microbiana presente no sedimento marinho.

Os índices de riqueza e diversidade calculados nas amostras CF apresentaram valores constantes ao longo do tempo, sugerindo uma estabilidade no perfil da comunidade microbiana.

Embora o local apresente mudanças de temperatura sazonal e ventos, o aporte constante de matéria orgânica proveniente das atividades antropogênicas pode favorecer esses perfis definidos ao longo do tempo.

Entretanto, as amostras R2 e PU apresentaram índices de riqueza e diversidade flutuantes ao longo dos três verões. Essas variações sugerem sucessões ou mudanças das estruturas das comunidades microbianas presentes nos sedimentos marinhos influenciadas por parâmetros ambientais tais como são temperatura, vento, influência das marés e aporte de matéria orgânica proveniente da península transportada pela água de degelo.

Figura 11 - Índices de riqueza Chao1 e Ace calculados para as amostras de sedimento marinho costeiro analisados sob um valor de *cutoff* 0,03.

Figura 12 - Índices de diversidade Shannon e Simpson calculados para as amostras de sedimento marinho costeiro analisados sob um valor de *cutoff* de 0,03.

Assim, segundo os valores exibidos na tabela 10, as amostras que apresentam uma composição de comunidade similares são CF 2007 e CF 2010. Além disso, o índice de riqueza compartilhada (sharedsobs) foram maiores quando comparados com outras amostras. No entanto, a amostra CF 2012 apresenta diferenças significativas tanto nos

índices de Bray-Curtis e ThetaYC quanto na riqueza compartilhada, sugerindo uma mudança no perfil da comunidade no ano de 2012.

As amostras CF 2007 e CF 2010 apresentaram valores baixos nos índices de Beta-diversidade quando comparadas com PU 2012, embora os valores de riqueza compartilhada não sejam os maiores, indicam uma semelhança significativa na composição da comunidade microbiana, provavelmente devido à proximidade geográfica, influência das marés, etc.

As amostras coletadas no Refúgio 2 (R2) mostraram uma dinâmica de mudança. Quando comparados os índices de R2 2010 e R2 2012, evidenciou-se uma alta similaridade nos índices de beta-diversidade. No entanto, quando comparados R2 2007 com R2 2010 e R2 2012, apreciam-se diferenças significativas.

As amostras PU apresentaram uma variação ao longo do tempo, sendo que as amostras mais parecidas são PU 2007 e PU 2012, no entanto, PU 2010 teve diferenças consideráveis quando comparados os valores das outras.

Cabe aqui ressaltar que em nenhum dos quatro pontos amostrados notou-se uma estabilidade na estrutura das comunidades presentes nos sedimentos ao longo do tempo, sendo que nos três verões austrais coletados, sempre houve diferenças nos valores calculados. (Figuras 11 e 12)

Mesmo considerando os quatro pontos como geograficamente próximos, as condições de cada local, em cada ano de coleta variam (temperatura, degelo, vento, marés, micronutrientes, *input* de matéria orgânica, granulometria, etc.), influenciando os perfis das comunidades microbianas no momento da coleta.

A fim de apresentar melhor os resultados das análises de riqueza compartilhada entre as amostras, foram gerados diagramas de Venn no *software* Mothur -versão 1.32.1- (SCHLOSS et al., 2009). Foram escolhidos os resultados de número de OTU compartilhadas (sharedobs) sob o *cutoff* de 0.03 para gerar os diagramas (Figuras 13-19)

Figura 13 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de sedimento marinho costeiro coletadas em 2007. Valor de *cutoff* utilizado 0,03

Inicialmente foram comparadas as amostras coletadas em 2007 quanto ao número de OTU compartilhadas (Figura 13). Todas as amostras apresentaram 60 OTU compartilhadas entre si. As amostras que possuem mais OTU compartilhadas (87) são BP, CF e PU, sugerindo um ambiente homogêneo no qual os perfis de comunidade microbiana são constantes.

No entanto, as amostras com menor quantidade de OTU compartilhadas (58) foram BP, R2 e PU. Esses resultados sugerem uma um padrão geográfico de distribuição de comunidades microbianas, sendo que as amostras BP, CF e PU estão localizadas na enseada Martel, enquanto que a amostra R2 está localizada na enseada MacKellar.

Figura 14 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de sedimento marinho costeiro coletadas em 2010. Valor de *cutoff* utilizado 0,03.

As amostras coletadas em 2010 (exceto BP) possuem 108 OTU compartilhadas (Figura 14). Nesse ano evidenciou-se uma maior similaridade na estrutura da comunidade microbiana entre as amostras PU e R2.

Embora sejam mais distantes em termos geográficos uma da outra, o número de OTU compartilhadas das amostras PU e R2 (178) foi maior quando comparadas PU- CF (142) e R2-CF (135).

Figura 15 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de sedimento marinho costeiro coletadas em 2012. Valor de *cutoff* utilizado 0,03.

A comparação das amostras coletas em 2012 (Figura 15) mostrou que 60 OTU são compartilhadas entre si. As amostras com mais OTU compartilhadas (79) foram BP, CF e R2. Por outro lado, as amostras CF, PU e R2 apresentaram 68 OTU compartilhadas. A amostra BP 2012 apresentou mais OTU únicas, indicando uma estrutura bem diferente quando comparada com as outras amostras coletadas no mesmo ano.

As análises do número de OTU compartilhadas entre amostras do mesmo ponto ao longo do tempo estão apresentadas nas figuras 16-19.

Assim, foi possível avaliar as diferenças nas estruturas das comunidades microbianas em cada um dos pontos estudados. As amostras de R2 apresentaram valores similares de OTU compartilhadas (Figura 16), sendo que R2 2010 e R2 2012 possuem 157 em comum. As amostras com menor número de OTU compartilhadas no Refúgio 2 foram R2 2007 e R2 2012 com 117.

Esses valores sugerem a existência de uma estabilidade na estrutura da comunidade microbiana nos sedimentos do Refúgio 2.

Figura 16 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de sedimento marinho costeiro coletadas no Refúgio 2 em três verões austrais diferentes. Valor de *cutoff* utilizado 0,03.

Figura 17 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de sedimento marinho costeiro coletadas em Comandante Ferraz em três verões austrais diferentes. Valor de *cutoff* utilizado 0,03.

Figura 18 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de sedimento marinho costeiro coletadas em Ponta Ullman em três verões austrais diferentes. Valor de *cutoff* utilizado 0,03.

Figura 19 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de sedimento marinho costeiro coletadas em Botany Point em três verões austrais diferentes. Valor de *cutoff* utilizado 0,03.

As análises das amostras de CF mostraram um número maior de OTU compartilhadas entre CF 2007 e CF 2010 (182). No entanto, quando comparadas as amostras CF 2007-CF 2010 e CF2007- CF 2012 o número de OTU compartilhadas foi menor: 106 91 respectivamente. (Figura 17).

As amostras de PU apresentaram o mesmo perfil de distribuição de OTU, sendo que as amostras com maior número de OTU compartilhadas foram PU 2007 e PU 2010

(126). Por outro lado PU 2007 e PU 2012 apresentaram 88 OTU compartilhadas (Figura 18)

Baseado nos resultados apresentados é possível sugerir que as amostras de 2007 e 2010 são mais parecidas entre elas em todos os pontos. No entanto, existem diferenças quando comparadas com as amostras de 2012.

Com o objetivo de comparar graficamente todas as amostras entre si, foram gerados dendrogramas de similaridade a partir dos índices de Beta-diversidade Bray-Curtis e Theta-YC. (Figuras 20 e 21)

Figura 20 - Dendrograma de similaridade entre as amostras de sedimento marinho costeiro das Enseadas Martel e MacKellar durante três verões antárticos. Método Bray-Curtis, algoritmo UPGMA

Os resultados dos agrupamentos usando tanto o índice Bray-Curtis quanto o índice Theta-YC mostraram resultados muito semelhantes. Dois grupos principais foram evidenciados nos dois dendrogramas, sendo que cada um desses grupos possui as mesmas amostras.

Os resultados mais evidentes nas análises dos dois dendrogramas são a alta similaridade entre as amostras CF 2007 e CF 2010, assim como a inclusão de todas as amostras de Refúgio 2 (R2 2007; R2 2010 e R2 2012) no mesmo ramo dos dois dendrogramas,

No entanto, ocorreu um resultado de difícil explicação devido a alta similaridade entre as amostras R2 2010 e PU 2010, devido a sua distância geográfica.

Figura 21 - Dendrograma de similaridade entre as amostras de sedimento marinho costeiro das Enseadas Martel e MacKellar durante três verões antárticos. Método Theta-YC, algoritmo UPGMA

Outro resultado interessante é a distribuição temporal das amostras, sendo que a maioria das amostras coletadas em 2007 encontram-se no mesmo ramo dos dois dendrogramas, assim como a maioria das amostras coletadas em 2012 estão agrupadas no outro ramo, sugerindo mudanças na disponibilidade de nutrientes nesses anos, devido a diferenças nas temperaturas registradas ao longo da última década (INPE, 2014)

5.1.3.3 *Composição dos membros da comunidade microbiana das amostras de sedimento marinho costeiro obtidas por pirosequenciamento*

Todas as 114.812 sequências foram submetidas à comparação no banco de dados do Ribossomal Data Project através da ferramenta *Classifier*. Foi usado um limiar de confiança de até 50%, valor testado por Claesson et al. (2009) demonstrando que esse valor é suficiente para classificar sequências com acurácia até o nível de gênero.

A classificação das sequências de amostras de sedimento marinho costeiro apresentou um total de 24 filos (Quadro 1). Deste total, o filo Proteobacteria foi dominante em todas as amostras. Os filos Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, e Verrucomicrobia também representam uma população significativa nas amostras de sedimento.

Os resultados confirmam quais resultados dos os diversos estudos realizados em sedimentos marinhos de ambientes polares descritos a seguir (BOWMAN et al., 2003;

CARR et al., 2013; LYSNES et al., 2004; RAVENSCHALG et al., 1999; TESKE et al., 2011).

Figura 22 - Abundância relativa dos filos e as classes de Proteobacteria para as amostras de sedimento marinho costeiro coletado em três verões austrais diferentes.

A abundância relativa foi calculada (Figura 22) mostrando os níveis taxonômicos Filo e classe (só para Proteobacteria). *Gammaproteobacteria* foi a classe mais abundante nas amostras BP 2012 (44,3%), CF 2007 (59,7%), CF 2010 (62,9%), CF 2012 (65,6%), PU 2007 (34,9%), PU 2012 (53,0%) e R2 2007 (39,4%).

