RUBENS TADEU DELGADO DUARTE

**MICRO-ORGANISMOS EM AMBIENTES CRIOGÊNICOS:
GELO GLACIAL, SOLOS EXPOSTOS POR RECUO DE
GELEIRAS, E *PERMAFROST* POLARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da USP / Instituto Butantan / IPT, para obtenção para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2010

RUBENS TADEU DELGADO DUARTE

**MICRO-ORGANISMOS EM AMBIENTES CRIOGÊNICOS:
GELO GLACIAL, SOLOS EXPOSTOS POR RECUO DE
GELEIRAS, E *PERMAFROST* POLARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da USP / Instituto Butantan / IPT, para obtenção para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração:
Biotecnologia

Orientador:
Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari

São Paulo
2010

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

© reprodução total

Duarte, Rubens Tadeu Delgado.

Micro-organismos em ambientes criogênicos : gelo glacial, solos
expostos por recuo de geleiras e permafrost polares / Rubens Tadeu
Delgado Duarte. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Vivian Helena Pellizari.

Tese (Doutorado) – 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: Microbiologia ambiental.

Versão do título para o inglês: Microorganisms in cryogenic
environments: glacial ice, soils exposed by glacier retreats and polar
permafrosts.

Descritores: 1. Geleiras - Antartica 2. Microbiologia ambiental
3. Permafrost 4. RNA ribossomal 5. Filogenia 6. Aquecimento global
I. Pellizari, 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/SBIB093/2010

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

Candidato(a): Rubens Tadeu Delgado Duarte.

Título da Tese: Micro-organismos em ambientes criogênicos : gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras e permafrost polares.

Orientador(a): Vivian Helena Pellizari.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

*Aos meus pais **Rubens e Inês**,
que sempre investiram em minha formação
com carinho, amor, e paciência.*

*À **Thatiza Curuci**, por todo o amor
e ao meu querido filho **Yuri C. Duarte**.*

AGRADECIMENTOS

Os momentos vividos no laboratório constituíram, antes de tudo, o maior e mais importante experimento que já realizei. A formação acadêmica, desde os tempos de graduação, estimulou o meu fascínio pelo exercício de se perder e se encontrar nos labirintos de um pensamento complexo. Neste sentido, os momentos que transporam no laboratório desvendaram-me becos, ruelas e esquinas nos quais vislumbrei aquilo que unicamente o conhecer efetivo pode proporcionar, ou seja, não o debruçar-se sobre o que convém conhecer, legitimando o saber que já possuímos, mas separar-se de si nos descaminhos em que nos perdemos de nós mesmos e ousamos pensar diferente do que comumente pensamos. No entanto, possuir esse tipo de curiosidade e embebedar-se com a alegria dela, são experiências para as quais eu jamais despertaria se certos flancos não tivessem sido abertos. Explicita-se, assim, a imensa relevância dos resultados obtidos em tal experimento. Desta forma, faço questão de declarar meus agradecimentos:

Ao BRASIL e ao Povo Brasileiro, que com muito suor sustentam a ciência nacional.

À Universidade de São Paulo, pela oportunidade e pela formação recebida.

À Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari, amiga e orientadora deste trabalho, por todo o apoio, a dedicação, o incentivo e pelos valiosos conhecimentos transmitidos em todos esses anos.

Ao pesquisador Dr. James Tiedje, da Universidade Estadual de Michigan; ao professor Dr. Heitor Evangelista da Silva, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro; Dr. Jefferson Cardia Simões, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; e ao Dr. Artur Silva, da Universidade Federal do Pará, por toda contribuição na realização dos experimentos e pelas sugestões relevantes à conclusão dos experimentos.

Aos Profs. Dr. David Abramovich Gilichinsky, Dra. Elizaveta Rivkina, e Dra. Elena Spirina, do Instituto de Problemas Físico-químicos e Biológicos do Solo, Academia de Ciências da Rússia, pela oportunidade de realizar os experimentos com as amostras de permafrost, pela orientação recebida, e pela agradável convivência durante o período que trabalhamos juntos.

Aos professores Dr. Ederson Jesus, da Universidade Federal do Pará; Prof. Luiz Roesch, da Universidade Federal do Pampa, e em especial à Profa. Cristine Barreto, da Universidade Católica de Brasília, por toda a ajuda na condução e nas análises dos experimentos.

Aos eternos amigos do Laboratório de Ecologia de Micro-organismos: Ana Carolina, Ana Cláudia, Ana Lúcia, André, Cristina Nakayama, Daniella, Débora, Diego, Ema, Fabiana, Flávia, Juliana, Priscila, Sandra e Simone, pela agradável convivência, pelos difíceis momentos compartilhados durante a condução dos experimentos (foram muitos), pelo auxílio e sugestões críticas dos resultados, e claro, pelas "discussões filosófico-culturais".