Quadro 1 - Número de sequências de sedimento marinho costeiro classificadas em cada filo a partir da ferramenta Classifier (RDP)

FILO	Amostras										
	R2 2007	R2 2010	R2 2012	CF 2007	CF 2010	CF 2012	PU 2007	PU 2010	PU 2012	BP 2007	BP 2012
Acidobacteria	63	107	239	37	46	97	256	107	74	13	89
Actinobacteria	200	221	368	400	666	660	2024	289	183	213	286
Bacteroidetes	371	142	483	52	108	49	66	92	209	25	231
Chlamydiae	1	2	1	1	6	0	2	3	1	0	1
Chlorobi	8	28	39	0	3	13	6	15	4	1	11
Chloroflexi	42	122	387	78	133	243	285	127	42	38	152
Crenarchaeota	1	1	6	1	1	6	13	3	5	1	3
Cyanobacteria	7	22	39	14	47	18	11	24	1	15	24
Deferribacteres	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Euryarchaeota	3	3	12	0	0	8	2	5	7	2	8
Firmicutes	152	125	576	1253	2499	696	2369	143	740	432	98
Fusobacteria	28	4	3	0	1	3	0	0	1	0	0
Lentisphaerae	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Nitrospira	0	6	0	0	1	2	0	16	0	0	1
OD1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	192
Planctomycetes	230	286	90	54	146	82	97	211	69	25	192
Proteobacteria	5394	7168	8175	5646	11298	9521	14105	6286	5401	5654	6201
Spirochaetes	0	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
SR1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Tenericute	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
TM7	25	2	7	5	15	1	3	5	0	0	3
Verrucomicrobia	1547	1131	583	251	410	255	237	657	76	46	949
WS3	10	24	51	2	6	22	15	27	13	0	22

Dentro da classe *Gammaproteobacteria*, os gêneros mais abundantes foram *Psychrobacter* e *Psychromonas*, organismos descritos em sedimentos marinhos com baixas concentrações de oxigênio. Além de possuírem metabolismo heterotrófico fermentativo capaz de hidrolisar polímeros como amido e celulose, já foram descritos em ecossistemas antárticos (BOWMAN et al., 1996; CICERO et al., 2012).

Gammaproteobacteria também foi o grupo bacteriano mais abundante em outros estudos de sedimentos marinhos do oceano ártico, pacífico norte, oceano antártico, mar da China, etc. (KOURIDAKI et al., 2010; LI et al., 2009; LoGIUDICE et al., 2012; ZHU et al., 2013)

Alphaproteobacteria foi mais abundante na amostra BP 2007 (54,7%). Dentro de tal classe foi observada uma grande ocorrência de sequências afiliadas à família *Rhodobacteraceae*, relatado anteriormente no Ártico, Antártica marítima e Pacífico Sul (STEVENSON; ULLOA, 2008; VOLLMERS et al., 2013; WILKINS et al., 2013).

O gênero mais abundante da família *Rhodobacteraceae* encontrado nesse estudo foi *Loktanella*, organismo previamente descrito em diferentes ecossistemas aquáticos ao redor do planeta, incluindo biofilmes, sedimentos marinhos e sedimentos lacustres da Antártica. Possui um metabolismo heterotrófico, anaeróbico facultativo, fermentador de açúcares e relacionado com o ciclo do nitrogênio, sendo capaz de reduzir o nitrato até nitrito (IVANOVA et al., 2005; LAU et al., 2004; PARK et al., 2013; VAN TRAPPEN et al., 2004).

Por outro lado, *Deltaproteobacteria* apresentou-se mais abundante nas amostras PU 2010 (59,0%), R2 2010 (53,0%) e R2 2012 (35,5%). As famílias mais representativas foram *Desulfuromonadaceae*, *Desulfobulbaceae* e *Desulfobacteraceae*. Todos os organismos que pertencem a esses grupos possuem metabolismo relacionado ao enxofre, especificamente redutores de sulfatos. Diversos estudos mostraram uma prevalência das classes *Gamma* e *Deltaproteobacteria* em diferentes sedimentos marinhos (BOWMAN et al. 2003; RAVENSCHLAG et al., 1999; ZENG et al., 2011).

Os resultados gerais de todas as amostras sugerem uma estrutura de comunidade microbiana de ambientes anóxicos, sendo que os principais metabolismos relacionados com os filotipos encontrados pertencem aos processos fermentativos da matéria orgânica

e redução do enxofre, os quais são limitados pela concentração de oxigênio nos sedimentos.

Schaefer e colaboradores (2004) determinaram que as camadas sedimentares mais superficiais nos sedimentos adjacentes à estação antártica Comandante Ferraz possuem características anôxicas, presença de pirita e calciopirita, e alta concentração de matéria orgânica, favorecendo os metabolismos microbianos anaeróbicos, tanto facultativos quanto estritos.

A distribuição das comunidades microbianas dos sedimentos marinhos costeiros foi determinada a partir dos resultados do pirosequenciamento do gene 16S rRNA, usando Análise de Componentes Principais (PCA). A similaridade das comunidades microbianas das amostras foi calculada usando os níveis taxonômicos de filo/classe de Proteobacteria e para gênero (Figura 23 e Figura 24)

Figura 23 - Análise de Componentes Principais das comunidades microbianas dos sedimentos marinhos costeiros da Enseada Martel e MacKellar ao longo de três verões austrais no nível taxonômico Filo e classe para Proteobacteria.

Figura 24 - Análise de Componentes Principais das comunidades microbianas dos sedimentos marinhos costeiros da Enseada Martel e MacKellar ao longo de três verões austrais no nível taxonômico gênero.

De forma geral a PCA mostrou que a estrutura das comunidades variou em função de cada ponto. Pela ordenação das amostras observa-se tanto nas PCA de filo/classe (Figura 23) quanto de gênero (Figura 24) que as amostras de CF são mais parecidas entre elas e apresentam maior correlação com a classe *Gammaproteobacteria*.

Já a amostra BP 2007 apresentou maior interação com a classe *Alphaproteobacteria* e menor interação com os filos menos abundantes. As amostras coletadas no Refúgio 2 (R2) e PU 2010 apresentaram maior interação com a classe *Deltaproteobacteria*.

A similaridade da estrutura e composição microbiana das amostras coletadas no Refúgio 2 com PU 2010 pode ser explicada em base dos resultados obtidos nas análises granulométricas (Anexo A) onde observaram-se mudanças ao longo do tempo nos valores de areia e argila, sendo no ano 2010 que os valores de argila foram menores quando comparados com os outros anos.

Quadro 2 Número de sequências de sedimento marinho costeiro classificadas nos 50 gêneros mais abundantes, agrupadas segundo a ferramenta Classifier (RDP). *Cutoff* utilizado para gênero 0,03

Gêneros	Amostras										
	BP 2007	BP 2012	CF 2007	CF 2010	CF 2012	PU 2007	PU 2010	PU 2012	R2 2007	R2 2010	R2 2012
Aestuariicola	1	39	10	23	11	19	11	18	58	41	185
Arthrobacter	83	1	1	4	4	453	0	0	0	0	1
Bacillus	6	0	9	13	0	219	1	0	0	0	0
Blastopirellula	11	80	25	75	49	54	101	33	100	130	29
Caldilinea	1	5	19	37	43	0	8	7	3	13	12
Carnobacterium	6	0	42	112	10	11	0	30	84	0	0
Clostridiisalibacter	0	0	85	168	0	8	0	0	0	0	0
Clostridium sensu stricto	6	22	110	177	57	36	10	16	10	9	141
Colwellia	0	40	0	4	11	0	0	0	6	9	0
Desulfatiferula	2	9	1	2	75	6	29	6	1	7	3
Desulfobulbus	3	40	43	45	152	73	252	63	80	383	309
Desulfocapsa	1	26	9	8	20	1	199	0	26	257	60
Desulfofaba	7	21	4	6	33	43	67	3	5	50	64
Desulfopila	3	54	13	39	118	21	423	71	36	517	150
Desulforhopalus	28	381	132	243	361	414	1899	74	481	2151	1832
Desulfosarcina	5	6	1	5	10	19	67	3	2	59	61
Desulfuromonas	4	4	3	2	7	6	22	0	3	103	146
Exiguobacterium	18	0	82	0	0	36	0	0	0	0	0
Falsibacillus	2	0	2	5	2	80	0	0	0	0	0
Flavobacterium	0	9	0	0	1	0	0	77	0	0	0
Fusibacter	0	1	0	0	18	0	0	0	0	0	69
Gillisia	5	21	0	3	1	4	0	65	0	1	0
Glaciecola	3	70	0	2	5	1	0	746	0	1	0
Gp23	13	71	26	36	51	200	82	47	48	75	208

(Continua)

(Conclusão)

	Amostras										
Géneros	BP 2007	BP 2012	CF 2007	CF 2010	CF 2012	PU 2007	PU 2010	PU 2012	R2 2007	R2 2010	R2 2012
Granulosicoccus	0	83	6	0	20	0	5	0	30	7	4
Haliea	30	124	69	169	74	66	144	58	135	186	241
Hoeflea	27	18	23	31	9	114	8	5	85	11	4
Loktanella	3056	377	113	188	533	4300	12	935	67	12	40
Longilinea	5	23	13	10	15	28	17	2	7	10	87
Maribacter	6	6	11	23	4	3	10	3	69	10	42
Marinobacter	640	1	21	32	14	280	3	0	0	1	4
Nocardioides	0	1	1	1	0	73	0	0	0	1	1
Paenisporosarcina	73	0	0	0	248	234	0	270	0	1	3
Pelagicola	3	288	9	25	6	9	5	2	76	23	31
Pelobacter	11	68	16	32	27	33	155	10	13	101	170
Persicirhabdus	21	369	43	78	167	116	256	35	328	664	292
Planctomyces	5	65	21	35	20	22	45	21	74	77	26
Planococcus	107	0	44	74	67	506	1	197	0	0	1
Planomicrobium	2	0	4	4	3	195	0	10	0	0	1
Proteiniclasticum	55	0	59	141	3	0	0	0	0	0	0
Psychrobacter	1053	923	3962	8418	1954	5614	10	2243	26	6	1689
Psychromonas	1	948	1	2	3147	2	1	1	2180	5	9
Rhodococcus	0	0	0	3	0	152	0	0	0	0	1
Roseibacillus	8	56	12	32	11	24	39	7	71	55	43
Rubritalea	8	222	155	222	29	8	208	10	770	39	21
Sedimentibacter	3	0	50	89	3	13	0	0	0	0	0
Sphingopyxis	52	10	4	8	8	105	0	0	11	1	0
Sulfitobacter	168	95	6	5	11	264	1	3	28	0	6
Sulfurovum	4	68	28	63	684	232	214	45	56	326	148
Tepidibacter	0	0	71	130	0	16	0	0	0	0	0

5.2 Diversidade microbiana em sedimentos marinhos da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield

5.2.1 Caracterização da estrutura de comunidade de Bactéria das isóbatas através da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

As reações de PCR com os *primers* GC338F-518R foram realizadas com o DNA extraído do sedimento das isóbatas de 100, 300, 500, 700 e 1100 m. Os produtos de amplificação foram submetidos à análise de DGGE com gradiente de desnaturação de 30% a 70%.

Figura 25 - Dendrograma de distância dos perfis de bandas das amostras de sedimento das isóbatas para o domínio Bactéria. Método UPMG, coeficiente de Jaccard.

O dendrograma foi construído empregando-se o coeficiente de Jaccard e o algoritmo UPGMA (Figura 25). Os resultados revelaram perfis similares entre todas as isóbatas. Os resultados mostraram dois *clusters* principais, o primeiro agrupa as amostras de 100 m, 300 m, 500 m e 700 m. O segundo grupo inclui as amostras de 1100 m, sugerindo diferenças na estrutura da comunidade no ponto coletado mais profundo.

5.2.2 Caracterização da estrutura de comunidade de Arqueia das isóbatas através da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

Reações de PCR com os *primers* GC344F-915R foram feitas com o DNA das réplicas de amostras de sedimento das isóbatas de 100, 300, 500, 700 e 1100 m. Os produtos de amplificação foram submetidos à análise de DGGE com gradiente de desnaturação de 30% a 70%. O dendrograma foi construído empregando-se o coeficiente de Jaccard e o algoritmo UPGMA (Figura 26).

Figura 26 - Dendrograma de distância dos perfis de bandas das amostras de sedimento das isóbatas para o domínio Archaea. Método UPMG, coeficiente de Jaccard.

Os resultados da análise revelaram que a similaridade entre as amostras de sedimento coletadas na mesma profundidade teórica variaram, indicando heterogeneidade entre as comunidades encontradas nas amostras de sedimento de uma mesma isóbata, mas, com exceção da amostra coletada a 500 m, as réplicas formaram grupos próximos entre si.

Ao se comparar as comunidades presentes nas diferentes isóbatas, observou-se que as amostras coletadas a 700 e 1100 m formaram um agrupamento separado das demais amostras das profundidades menores, sugerindo haver duas regiões bastante distintas no que se refere à estrutura da comunidade de arqueias.

5.2.3 Análise da estrutura microbiana das isóbatas ao longo da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield através da técnica de pirosequenciamento

O DNA extraído das isóbatas coletadas na OPERANTAR XXVIII (2008-2009) foi submetido ao pirosequenciamento no Centro Avançado de Tecnologias em Genômica – CATG do departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Inicialmente as sequências de *primers* e *barcode* foram removidas. A tabela 11 apresenta o número de sequências obtidas para cada amostra.

Tabela 11 - Lista das isóbatas submetidas ao pirosequenciamento e número total de sequências

Amostra	Número de Sequências
100m-1	1000
100m-2	4728
100m-3	8718
300m-1	5004
300m-2	8508
300m-3	7970
500m-1	11776
500m-2	5600
500m-3	1894
700m-1	5599
700m-2	14419
700m-3	26178
1100m-1	4722
1100m-2	6161
1100m-3	4990
Total Sequências	117267
Média Sequências	14658

O número total de sequências obtidas foi de 117.267 com uma média de 14.658 por amostra. As amostras 100 m-1 e 500 m-3 tiveram uma menor quantidade de sequências quando comparadas com as outras amostras, provavelmente devido a uma baixa performance na PCR e posterior purificação da biblioteca de amplicon. Devido ao número baixo de amostras obtidas nas amostras 100 m-1 e 500 m-3, optou-se por excluí-las das análises de alfa e beta diversidade, com o objetivo de evitar valores extrapolados gerando um maior erro estatístico. Por tanto, as duas amostras foram excluídas das análises de riqueza e abundância.

5.2.3.1 Estimativa de riqueza e abundância das isóbatas ao longo da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield

Os índices de riqueza e diversidade para as isóbatas ao longo da Baía do Almirantado e no Estreito de Bransfield foram calculados a partir de uma matriz de distância entre as sequencias. O intervalo de *cutoff* de 0,03% foi selecionado e encontra-se na tabela 12.

Tabela 12 - Número de OTU únicas e índices de alfa-diversidade estimados para as sequencias das isóbatas da Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield. Valor do *cutoff* 0,03

0.03	sobs	ace	chao	simpson	shannon
100M2	80	247,3	197,6	0,734	0,861
100M3	117	484,7	255,3	0,587	1,247
300M1	60	222,4	138,8	0,797	0,660
300M2	93	394,8	270,5	0,813	0,699
300M3	59	372,7	182,0	0,769	0,647
500M1	107	492,6	326,0	0,721	0,983
500M2	150	659,6	538,5	0,713	1,128
700M1	257	1203,4	720,4	0,428	2,246
700M2	116	401,1	221,0	0,746	0,955
700M3	75	305,1	185,5	0,800	0,675
1100M1	99	339,3	264,0	0,713	0,932
1100M2	140	514,9	318,0	0,705	1,098
1100M3	242	923,7	701,4	0,395	2,277

Embora as amostras foram coletadas em uma mesma profundidade teórica, a distância entre elas fazem com que sejam consideradas amostras únicas e não réplicas.

As duas amostras que apresentaram maior número de sequencias únicas observadas foram 700 m-1 (257) e 1100 m-3 (242). Consequentemente, os índices de Ace e Chao1, os quais calculam a riqueza de uma amostra, foram os mais elevados. As duas amostras mencionadas anteriormente apresentaram também uma diversidade maior (índices de Simpson e Shannon) quando comparadas com as outras amostras. (Figuras 27 e 28)

As amostras que apresentaram menor número de sequencias únicas observadas foram 300 m-3 (59), 300 m-1 (60), 700 m-3 (75), 100 m-2 (80), 300 m-2 (93). Os

resultados dos índices de riqueza e diversidade foram os mais baixos para essas amostras quando comparadas com as outras amostras. Cabe mencionar que as três amostras de 300 m exibiram valores baixos, sugerindo que as comunidades microbianas presentes na profundidade de 300 m apresentam valores de riqueza e diversidade menores quando comparadas com as outras profundidades.

Figura 27 - Índices de riqueza Chao 1 e Ace calculados para as isóbatas analisados sob um valor de *cutoff* 0,03

Figura 28 - Índices de diversidade Shannon e Simpson calculados para as isóbatas analisados sob um valor de *cutoff* de 0,03

As isóbatas de 700 m e 1100 m de profundidade (Coletadas no estreito de Bransfield) mostraram resultados muito variados quando comparados entre elas, sugerindo que os valores de riqueza e diversidade não dependem só da profundidade

5.2.3.2 Comparação da estrutura de comunidade das isóbatas ao longo da Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield através de métodos baseados em OTU

A comparação da estrutura de comunidade por métodos baseados em OTU permitem quantificar a riqueza e a diversidade compartilhada entre duas ou mais amostras. Os índices de beta-diversidade foram calculados entre as isóbatas para o *cutoff* de 0,03 e são apresentados na tabela 13.

Os índices de Bray-Curtis e ThetaYC calculam a dissimilaridade entre a estrutura de dois comunidades, onde 0 significa que dois locais possuem a mesma composição de comunidade (compartilham todas as OTU), e 1 significa que dois locais não compartilham OTU nenhuma.

Assim, os resultados mostraram dois agrupamentos definidos, sendo que isóbatas de 700 m e 1100 m são mais parecidas entre elas quando comparadas com as isóbatas de 100 m, 300 m e 500 m. Igualmente, as isóbatas coletas na Baía do Almirantado (100

m, 300 m e 500 m) apresentam valores de similaridade mais altos quando comparados entre elas.

Tabela 13 - Índices de beta-diversidade calculados entre as isóbatas da Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield para um *cutoff* de 0,03.

Amostras Comparadas		Índices de Beta-diversidade					Amostras Comparadas		Índices de Beta-diversidade		
		sharedsobs	braycurtis	thetayc					sharedsobs	braycurtis	thetayc
100M2	1100M3	49	0,330538	0,101802			1100M2	500M1	35	0,137246	0,002655
100M2	700M1	14	0,324801	0,078127			1100M2	700M3	58	0,118711	0,005998
100M2	100M3	15	0,145631	0,021364			1100M2	700M2	40	0,090026	0,001432
100M2	1100M2	27	0,140777	0,00501			1100M3	300M2	34	0,342012	0,127778
100M2	1100M1	12	0,12489	0,005857			1100M3	300M3	13	0,343778	0,117758
100M2	700M2	11	0,11827	0,003646			1100M3	300M1	16	0,330538	0,1231
100M2	700M3	36	0,105031	0,004224			1100M3	500M2	18	0,335834	0,09681
100M2	500M2	52	0,102383	0,003491			1100M3	700M3	49	0,299647	0,121266
100M2	300M2	40	0,090026	0,005436			1100M3	500M1	72	0,316417	0,095274
100M2	500M1	13	0,088261	0,0028			1100M3	700M2	31	0,28376	0,104524
100M2	300M1	13	0,067079	0,00216			1100M3	700M1	26	0,237864	0,018016
100M2	300M3	13	0,064431	0,001604			300M1	700M1	15	0,332304	0,097367
100M3	1100M3	15	0,323036	0,066873			300M1	500M2	12	0,116505	0,005072
100M3	700M1	42	0,330538	0,053574			300M1	700M2	12	0,111209	0,003173
100M3	700M2	11	0,219329	0,036005			300M1	500M1	14	0,095322	0,004056
100M3	1100M2	12	0,217564	0,031146			300M1	700M3	10	0,070168	0,00129
100M3	700M3	12	0,200353	0,041168			300M1	300M3	38	0,062224	0,002373
100M3	1100M1	19	0,206531	0,032445			300M1	300M2	26	0,062665	0,001542
100M3	300M2	28	0,179612	0,045892			300M2	700M1	15	0,338482	0,101578
100M3	500M2	33	0,172992	0,030619			300M2	700M2	9	0,118711	0,002834
100M3	500M1	40	0,172551	0,029354			300M2	500M2	15	0,112533	0,005022
100M3	300M1	13	0,162401	0,034533			300M2	300M3	13	0,090468	0,007292
100M3	300M3	18	0,138129	0,022552			300M2	500M1	31	0,092233	0,004302
1100M1	700M1	14	0,298764	0,071665			300M2	700M3	12	0,076346	0,000836
1100M1	1100M3	29	0,249779	0,0856			300M3	700M1	18	0,336275	0,092824
1100M1	300M3	40	0,133274	0,011174			300M3	500M2	38	0,128861	0,008465
1100M1	500M2	17	0,13504	0,005503			300M3	700M2	74	0,116946	0,007487
1100M1	300M2	27	0,125772	0,007008			300M3	500M1	12	0,110768	0,007147
1100M1	300M1	41	0,121801	0,007351			300M3	700M3	58	0,092233	0,005745
1100M1	500M1	12	0,109444	0,002821			500M1	700M1	32	0,331862	0,073054
1100M1	700M2	42	0,103266	0,004399			500M1	700M2	14	0,127538	0,002151
1100M1	1100M2	12	0,099294	0,004398			500M1	500M2	10	0,100177	0,001361
1100M1	700M3	14	0,091792	0,005323			500M1	700M3	11	0,096646	0,003256
1100M2	1100M3	14	0,272286	0,0901			500M2	700M1	14	0,320388	0,069106
1100M2	700M1	23	0,270962	0,064255			500M2	700M3	15	0,139011	0,004984
1100M2	300M3	27	0,144307	0,010077			500M2	700M2	43	0,129744	0,001681
1100M2	300M2	35	0,141659	0,006867			700M1	700M3	23	0,312886	0,096628
1100M2	500M2	55	0,142101	0,002243			700M1	700M2	14	0,261253	0,076641
1100M2	300M1	17	0,135481	0,006479			700M2	700M3	13	0,101059	0,002514

A isóбата que mostrou valores mais altos de similaridade foi 300 m (300 m1, 300 m2 e 300 m3). Os resultados mostraram uma alta similaridade entre as amostras coletadas na isóбата de 300 m quando comparadas entre elas.

A fim de apresentar melhor os resultados das análises de riqueza compartilhada entre as amostras, diagramas de Venn foram gerados no *software* Mothur (versão

1.32.1). Foram escolhidos os resultados de número de OTU compartilhadas (sharedobs) sob o *cutoff* de 0.03 para gerar os diagramas (Figuras 29-33)

Devido ao grande volume de dados, foram gerados e aqui apresentados os resultados do número de OTU compartilhadas entre as amostras coletadas na mesma isóbata sob o *cutoff* de 0,03.

A porcentagem de OTU compartilhadas entre as duas amostras da isóbata 100 m foi 20,85% e compartilham 95,5% das sequencias. (Figura 29)

Figura 29 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as isóbatas de 100 m. Valor de *cutoff* utilizado 0,03

A porcentagem de OTU compartilhadas entre as três amostras da isóbata 300 m foi 10,52% e compartilham 96,09% das sequencias (Figura 30)

Figura 30 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as isóbatas de 300 m. Valor de *cutoff* utilizado 0,03

A porcentagem de OTU compartilhadas entre as duas amostras da isóbata 500 m foi 20,09% e compartilham 93,99% das sequencias. (Figura 31)

Figura 31 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as isóbatas de 500 m. Valor de *cutoff* utilizado 0,03

A porcentagem de OTU compartilhadas entre as três amostras da isóbata 700 m foi 20,85% e compartilham 88,36% das sequencias. (Figura 32)

Figura 32 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as isóbatas de 700 m. Valor de *cutoff* utilizado 0,03

A porcentagem de OTU compartilhadas entre as duas amostras da isóbata 1100 m foi 11,64% e compartilham 92,46% das sequencias. (Figura 33)

Figura 33 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as isóbatas de 1100 m. Valor de *cutoff* utilizado 0,03

Assim, os resultados mostraram que as amostras que compartilham maior número de sequências são as amostras coletadas nas profundidades de 100 m e 300 m. Já as amostras coletadas em 700 m e 1100 m mostraram a menor porcentagem de sequências compartilhadas. Esses resultados podem ser explicados com os valores de riqueza e diversidade calculados, os quais mostraram que as amostras 700 m-1 e 1100 m-3 apresentam valores significativamente maiores quando comparados com as outras amostras tanto da mesma profundidade quanto com amostras de outras profundidades.

A fim de apresentar graficamente os resultados das comparações de todas as amostras, foram gerados dendrogramas de similaridade baseados nos resultados dos índices de Bray-Curtis e Theta-YC.

A figura 34 mostra um dendrograma de similaridade entre todas as amostras baseado nos resultados do índice Bray-Curtis, apresentando dois agrupamentos principais.

Um ramo agrupou as amostras 700 m-1 e 1100 m-3, as quais apresentaram índices de alfa-diversidade maiores quando comparadas com as outras amostras. O outro ramo possui três grupos principais, um deles constituído somente pela amostra 100 m-3.

Um dois grupos do segundo ramo está constituído por amostras de 100 m, 300 m e 500 m, sugerindo uma maior semelhança em termos gerais na estrutura das comunidades microbianas achadas nessas profundidades. O último grupo está constituído por amostras das isóbatas de 700 m e 1100 m.

Figura 34 - Dendrograma de similaridade entre as amostras das isóbatas da Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield. Método Bray-Curtis, algoritmo UPGMA

A figura 35 mostra um dendrograma de similaridade de todas as amostras gerado a partir dos resultados do índice de Theta-YC.

Figura 35 - Dendrograma de similaridade entre as amostras das isóbatas da Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield. Método Theta-YC, algoritmo UPGMA

O agrupamento gerado usando o índice Theta-YC foi muito similar com o gerado a partir do índice Bray-Curtis para as amostras das isóbatas, com a formação de dois ramos principais, sendo que um deles possui as amostras 700 m1 e 1100 m3. O outro ramo apresenta dois grupos principais, um deles com as amostras de 100 m, 300 m e 500 m e outro grupo com as amostras das isóbatas de 700 m e 1100 m.

Assim, a estrutura das comunidades microbianas ao longo da Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield, calculada com índices de Beta-diversidade diferentes mostrou uma diferença entre as isóbatas já mencionadas sugerindo que a profundidade poderia

ser um fator importante na conformação das estruturas microbianas nos sedimentos marinhos nesta região da Ilha Rei George.

5.2.3.3 Composição dos membros da comunidade microbiana das isóbatas obtidas por pirosequenciamento

As 117.267 sequências foram submetidas à comparação no banco de dados do Ribossomal Data Project através da ferramenta *Classifier*. Foi usado um limiar de confiança de até 50%, valor testado por Claesson et al. (2009) demonstrando que esse valor é suficiente para classificar sequências com acurácia até o nível de gênero.

A classificação das sequências das isóbatas apresentou um total de 24 filos (Quadro 3). Assim como mencionado no item 3.1.3.3, o filo Proteobacteria foi o dominante em todas as amostras. Os filos Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria apresentaram um número significativo de sequências. A abundância relativa foi calculada mostrando os níveis taxonômicos Filo e Classe (só para Proteobacteria). A classificação dos cinquenta gêneros mais abundantes é apresentada no quadro 4.

Gammaproteobacteria foi a classe mais abundante em todas as amostras: 100 m1 (90,80%); 100 m2 (94,26%); 100 m3 (91,91%); 300 m1 (95,18%); 300 m2 (92,88%); 300 m3 (95,57%); 500 m1 (87,07%); 500 m2 (89,99%); 500 m3 (93,44%); 700 m1 (70,47%); 700 m2 (87,98%); 700 m3 (91,36%); 1100 m1 (88,16%); 1100 m2 (90,76%); 1100 m3 (73,74%).

O gênero mais abundante da classe *Gammaproteobacteria* foi *Psychrobacter*, organismo encontrado em diversos ecossistemas marinhos, tais como sedimentos de mar profundo, sedimentos lacustres, água do mar e também por fazer parte da microbiota de peixes, invertebrados marinhos em macroalgas em ambientes antárticos (BOZAL et al., 2003; CICERO et al., 2012; DANG et al., 2009; LEE et al., 2006).

A segunda classe mais abundante foi *Alphaproteobacteria*, com membros das famílias Rhodobacteraceae, Hyphomicrobiaceae, Phyllobacteriaceae, sendo os gêneros mais representativos Loktanella, Litorimicrobium e Hoeflea, organismos com metabolismo heterotrófico, descritos em trabalhos anteriores como metabolicamente

versáteis, desde ser fototróficos em condições aeróbias e anaeróbicas, oxidar sulfito e degradar compostos aromáticos (JIN et al., 2011; JUNG et al., 2013).

A composição das comunidades microbianas ao longo da Baía do Almirantado e nas amostras coletadas no estreito de Bransfield apresentaram uma alta prevalência de organismos com metabolismo heterotrófico. Essa abundância pode ser explicada pela grande quantidade de matéria orgânica produzida pelo crescimento de macroalgas, as quais cobrem cerca de 30% da superfície do fundo marinho da Baía do Almirantado, constituindo, assim, 74.000 toneladas de biomassa úmida (NEDZAREK; RAKUSA-SUSZCZEWSKI, 2004; ZIELINSKI, 1990).

A distribuição dessa matéria orgânica proveniente da biomassa de macroalgas ao longo da Baía do Almirantado pode ser explicada através das correntes oceânicas. As correntes no meio da baía são mais intensas quando comparadas com as enseadas geradas por massas d'água mais frias provenientes dos mares de Weddell e Bellingshausen, possibilitando assim o transporte e homogeneização da matéria orgânica (GORDON; NOWLIN, 1978).

Quadro 3 - Número de sequências das isóbatas classificadas em cada filo a partir da ferramenta Classifier (RDP)

Filo	Amostras														
	100m-1	100m-2	100m-3	300m-1	300m-2	300m-3	500m-1	500m-2	500m-3	700m-1	700m-2	700m-3	1100m-1	1100m-2	1100m-3
Acidobacteria	0	5	5	2	2	0	9	4	1	36	30	8	3	5	20
Actinobacteria	5	19	89	10	74	23	126	64	10	204	145	142	55	67	148
Armatimonadetes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Bacteroidetes	20	26	95	38	78	88	183	18	36	43	118	387	161	36	213
Chlamydiae	0	0	1	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0	1
Chlorobi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0	0	0	1
Chloroflexi	0	3	3	2	4	4	28	8	1	73	50	7	2	15	13
Crenarchaeota	0	0	0	0	2	0	2	0	0	6	3	0	1	1	0
Cyanobacteria	3	10	18	24	15	9	57	8	1	30	124	47	31	101	56
Deferribacteres	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Deinococcus-Thermus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1
Euryarchaeota	0	0	0	0	2	0	0	2	0	3	6	0	0	0	0
Firmicutes	4	109	99	57	127	81	169	166	21	215	312	249	52	53	79
Fusobacteria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	1	0	0	0	0
Gemmatimonadetes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Lentisphaerae	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2
Nitrospira	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	3	1	0	2	2
OP11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Planctomycetes	1	10	34	8	32	10	39	48	3	50	75	75	27	22	56
Proteobacteria	953	4517	8237	4804	8111	7731	11068	5224	1813	4671	13370	25127	4333	5793	4264
Verrucomicrobia	3	10	69	14	24	1	27	27	2	11	31	42	9	12	44
WS3	0	0	2	0	0	1	1	0	0	11	10	0	1	3	4

Quadro 4 - Número de sequencias de sedimento marinho costeiro classificadas nos 50 gêneros mais abundantes, agrupadas segundo a ferramenta Classifier (RDP). *Cutoff* utilizado para gênero 0,03

Gênero	Amostras														
	100m-1	100m-2	100m-3	300m-1	300m-2	300m-3	500m-1	500m-2	500m-3	700m-1	700m-2	700m-3	1100m-1	1100m-2	1100m-3
Psychrobacter	871	4278	7275	4423	7699	7058	9847	4867	1733	3492	12281	23236	4010	5343	3335
Loktanelia	24	9	20	10	38	42	429	28	23	0	15	785	96	20	120
Psychromonas	1	66	500	95	4	400	55	2	8	2	1	296	6	0	18
Gillisia	18	24	70	33	67	68	140	1	33	0	67	350	150	16	172
Bacillariophyta	3	10	17	23	15	9	55	7	1	26	123	46	31	101	55
Carnobacterium	2	9	51	12	60	17	51	73	2	0	34	24	19	33	29
Blastopirellula	0	9	21	2	13	7	22	33	1	22	41	36	14	13	29
Paenisporosarcina	0	0	0	0	7	3	2	3	0	100	89	32	14	1	6
Filomicrobium	1	2	14	0	11	3	15	6	0	35	28	21	7	19	32
Planococcus	1	48	0	0	5	22	17	19	8	1	20	36	3	1	10
Coxiella	3	4	3	1	9	4	18	14	2	32	18	11	3	13	21
Desulfopila	1	5	7	0	14	5	21	6	0	32	27	8	1	5	11
Haliea	1	4	18	3	15	7	15	7	1	2	20	25	3	6	16
Persicirhabdus	1	3	33	2	11	1	10	14	1	2	14	14	6	4	14
Planctomyces	1	1	5	0	12	0	11	9	0	14	23	25	6	5	17
Clostridium sensu stricto	0	2	8	2	8	4	31	10	4	5	26	8	1	4	7
Desulfobulbus	2	1	8	6	14	7	9	6	0	17	17	4	1	1	7
Desulforhopalus	0	0	10	1	6	4	8	0	0	8	19	8	1	4	26
Hyphomicrobium	0	0	1	0	3	1	2	2	2	34	17	6	2	6	17
Aestuariaicola	2	1	13	0	4	4	9	8	1	3	14	14	1	5	7
Conexibacter	0	2	3	2	4	0	8	3	0	17	7	10	4	8	13
Pasteuria	0	0	7	0	5	2	3	6	1	7	8	12	2	5	6
Gp23	0	1	0	2	1	0	5	2	0	18	13	4	1	3	12

(Continua)

(Continua)

Gênero	Amostras														
	100m-1	100m-2	100m-3	300m-1	300m-2	300m-3	500m-1	500m-2	500m-3	700m-1	700m-2	700m-3	1100m-1	1100m-2	1100m-3
Pelagibius	1	0	2	0	1	0	3	1	0	13	6	5	6	4	12
Aifella	0	0	0	0	2	0	0	0	0	13	10	18	1	1	8
Pelobacter	1	3	2	0	2	0	4	1	0	12	15	6	3	1	3
Sporosarcina	0	0	0	0	2	1	0	0	0	20	23	5	0	0	1
Sulfurovum	3	6	3	1	5	2	15	8	0	0	0	1	0	1	2
Ralstonia	0	0	0	0	5	0	0	3	1	13	12	6	0	0	2
Desulfocapsa	0	0	2	0	3	0	3	1	0	1	14	1	0	2	12
Bauldia	0	0	0	1	3	0	3	1	0	4	7	10	2	2	4
Caldilinea	0	1	2	1	1	0	3	1	1	7	7	2	1	7	2
Pelagicola	3	0	3	0	3	1	2	2	1	0	3	6	2	2	8
Desulfofaba	0	0	0	0	0	1	4	0	0	15	7	0	0	2	6
Verrucomicrobium	1	2	4	0	2	0	0	3	0	4	4	5	1	2	7
Andersenella	0	0	0	1	3	1	4	3	0	10	8	1	1	0	2
Dasania	0	1	5	0	3	1	0	2	1	5	3	7	2	1	3
WS3_genera	0	0	2	0	0	1	1	0	0	11	10	0	1	3	4
Ahrensia	1	0	6	0	0	1	7	3	0	0	7	5	0	0	2
Desulfotalea	1	0	10	0	1	2	8	2	0	4	2	1	0	0	0
Nitrosospira	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	6	2	1	2	6
Desulfuromusa	1	2	0	0	0	2	9	2	0	4	5	1	2	0	0
Litorimicrobium	0	2	4	0	0	0	0	5	0	1	3	10	0	0	3
Escherichia/Shigella	0	0	0	0	0	1	1	0	0	3	4	6	0	3	9
Thalassobacter	0	0	0	0	1	1	24	0	0	0	0	0	0	0	0
Colwellia	0	0	0	3	0	0	1	1	0	3	0	12	0	0	5
Gp10	0	2	1	0	0	0	2	0	1	6	7	3	0	0	2
Rubrobacter	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	2	19

Figura 36 - Abundância relativa dos filos e as classes de Proteobacteria para as isóbatas.

O Filo Firmicutes foi o segundo mais abundante depois de Proteobacteria. A maioria das sequências pertencem às classes Bacilli e Clostridia. Os gêneros mais abundantes dessas duas classes foram *Carnobacterium* e *Clostridium*.

Carnobacterium é um organismo anaeróbico facultativo e pode atuar como o agente responsável pela redução dos níveis de oxigênio nos ecossistemas e para a criação de condições vantajosas para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbicos estritos e já foram descritos em ambientes antárticos, especificamente em ambientes aquáticos anôxicos (FRANZMANN et al., 1991).

Por outro lado, *Clostridium* parecem estar presentes só em forma de esporos, assim, são capazes de resistir as baixas temperaturas e a pressão, no entanto, as células vegetativas parecem não estar adaptadas para crescer nesse ambiente (LAURO et al., 2007; LAURO et al., 2004).

O filo Bacteroidetes foi o terceiro mais abundante, sendo o gênero *Gillisia* o mais abundante, o qual já foi reportado no lago Fryxell, Antártica e em sedimentos marinhos da Baía Maxwell, ilha Rei George (VAN TRAPPEN et al., 2004; ZHOU et al., 2013).

A abundância relativa dos filos menos abundantes nas isóbatas é apresentada na figura 37.

Figura 37 - Abundância relativa dos filos menos abundantes das isóbatas.

Algumas amostras apresentaram uma porcentagem significativa do filo Cyanobactéria. Esse resultado pode ser controverso, pois a base de dados do Ribossomal Data Project (RDP) não tem um critério rigoroso na hora de diferenciar sequências de cianobactérias de sequências de cloroplastos, mostrando assim, uma possível amplificação de genes do domínio *Eukarya*.

A distribuição das comunidades microbianas nas amostras de sedimento da Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield foi determinada a partir dos resultados do pirosequenciamento do gene 16S rRNA usando o *cutoff* de 0.03, foi também

correlacionada, usando Análise de Componentes Principais (PCA) (Figura 38) com os dados físico-químicos (ANEXO B)

Figura 38 - Análise de Componentes Principais correlacionando os gêneros encontrados com os parâmetros físico-químicos nas isóbatas da Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield.

De maneira geral, a PCA apresentou uma ordenação das amostras muito parecida com os dendrogramas gerados a partir dos índices de Beta diversidade (Theta-YC e Bray-Curtis).

5.3 Cultivo para enriquecimento de Arqueias metanogênicas presentes nos sedimentos marinhos da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield

Um total de 25 frascos (cinco por profundidade) contendo meio *Methanogenium* foram mantidos em estufa, a 10 °C, por 150 dias. A produção de metano, que confirma a presença de metanogênicas, foi detectada em todos os frascos (Figura 39).

A queda na concentração de metano na atmosfera dos frascos observada nos cultivos das isóbatas 500 e 1100 m podem estar relacionadas a um possível consumo do gás por microrganismos metanotróficos ou, mais provavelmente, a falhas na manutenção da atmosfera dos frascos por problemas com as tampas. Os cultivos estão sendo mantidos e repicados para posterior caracterização e isolamento de linhagens metanogênicas.

Figura 39 - Produção de em cultivos de sedimento de todas as isóbatas em meio *Methanogenium*.

No caso das culturas em meio Marinho, um total de 15 frascos (três por profundidade) foram mantidos em incubadora 10 °C por até 180 dias. A resposta dos inoculo ao meio foi diferente para as diferentes isóbatas (Figura 40). A amostra coletada a 100 m apresentou pouca produção de metano, observada após um longo período de incubação. As amostras das isóbatas de 300 e 500 m foram as que apresentaram maior produção de metano em menor tempo, com resposta similar ou mais rápida que no meio

Methanogenium.

No caso das culturas inoculadas com sedimento de 700 e 1100 m, foi detectado metano na atmosfera das culturas, mas a irregularidade das medidas sugere problemas na incubação dos frascos, provavelmente relacionados a uma vedação ineficiente das tampas que não pode ser detectada durante o experimento.

Figura 40 - Produção de metano em cultivos de sedimento de todas as isóbatas em meio Marinho.

De uma maneira geral, a resposta dos inóculos ao meio *Methanogenium* foi mais uniforme, embora problemas nas condições de cultivo dificultem a comparação do desempenho das culturas incubadas nas duas condições.

Porém, a detecção da produção de metano indica que o meio foi eficiente para promover o crescimento de arqueias metanogênicas em todas as isóbatas estudadas. Nesse sentido, o meio marinho também foi capaz de promover o crescimento celular e a produção de metano, embora com mais sucesso nas isóbatas de 300 e 500 m.

As análises microscópicas das culturas revelaram diferenças nas morfologias enriquecidas em cada meio de cultura. O meio marinho favoreceu o crescimento de células em grumos, característico de *Methanosarcina*. O meio *Methanogenium*, por sua vez, favoreceu o crescimento de células cocoides e bacilares (Figura 41), as quais não formam os grumos observados no meio marinho.

Figura 41 - Microscopia de células metanogênicas autofluorescentes em meios de cultura diferentes. 1) Cultura da amostra 300 m em meio marinho apresentando morfologia de sarcinas. 2) 3) e 4). Culturas das amostras 300, 500 e 700 m em meio *Methanogenium*

Repiques e diluições decimais das culturas foram feitos, com o objetivo de isolar linhagens metanogênicas e manter os cultivos. As culturas que melhor responderam aos repiques sucessivos foram os derivados de sedimento das profundidades 300 e 700 m. Procedimentos de isolamento das linhagens estão em andamento. A Figura 42 ilustra morfologias observadas nas culturas repicadas.

Figura 42 - Microscopia de fluorescência de repiques das culturas obtidas a partir de sedimento da profundidade 300 m. 1) Morfologias observadas através de coloração live-dead 2) Bacilos metanogênicos autofluorescentes sob luz UV (aumento de 1000x).

5.3.1 Caracterização da estrutura de comunidade de Arqueias metanogênicas enriquecidas através da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

No caso dos enriquecimentos em meio de cultura, reações de PCR com os *primers* GC1100F-1400R foram feitas com o DNA das duplicatas de cultivo em meio marinho das isóbatas de 100 m, 300 m e 500 m e do cultivo da isóbata de 300 m em meio *Methanogenium*. Os produtos de amplificação foram submetidos à análise de DGGE com gradiente de desnaturação de 40% a 60% (Figura 43). A árvore de distância dos perfis de bandas de DGGE foi construída empregando-se o coeficiente de Jaccard e o modelo de agrupamento de Nearest Neighbor (Figura 44).

Figura 43 - Gel de eletroforese de gradiente desnaturante (40%-60%) das culturas metanogênicas⁵

O dendrograma de distância revelou uma similaridade relativamente alta (próxima de 75%) entre os filotipos encontrados nas profundidades 100 m e 300 m cultivados no meio marinho, além da baixa similaridade desses cultivos com o cultivo de 500 m no mesmo meio.

Essas diferenças indicam que o meio marinho foi bem sucedido em retratar uma possível diferença na diversidade de arqueias metanogênicas cultiváveis entre as diferentes isóbatas.

⁵ primers GC1100F-1400R. Canaletas: **01** Meio Marinho 100 m A; **02** Meio Marinho 100 m B; **03** M. Marinho 300 m A; **04** M. Marinho 300 m B; **05** M. Marinho 500 m A; **06** M. Marinho 500 m B; **07** Meio *Methanogenium* 300 m A; **08** Meio *Methanogenium* 300 m B.; **09 -10** Controle positivo PCR Archaea

Figura 44 - - Dendrograma de distância dos perfis das culturas metanogênicas⁶.

Entretanto, os padrões encontrados para os cultivos não guardaram as mesmas relações observadas para o sedimento, um fato que provavelmente está relacionado aos vieses criados pelas condições de cultivo. No caso dos cultivos de amostras de 300 m em meio *Methanogenium*, os padrões de bandas não apresentaram similaridade com cultivos da mesma amostra em meio marinho, reforçando a observação de que ambos os meios estimulam o crescimento de grupos distintos de arqueias metanogênicas.

Entretanto, o padrão de bandas do meio *Methanogenium* apresentou similaridade muito alta com amostras de 500 m cultivadas em meio marinho, indicando que os grupos estimulados por esse meio são também predominantemente enriquecidos pelo meio marinho a 500 m. Análises da estrutura de comunidade nos demais cultivos em meio *Methanogenium* podem revelar se o meio tende a enriquecer grupos definidos de arqueias metanogênicas, independentemente da origem das amostras, um viés comum aos meios de cultura definidos e ricos, que se tentou evitar ao se adotar o meio marinho, cujas características se aproximam mais das presentes no local da coleta.

⁶ Abreviações: Meth – meio *Methanogenium*; Mar – meio marinho. Os números se referem às isóbatas e as letras às réplicas de cultivo.

6 CONCLUSÕES

6.1 Diversidade microbiana em sedimento marinho costeiro nas enseadas Martel e MacKellar

- O sedimento marinho costeiro é colonizado principalmente por comunidades de microrganismos heterotróficos e psicrófilos;
- não houve variação temporal na diversidade microbiana na amostra próxima a área da estação científica, diferente das outras áreas da Enseada Martel e MacKellar ;
- a alta abundância de Deltaproteobacteria indica que o sedimento marinho da enseada MacKellar é um ambiente propício para o desenvolvimento de organismos relacionados ao ciclo do enxofre;
- a distribuição das comunidades microbianas são mais influenciadas pela distribuição espacial do que a temporal.

6.2 Diversidade microbiana em sedimentos marinhos da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield

- A distribuição das comunidades microbianas não é influenciada pela profundidade ao longo da Baía do Almirantado e na área do Estreito de Bransfield amostrada;
- Segundo os resultados de DGGE, a estrutura de comunidade microbiana da Baía do Almirantado (100 m, 300 m, 500 m) são diferentes das comunidades mais profundas do Estreito de Bransfield (700 m, 1100 m);
- o Estreito de Bransfield é um ambiente mais rico em espécies e diverso do que a Baía do Almirantado.

6.3 Cultivo para enriquecimento de Arqueias metanogênicas presentes nos sedimentos marinhos da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield

- Foi observada a existência de produção biológica de metano nos enrique sedimentos estudados.
- os microrganismos metanogênicos das amostras de sedimento estão melhor adaptados ao crescimento no meio marinho;
- comunidades metanogênicas diferentes crescem nos meios de cultura marinho e o meio *Methanogenium*, segundo os dados de cultivo e DGGE.

REFERÊNCIAS*

- ABSHER, T. M.; BOEHS, G.; FEIJÓ, A. R.; DA CRUZ, A. C. Pelagic larvae of benthic gastropods from shallow Antarctic waters of admiralty bay, King George island. **Polar Biology**, n. 26, p. 359-364, 2003.
- AMANN, R. I.; SLUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.**, n. 59, p. 143–169, 1995.
- BARNS, S. M.; DELWICHE, C. F.; PALMER, J. D.; PACE, N. R. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n. 93, p. 9188–9193, 1996.
- BATTKE, Z. **Admiralty Bay, King George Island**. Map 1: 50000. Institute of Ecology, Polish Academy of Sciences, 1990.
- BEVERIDGE, T. J.; SCHULTZE-LAM, S. The response of selected members of the *Archaea* to the Gram stain. **Microbiology**, n. 142, p. 2887-2895, 1996.
- BIDDLE, J. F.; WHITE, J. R.; TESKE, A. P.; HOUSE, C. H. Metagenomics of the subsurface Brazos-Trinity Basin (IODP site 1320): comparison with other sediment and pyrosequenced metagenomes. **The ISME Journal**, v. 5, p. 1038–47, 2011.
- BIDDLE, J. F. et al. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 103, p. 3846-385, 2006.
- BINLADEN, J.; GILBERT, M. T. P.; BOLLACK, J. P.; PANITZ, F.; BENDIXEN, C.; NIELSEN, R.; WILLERSLEV, E. The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of homolog amplification products by 454 parallel sequencing. **PLoS One**, n. 2, p. 197, 2007.
- BOZAL, N. Characterization of several Psychrobacter strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. and *Psychrobacter fozii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1093–1100, 2003.

* De acordo com:

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

BOWMAN, J. P.; CAVANAGH, J. J.; AUSTIN, K.; SANDERSON, J. Novel Psychrobacter species from Antarctic orni- thogenic soils. **Int. J. Syst. Bacteriol**, n. 46, p. 841–848, 1996.

BOWMAN, J. P.; McCUAIG, R. D. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. **Appl. Environ. Microbiol.**, n. 69, p. 2463–2483, 2003.

BRANDINI, F. P.; REBELO, J. Wind field effect in hydrography and chlorophyll dynamics in the coastal pelagial of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Antarctic Science**, v. 6, n. 4, p. 433-442, 1994.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

BRAUN, M.; GOSSMANN, H. Glacial changes in the areas of Admiralty Bay an Potter Cove, King George Island, Maritime Antarctica. In: BEYER, L.; BOLTER, M. (Ed.). **Geoecology of Antarctic Ice-Free Coastal Landscapes**. Berlin: Springer, n. 75-89, 2002.

BROCHIER, C.; FORTERRE, P.; GRIBALDO, S. An emerging phylogenetic core of Archaea: phylogenies of transcription and translation machineries converge following addition of new genome sequences. **BMC Evolutionary Biology**, n. 5, p. 36, 2005.

BROCHIER-ARMANET, C.; BOUSSAU, B.; GRIBALDO, S.; FORTERRE, P. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, p. 245-252, 2008

CASE, R. J.; BOUCHER, Y.; DAHLLOF, I.; HOLMSTROM, C.; DOOLITTLE, W. F.; KJELLEBERG, S. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Appl. Environ. Microbiol.**, n. 73, p. 278-288, 2007

CARR, S. A.; VOGEL, S. W.; DUNBAR, R. B.; BRANDES, J.; SPEAR, J. R.; LEVY, R.; NAISH, T. R.; POWELL, R. D.; WAKEHAM, S. G.; MANDERNACK, K. W. Bacterial abundance and composition in marine sediments beneath the Ross Ice Shelf, Antarctica. **Geobiology**, v. 11, n. 4, p. 377-395, 2013.

CAVICCHIOLI, R. Archaea – Timeline of the third domain. **Nature Reviews Microbiology**, n. 9, p. 51-61, 2010.

CICERO, D.; TROPEANO, M.; CORIA, S.; CORMACK, W.; MAC, V. A. S. Culturable heterotrophic bacteria from Potter Cove, Antarctica, and their hydrolytic enzymes production, **Polar Research**, n. 1, p. 1–11, 2012.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J. C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 34, p. 121—128, 2000.

CLAESSON, M. J.; O'SULLIVAN, O.; WANG, Q.; NIKKILA, J.; MARCHESI, J. R.; SMIDT, H.; DE VOS, W. M.; ROSS, R. P.; O'TOOLE, P. W. Comparative analysis of pyrosequencing and phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human dental intestine. **PLoS ONE**, v. 4, p. e6669, 2009.

DANOVARO, R. et al.. Deep-Sea Biodiversity in the Mediterranean Sea: The Known, the Unknown, and the Unknowable. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. e11832, 2010.

DANG, H.; ZHU, H.; WANG, J.; LI, T. Extracellular hydrolytic enzyme screening of culturable heterotrophic bacteria from deep-sea sediments of the Southern Okinawa Trough. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 71–79, 2008.

DELONG, E. F.; PACE, N. R. Environmental diversity of bacteria and archaea. **Syst. Biol.**, n. 50. p. 470–478, 2001.

DEMING, J. W.; YAGER, P. L. Natural bacterial assemblages in deep-sea sediments - toward a global view. In: ROWE, G. T.; PARIENTE, V. (Ed.). **Deep-Sea Food Chains and the Global Carbon Cycle**, n. 11-27, 1992.

D'HONDT, S.; RUTHERFORD, S.; SPIVACK, A. J. Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments. **Science**, n. 295, p. 2067–2070, 2002.

DUARTE, R. T. D. Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras, e permafrost polares. Dissertação - Universidade de São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-07102010-153139/>>. Acesso em: 10 out. 2012.

ELKINS, J.G.; PODAR, M.; GRAHAM, D. E.; MAKAROVA, K. S.; WOLF, Y. et al. A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n. 105, p. 8102–81027, 2008.

EUROPEAN SEDIMENT NETWORK. SEDNET. Disponível em: <<http://www.sednet.org/>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

FALKOWSKI, P. G.; FENCHEL, T.; DELONG, E. F. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. **Science**, n. 320, p. 1034-1039, 2008.

FERRY, J. G.; KASTEAD, K. A.; CAVICCHIOLI, R. *Archaea Molecular and Cellular Biology*. **ASM Press**, n.1, p. 288-314, 2007.

FRANZMANN, P. D.; HÖPFL, P.; WEISS, N.; TINDALL, B. J. Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in a lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. **Arch. Microbiology**, n. 156, p. 255–262, 1991.

FRY, J. C.; PARKES, R. J.; CRAGG, B. A.; WEIGHTMAN, A. J.; WEBSTER, G. Prokaryotic biodiversity and activity in the deep subseafloor biosphere. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 66, n. 2, p. 181-196, 2008.

GALAGAN, J. E.; NUSBAUM, C.; ROY, A. The Genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. **Genome Research**, n. 12, p. 532-542, 2002.

GARCIA, J. L.; PATEL, B. K. C.; OLLIVIER, B. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic *Archaea*. **Anaerobe**, n. 6, p. 205-226, 2000.

GOODAY, A. J.; TURLEY, C. M. Responses by benthic organisms to inputs of organic material to the ocean floor: a review. **Phil Trans R Soc Lond A**, n. 331, p. 119–138, 1990.

GUY L, ETTEMA, T. J. G. The archaeal “TACK” superphylum and the origin of eukaryotes. **Trends Microbiol.**, n. 19, p. 580–587, 2011.

HAMDAN, L. J.; SIKAROODI, M.; GILLEVET, P. M. Bacterial community composition and diversity in methane charged sediments revealed by multitag pyrosequencing. **Geomicrobiology Journal**, n. 29 p. 340-351, 2012.

HAUSDORF, B. Progress toward a general species concept. **Evolution**, v. 65, p. 923-93, 2011.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of Ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microb. Ecol.**, v. 35, n. 1, p. 1-21, 1998.

HUBER, H.; HOHN, M. J.; RACHEL, R.; FUCHS, T.; WIMMER, V. C.; STETTER, K. O. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. **Nature**, n. 417, p. 63-67, 2002.

HUSE, S. M.; DETHLEFSEN, L.; HUBER, J. A.; WELCH, D. M.; RELMAN, D. A.; et al., Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. **PLoS Genet.**, v. 4, n. 11, e1000255, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIA E TECNOLOGIA DA CRIOSFERA. INCT DA CRIOSFERA. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/inctcriosfera/>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS INPE. Disponível em: <<http://antartica.cptec.inpe.br/>>. Acesso em: 14 jan. 2014.

IVANOVA, E. P.; ZHUKOVA, N. V.; LYSENKO, A. M.; GORSHKOVA, N. M.; SERGEEV, A. F.; MIKHAILOV, V. V.; BOWMAN, J. P. *Loktanella agnita* sp. nov. and *Loktanella rosea* sp. nov., from the north-west Pacific Ocean. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, n. 55, p. 2203–2207, 2005.

JAZDEZWSKI, K.; JURASZ, W.; KITTEL, W.; PRESTER, E.; PRESTER, P.; SICINSKI, J. Abundance and biomass estimates of the benthic fauna in Admiralty Bay, King George Island, South Shetland Island. **Polar Biol.**, n. 6, p. 5-16, 1986.

JIN, H. M.; LEE, H. J.; KIM, J. M.; PARK, M. S.; LEE, K.; JEON, C. O. *Litorimicrobium taeanense* gen. nov., sp. nov., isolated from a sandy beach. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 61, pt. 6, p. 1392–1396, 2011.

JONASSON, J.; OLOFSSON, M.; MONSTEIN, H. J. Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments. **APMIS**, v. 110, p. 263-272, 2002.

JORGENSEN, L. S.; HANNISDAL, B. et al. Correlating microbial community profiles with geochemical data in highly stratified sediments from the Arctic Mid-Ocean Ridge. **PNAS**, v. 10, p. 1-10, 2012.

JUNG, M. Y.; SHIN, K. S.; KIM, S.; KIM, S. J.; PARK, S. J.; KIM, J. G.; RHEE, S. K. *Hoeflea halophila* sp. nov., a novel bacterium isolated from marine sediment of the East Sea, Korea. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 5, p. 971–978, 2013.

KALLMEYER, J.; POCKALNY, R.; ADHIKARI, R. R.; SMITH, D. C.; D'HONDT S. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 109, n. 40, p. 16213–16216, 2012.

KÄMPFER, P.; GLAESER, S. P. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era – the polyphasci approach revisited. **Environmental Microbiology**, v. 14, p. 291-317, 2012.

KATO, C.; YANAGIBAYASHI, M.; NOGI, Y.; LI, L.; HORIKOSHI, K. Changes in the microbial community in the deep-sea sediment during cultivation without decompression, p. in press. In: LUDWIG, H. (Ed.). **High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology**. Heiderberg, Germany: Springer-Verlag, 1999.

KEJNA, M. Air temperature on King George Island, South Shetland Islands, Antarctica. **Polish Polar Research**. n. 20, p. 183-201, 1999.

KENDALL, M.; WARDLAW, G.; TANG, CH.; BONIN, A.; LUI, Y.; VALENTINE, D. Diversity of *Archaea* in marine sediments from Skan Bay, Alaska, including cultivated

methanogens, and description of *Methanogenium boonei* sp. nov. **Appl Environ Microbiol.**, n. 73, p. 407-414, 2006.

KIRCHMAN, D. L.; COTTRELL, M. T.; LOVEJOY, C. The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes. **Environ. Microbiol.**, v. 12, p. 1132-1143, 2010.

KLENK, H. P.; GARRET, R.; SCHLEPER, C. *Archaea: Evolution, physiology and molecular biology*. **Blackwell Publishing**, n. 1, p. 39-40, 2007.

KLETZIN, A. General characteristics and important model organisms. In: CAVICCHIOLI, R. (Ed.). **Archaea: molecular and cellular biology**. Washington, DC: ASM, 2007. p. 14–92.

KLETZIN, A.; CAVICCHIOLI, R. *Archaea molecular and cellular biology*. **ASM Press**, n. 1, p. 14-15, 2007.

KOZUBAL, M. A.; ROMINE, M., et al. 2013. Geoarchaeota: a new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park. **ISME J.**, n. 7, p. 622–634, 2013

KONNEKE, 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**, n. 437, p. 543–546, 2005.

KONSTANTINIDIS, K. T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J. M. The bacterial species definition in the genomic era. **Philosophical Transactions of the Royal Society B.: Biological Sciences**, v. 361, p. 1929-1940, 2006.

KOSTKA, J. E.; THAMDRUP, B.; GLUD, R. N.; CANFIELD, D. E. Rates and pathways of carbon oxidation in permanently cold Arctic sediments. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, n. 180, p. 7–21, 1999.

KOURIDAKI, I.; POLYMENAKOU, P. N.; TSELEPIDES, A.; MANDALAKIS, M.; SMITH JR, K. L. Phylogenetic diversity of sediment bacteria from the deep Northeastern Pacific Ocean: a comparison with the deep Eastern Mediterranean Sea. **Int. Microbiol.**, n. 13, p. 143-150, 2010.

LAU, S. C. K.; TSOI, M. M. Y.; LI, X.; PLAKHOTNIKOVA, I.; WU, M.; WONG, P. K.; QIAN, P. Y. *Loktanella hongkongensis* sp. nov., a novel member of the α -Proteobacteria originating from marine biofilms in Hong Kong waters. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, n. 54, p. 2281–2284, 2004.

LAURO, F. M.; BERTOLONI, G.; OBRAZTSOVA, A.; KATO, C.; TEBO, B. M.; BARTLETT, D. H. Pressure effects on *Clostridium* strains isolated from a cold deep-sea environment. **Extremophiles**, n. 8, p. 169-173, 2004.

LAURO, F. M.; CHASTAIN, R. A.; BLANKENSHIP, L. E.; YAYANOS, A. A.; BARTLETT, D. H. The unique 16S rRNA genes of piezophiles reflect both phylogeny and adaptation. **Appl. Environ. Microbiol.**, n. 73, p. 835-845, 2007.

LEE, O. O.; WANG, Y.; YANG, J.; LAFI, F.F.; AL-SUWAILEM, A.; QUIAN, P. Y. Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea. **ISME J.**, n. 5, p. 650–664, 2011.

LEE, Y. K.; JUNG, H. J.; LEE, H. K. Marine bacteria associated with the Korean brown alga, *Undaria pinnatifida*. **Journal of Microbiology (Seoul, Korea)**, v. 44, n. 6, p. 694–708, 2006.

LI, H.; YU, Y.; LUO, W.; ZENG, Y.; CHEN, B. Bacterial diversity in surface sediments from the Pacific Arctic Ocean. **Extremophiles: life under extreme conditions**, n. 13, p. 233–246, 2009.

LI, L. N.; KATO, C.; HORIKOSHI K. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. **Biodiversity and Conservation**, n. 8, p. 659-677, 1999.

LI, Y. X.; LI, F. C.; ZHANG, X. W.; QIN, S.; ZENG, Z. G.; DANG, H. Y. Vertical distribution of bacterial and archaeal communities along discrete layers of a deep-sea cold sediment sample at the East Pacific Rise (~13°N). **Extremophiles**, n. 12, p. 573-585, 2008.

LIPSKI, M. Variations of physical conditions, nutrient and chlorophyll a contents in Admiralty Bay (King George Island, South Shetland Islands, 1979). **Pol. Polar Res.**, v. 8, p. 307-332, 1987.

LO-GIUDICE, A.; CARUSO, C.; MANGANO, S.; BRUNI, V.; DE DOMENICO, M.; MICHAUD, L. Marine bacterioplankton diversity and community composition in an antarctic coastal environment. **Microbial. Ecology**, v. 63, n. 1, p. 210–223, 2012.

LYRA, C.; SINKKO, H.; RANTANEN, M.; PAULIN, L.; KOTILAINEN, A. Sediment bacterial communities reflect the history of a sea basin. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, e54326, 2013.

MACEK, M.; MERCIER, B.; MACKOVÁ, A.; MILLER, P. W.; HAMOSH, A.; FÉREC, C.; CUTTING, G. R. Sensitivity of the denaturing gradient gel electrophoresis technique in detection of known mutations and novel Asian mutations in the *CFTR* gene. **Human Mutation**, v. 9, p. 136-147, 1997.

MASSANA, R.; MURRAY, A. E.; PRESTON, C. M.; DELONG, E. F. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel. **Appl. Environ. Microbiol.**, n. 63, p. 50–56, 1997.

MCINERNEY, J. O.; COTTON, J. A.; PISANI, D. The prokaryotic tree of life: past, present... and future? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 23, p. 276-281, 2008.

MILLS, H. J.; REESE, B. K.; PETER, C. S. Characterization of microbial population shifts during sample storage. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 40-56. 2012

MONTES-HUGO, M. A.; DONEY, S C.; DUCKLOW, H. W.; FRASER, W.; MARTINSON, D.; STAMMERJOHN, S E.; SCHOFIELD, O. Recent changes in Phytoplankton Communities associated with rapid regional climate change along the western Antarctic Peninsula. **Science**, n. 323, p. 1470-1473, 2009.

MORAN, M. A.; W. L. MILLER. Resourceful heterotrophs make the most of light in the coastal ocean. **Nat. Rev. Microbiol.**, n. 5, p. 792–800, 2007.

MUYZER, G.; DE WALL, E. C.; UITTERLIDEN, A. C. Profiling of complex microbial populations by denaturing gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; RAMSING, N. B. Molecular methods to study the organization of microbial communities. **Water Science and Technology**, v. 32, p. 1-9, 1995.

MYRES, R. M.; FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v. 13, p. 3131-3146, 1985.

NAKAYAMA, C. R. **Degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP), 2,3,4-triclorofenol (2,3,4-TCP) e 2,6-diclorofenol (2,6-DCP) por culturas enriquecidas a partir de sedimento contaminado do Sistema Estuarino Santos e São Vicente**. 2005. 162 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

NEDZAREK, A.; RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. Decomposition of macro- algae and the release of nutrients in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Polar Biosci.**, n. 17, p. 16–35, 2004.

NEWBERRY, C. J.; WEBSTER, G.; CRAGG, B. A.; PARKES, R. J.; WEIGHTMAN, A. J.; FRY, J. C. Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190. **Environ. Microbiol.**, n. 6, p. 274–287, 2004.

NUNOURA, T.; TAKAKI, Y.; KAZAMA, H.; HIRAI, M.; ASHI, J.; IMACHI, H.; TAKAI, K. Microbial diversity in deep-sea methane seep sediments presented by SSU rRNA Gene tag sequencing. **Microbes and Environments**, v. 27, n. 4, p. 382-390, 2009.

NUNOURA, T.; TAKAKI, Y.; KAKUTA, J.; NISHI, S.; SUGAHARA, J.; et al. Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. **Nucleic Acids Res.**, n. 39, p. 3204–3223, 2011.

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**, n. 5, p. 787-797, 2003.

OFFRE, P.; SPANG, A.; SCHELPER, C. Archaea in biogeochemical cycles. **Annual Review of Microbiology**, n. 67, p. 437–457. 2013.

OGUNSEITAN, A. The concept of microbial species. In: OGUNSEITAN, A. (Ed.) **Microbial diversity: form and function in Prokaryotes**. Malden: Blackwell Science Ltd, 2007, p. 3-21.

ORPHAN, V.J. et al. Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, n. 67, p. 1922-1934, 2001.

PEREVALOVA, A. A. et al. *Fervidicoccus fontis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic crenarchaeote from terrestrial hot springs, and proposal of Fervidococcaceae fam. nov. and Fervidococcales ord. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, n. 60, p. 2082–2088, 2010.

PARKES, R. J.; CRAGG, B. A.; BALE, S. J.; GETLIFF, J. M.; GOODMAN, K.; ROCHELLE, P. A.; FRY, J. C.; WEIGHTMAN, A. J.; HARVEY, S. M. Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. **Nature**, n. 371, p. 410–413, 1994.

PIZA, F. F. **Ecologia molecular microbiana associada a sedimentos do estuário São Vicente – Santos (SP- Brasil)**. 2004. 106 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biología, Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2004.

Porat, I., Vishnivetskaya, T. A., et al. Characterization of archaeal community in contaminated and uncontaminated surface stream sediments, **Microbial Ecology**, v. 60, p. 784–795. 2010

PROKOFEVA, M. I. et al. Isolation of the anaerobic thermoacidophilic crenarchaeote *Acidilobus saccharovorans* sp. nov. and proposal of Acidilobales ord. nov., including

Acidilobaceae fam. nov. and Caldisphaeraceae fam. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, n. 59, p. 3116–3122, 2009.

PRUSZAK, Z. Currents circulation in the waters of Admiralty Bay (region of *Arctowski* Station of King George Island). **Pol. Polar Res.**, n. 1, p. 55-74, 1980.

RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. Environmental conditions and the functioning of Admiralty Bay (South Shetland Islands) as a part of the near shore Antarctic Ecosystem. **Pol. Polar Res.**, v. 1, p. 11-27, 1980.

RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. Proceedings of the NPR. Symposium on Polar Biology. **National Institute of Polar Research of Tokyo**, n. 8, p. 101-113, 1995.

RAVENSCHLAG, K.; SAHM, K.; PERNTHALER, J.; AMANN, R. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, n. 65, p. 3982–3989, 1999.

RIBEIRO, A. P. et al. Arsenic and trace metal contents in sediment profiles from the Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, n. 621, p. 192–196, 2011.

ROBAKIEWICZ, M.; RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. Application of #D circulation model to Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Pol. Polar Res.**, v. 20, p. 43-58, 1999.

ROBERTSON, C. E.; HARRIS, J. K.; SPEAR, J. R.; PACE, N. R. Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. **Curr. Opin. Microbiol.**, n. 8, p. 638-642, 2005.

ROCHE. 454 Sequencing System Guidelines for Amplicon Experimental Design, 2011.

RODRIGUES, A. R. **Estudo das associações de foraminíferos bentônicos recentes na Baía do Almirantado (Ilha Rei George, Antártica) durante três verões austrais consecutivos**. 2008. 152 f. Tese (Doutorado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 2008.

ROESCH, L. F. W.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A. K. M.; KENT, A. D.; DAROUB, S. H.; CAMARGO, F. A. O.; FARMERIE, W. G.; TRIPLETT, E. W. Pyrosequencing enumerates and contrast soil microbial diversity. **The ISME Journal**, v. 1, p. 283-290, 2007.

RONAGHI, M.; KARAMOHAMED, S.; PETTERSSON, B.; UHLÉN, M.; NYRÉN, P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. **Anal. Biochem.**, n. 242, p. 84–89, 1996.

RONAGHI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome Res.**, v. 11, n. 1, p. 3–1, 2001.

ROSSELLÓ-MORA, R. Towards a taxonomy of Bacteria and Archaea based on interactive and accumulative data repositories. **Environmental Microbiology**, v. 14, p. 318-334, 2012.

RUFF, S. E.; ARNDS, J.; KNITTEL, K.; AMANN, R.; WEGENER, G.; RAMETTE, A.; BOETIUS, A. Microbial communities of deep-sea methane seeps at Hikurangi continental margin (New Zealand). **PloS One**, n. 8, v. 9, e72627, 2013.

RYSGAARD, S.; THAMDRUP, B.; RISGAARD-PETERSEN, N.; FOSSING, H.; BERG, P.; CHRISTENSEN, P. B.; DALSGAARD, T. Seasonal carbon and nutrient mineralization in a high-Arctic coastal marine sediment, Young Sound, Northeast Greenland. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 175, p. 261–276, 1999.

SAIA, F.; DOMINGUES, M.; PELLIZARI, V.; VAZOLLER, R. Occurrence of Methanogenic Archaea in Highly Polluted Sediments of Tropical Santos–São Vicente Estuary (São Paulo, Brazil). **Current Microbiology**, n. 60, p. 66-70, 2010.

SCHAEFER, C. E. G. R.; DIAS, L. E.; CAMPOS, L. S.; ALBUQUERQUE-FILHO M. R.; COSTA, L. M.; BORGES-JÚNIOR, M. Monitoramento ambiental em sedimentos costeiros da Baía do Almirantado: granulometria, teores de macronutrientes e metais biodisponíveis. In: SCHAEFER, C. E. G. R.; FRANCELINO, M. R.; SIMAS, F. N. B.; ALBUQUERQUE-FILHO, M. R. (Ed.). **Ecosistemas costeiros e monitoramento ambiental da Antártica Marítima, Baía do Almirantado, Ilha Rei George**. Viçosa: NEPUT Universidade Federal de Viçosa, 2004. 192 p.

SCHAUER, R.; BIENHOLD, C.; RAMETTE, A.; HARDER, J. Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean. **Isme Journal**, n. 4, p. 159-170, 2010.

SCHLEIFER, K. H. Classification of Bateria and Archaea: past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, p. 533-542, 2009.

SCHLEPER, C.; JURGENS, G.; JONUSCHEIT M. Genomic studies of uncultivated archaea. **Nat. Rev. Microbiol.**, n. 3, p. 479–88, 2005.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SCHLOSS, P.D., et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Appl. Environ. Microbiol.**, n. 75, v. 23, p.7537-41, 2009.

SHEFFIELD, V. C.; COX, D. R.; LERMAN, L. S.; MYERS, R. M. Attachment of a 40-base-pair G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 86, p. 232-236, 1989.

STAHL, D. A.; DE LA TORRE J. R. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. **Annu. Rev. Microbiol.**, n. 66, p. 83–101, 2012.

SEIBOLD, E.; BERGER, W. **The sea floor**: an introduction to marine geology. New York: Springer Verlag, 1982. 288 p.

SOGIN, M. L. et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 32, 2006.

STEVENS, H.; ULLOA, O. Bacterial diversity in the oxygen minimum zone of the eastern tropical South Pacific. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1244–1259, 2008.

SZAFRANSKI, Z.; LIPSKI, M. Characteristics of water temperature and salinity at Admiralty Bay (King George Island, South Shetland Islands, Antarctic) during austral summer 1978/1979. **Pol Polar Res.**, v. 3, p. 7-24, 1982.

TESKE, A.; DURBIN, A.; ZIERVOGEL, K.; COX, C.; ARNOSTI, C. Microbial community composition and function in permanently cold seawater and sediments from an Arctic fjord of Svalbard. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 77, p. 2008–2018, 2011.

TESKE, A.; SØRENSEN, K. B. Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: Have we caught them all? **ISME**, n. 2, p. 3-18, 2008.

TIAN, F. et al. Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity in Arctic sediment as revealed by 16S rRNA and 18S rRNA gene clone libraries analysis. **Polar Biology**, n. 32, p. 93-103. 2009.

VAN-TRAPPEN, S.; MERGAERT, J.; SWINGS, J. Loktanella salsilacus gen. nov., sp. nov., Loktanella fryxellensis sp. nov. and Loktanella vestfoldensis sp. nov., new members of the Rhodobacter group, isolated from microbial mats in Antarctic lakes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, n. 54, 1263–1269, 2004.

VOLLMERS, J.; VOGET, S.; DIETRICH, S.; GOLLNOW, K.; SMITS, M.; MEYER, K.; DANIEL, R. Poles apart: Arctic and Antarctic Octadecabacter strains share high genome plasticity and a new type of xanthorhodopsin. **PloS One**, v. 8, n. 5, e63422, 2013.

WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, v. 3, n. 345, p. 63-65, 1990.

- WHITMAN, W.B., et al. Prokaryotes: the unseen majority. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n. 95, p. 6578–6583, 1998.
- WILKINS, D.; LAURO, F. M.; WILLIAMS, T. J.; DEMAERE, M. Z.; BROWN, M. V.; HOFFMAN, J. M.; CAVICCHIOLI, R. Biogeographic partitioning of Southern Ocean microorganisms revealed by metagenomics. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 1318–1333, 2013.
- WILLIAMS, K. P., et al. Phylogeny of gammaproteobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 9, p. 2305–2314, 2010.
- WOESE, C.; CAVICCHIOLI, R. *Archaea* molecular and cellular biology. **ASM Press**, n. 1, p. 1-13, 2007.
- WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION. **Scientific Assessment of Ozone Depletion**: 1998. Global Ozone and Research And Monitoring Project Report 44, Geneva, 1999.
- WUEBBLES, D. J.; HAYHOE, K. Atmospheric methane and global change. **Earth-Science Reviews**, n. 57, p. 177-210, 2002.
- WUCHTER, C., et al. Archaeal nitrification in the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 103, p. 12317-12322, 2006.
- ZENG, Y.; ZOU, Y.; CHEN, B.; GREBMEIER, J. M.; LI, H.; YU, Y.; ZHENG, T. Phylogenetic diversity of sediment bacteria in the northern Bering Sea. **Polar Biology**, v. 34, n. 6, p. 907–919, 2011.
- ZINGER, L.; AMARAL-ZETTLER, L. A.; FUHRMAN, J. A.; HORNER-DEVINE, M. C.; HUSE, S. M.; WELCH, D. B. M.; MARTINY, B. H. J.; SOGIN, M.; BOETIUS, A.; RAMETTE, A. Global Patterns of Bacterial Beta-Diversity in Seafloor and Seawater Ecosystems. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24570, 2011.
- ZIELINSKI, K. Bottom macro-algae of Admiralty Bay (King George Island, South Shetland Islands, Antarctic). **Pol. Polar. Res.**, n. 11, p. 95–131, 1990.
- ZHU, D.; TANABE, S. H.; YANG, C.; ZHANG, W.; SUN, J. Bacterial community composition of South China Sea sediments through pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. **PloS One**, v. 8, n. 10, p. e78501, 2013.
- ZHOU, M. Y.; WANG, G. L.; LI, D.; ZHAO, D. L.; QIN, Q.L.; CHEN, X. L.; ZHANG, Y. Z. Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and bacterial extracellular proteases in the coastal sediments of King George Island, Antarctica. **PloS One**, v. 8, n. 11, p. e79668, 2013.

ANEXOS

ANEXO A - Valores de Granulometria das amostras de sedimento marinho costeiro

	> 0,5 mm (%)	areia (%)	silte (%)	argila (%)
BP 2007	8,9	18,8	40,4	31,9
BP 2010	8,84	40,74	42,02	8,41
BP 2012	9,67	15,64	35,38	39,31
CF 2007	5,0	63,8	16,5	14,7
CF 2010	3,25	57,31	31,02	8,42
CF 2012	0,16	15,36	38,4	46,08
PU 2007	1,8	13,8	38,5	45,8
PU 2010	43,28	32,89	20,26	3,57
PU2012	0,11	13,6	35,53	50,76
R2 2007	ND [†]	ND	ND	ND
R2 2010	28,52	29,46	33,99	8,02
R2 2012	3,95	30,39	28,14	37,52

[†] ND – Não Determinado

ANEXO B - Parâmetros físico-químicos dos sedimentos da Baía do Almirantado e do Estreito de Bransfield

	CPE	areia	silte	argila	(silte+argila)	Curtose	Clorofila	Feopigmentos	cloro/feo	MO	C/N	Carbonato	Carbono total	Nitrogênio total
100m-1	42,93	0,00	48,93	51,07	100,00	0,92	1,25	41,68	0,03	3,09	7,15	17,46	0,56	0,07
100m-2	49,22	1,13	53,13	45,74	98,87	0,85	4,13	45,09	0,11	2,41	3,62	16,61	0,25	0,07
100m-3	84,87	0,10	43,52	56,38	99,90	1,02	0,34	84,53	0,00	5,10	6,46	19,31	0,83	0,12
300m-1	58,34	9,28	57,38	33,35	90,72	0,72	2,54	55,80	0,05	2,91	4,10	14,93	0,30	0,08
300m-2	55,48	29,57	45,35	25,09	70,43	0,60	3,82	51,66	0,08	2,72	7,96	14,38	0,40	0,05
300m-3	62,47	1,64	57,06	41,30	98,36	0,67	3,95	58,52	0,08	3,94	4,36	14,47	0,25	0,06
500m-1	58,32	2,27	51,52	46,21	97,73	0,89	5,83	52,50	0,11	2,90	3,40	14,33	0,21	0,06
500m-2	60,34	2,74	50,80	46,46	97,26	0,79	0,17	60,17	0,00	3,65	5,53	17,52	0,43	0,08
500m-3	51,17	1,54	39,11	59,35	98,46	1,30	8,25	42,92	0,20	2,70	6,27	12,23	0,35	0,06
700m-1	31,15	10,17	58,23	31,60	89,83	0,66	4,58	26,57	0,17	2,85	8,96	13,74	0,51	0,06
700m-2	49,91	20,62	56,20	23,17	79,38	0,66	1,90	48,01	0,04	2,61	6,64	13,19	0,40	0,06
700m-3	49,59	6,61	64,94	28,45	93,39	0,72	0,37	49,22	0,01	3,49	6,31	16,73	0,44	0,07
1100m-1	64,72	16,16	55,50	28,35	83,84	0,64	0,31	64,41	0,01	6,03	8,69	16,51	0,70	0,08
1100m-2	46,51	17,79	56,85	25,36	82,21	0,64	0,00	46,51	0,00	3,53	7,98	15,30	0,63	0,08
1100m-3	44,45	20,30	54,48	25,22	79,70	0,64	0,00	44,45	0,00	3,37	8,69	16,21	0,62	0,07