Aos amigos muito especiais do Laboratório de Criosolos: Anastasia Shatilovich, Galina Hohlova, Kirill Krivushin, Lyubov Shmakova, Nikita Demidov e Vasily Mironov, pela hospitalidade, pelo convívio e pela genuína amizade durante os adoráveis e gelados 3 meses que convivemos na cidade de Pushchino, Rússia. Спасибо за все!

Com carinho especial à Rosa Gamba, pelas inúmeras ajudas no laboratório, pela amizade e por cada mol de fosfato consumido durante nossas agradáveis conversas.

À CAPES pela bolsa concedida durante o doutorado, ao CNPq pela bolsa sanduíche, ao MCT/MMA/SECIRM pelo financiamento e apoio à pesquisa Antártica Brasileira.

Aos meus amigos e familiares, por toda a ajuda, compreensão, paciência e incentivo recebido ao longo desses anos.

À Thatiza Curuci, pelos dias vividos, pelos dias sonhados e por tudo que me representa. Como diria Carl Sagan, "Diante da vastidão do tempo e da imensidão do espaço, é uma alegria para eu compartilhar uma época e um planeta com você."

Meus sinceros agradecimentos.

*"Coloque seus ideais nas estrelas,
mesmo que você não consiga
alcançar a metade do caminho."*

Tolstoi

RESUMO

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

O efeito de alterações climáticas sobre os micro-organismos ainda é incerto, pois pouco se conhece sobre as espécies que habitam regiões extremas como o gelo, solo antártico, e o solo permanentemente congelado (*permafrost*). O *permafrost* tem como característica a preservação de material biológico por milhões de anos, servindo como fonte para estudos de evolução e biogeografia de micro-organismos. O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade microbiana em amostras de gelo, solo exposto por recuo de geleira e *permafrost* polares, e a diversidade funcional do gene alceno monooxigenase (*alk*). Métodos independentes de cultivo baseados no gene 16S rRNA foram utilizados, como DGGE, clonagem e pirosequenciamento. As geleiras da Ilha Rei George (Península Antártica) e do Pólo Sul Geográfico possuem cerca de 3.10^4 cél./mL e são compostas por micro-organismos diferentes, com predominância dos Filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Cyanobacteria, muitos dos quais já descritos em outros ambientes criogênicos. O solo em frente à geleira Baranowski apresenta uma estrutura de comunidade diferente do gelo. O solo exposto por recuo de geleira apresenta uma sucessão ecológica, com predominância de heterotróficas durante todo o processo. Fixadores de nitrogênio no solo foram compostos por cianobactérias no início, e por *Rhodopseudomonas* e *Rhodobacter* no final da sucessão. Estes resultados foram melhor observados com o pirosequenciamento. As mudanças observadas podem estar relacionadas ao aumento de K, Mg^+ , NH_4^+ , NO_3^- e/ou CO_2 detectados após 15-20 anos de exposição do solo. A comunidade de *permafrosts* varia com o local e a idade de congelamento (de 5.000 a 8 milhões de anos). O gene *alkM* foi detectado em *permafrosts* do Ártico com 3 milhões de anos, e o gene *alkB* em amostras do Ártico com 15.000 e 120.000 anos, e em solos modernos da Antártica. Alguns clones indicam que podem representar novos genes para alceno monooxigenases. As contribuições deste projeto abrangem os objetivos do Ano Polar Internacional (IPY 2007-2009), sobretudo na avaliação da ecologia microbiana da Antártica.

Palavras chave: Antártica. Diversidade microbiana. Recuo de geleiras. Permafrost. Alcano monooxigenase.

ABSTRACT

DUARTE, R. T. D. **Microorganisms in cryogenic environments: glacial ice, soils exposed by glacier retreat, and polar *permafrosts***. 2010. 201 p. PhD. Thesis (Biotechnology). Institute of Biomedic Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. 2010.

The effect of climate changes on microorganisms is still unclear, because little is known about the species that inhabit the extreme regions as the glacial ice, antarctic soils and the permanently frozen soil (permafrost). The permafrost is able to preserve the sedimented biological materials by thousands or even millions of years, being an important source for microbiological studies. The objective was to study the microbial diversity in cryogenic samples: glacial ice, soil exposed by glacial retreat and polar permafrosts, as well as to study the functional diversity of alkane monooxygenase genes (*alk*) in the permafrost. Cultivation-independent methods based on the 16S rRNA gene were used, as DGGE, clone library and 454 Pyrosequencing. Analysis of the King George Island (Antarctic Peninsula) glaciers and the South Pole ice revealed about 3×10^4 cells/mL each, and different micro-organisms were detected, predominantly members from Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes and Cyanobacteria, many of which already described in other cryogenic environments. The soil in front of the Baranowski Glacier has a different community structure compared with the ice. Soils exposed by glacier retreat revealed an ecological succession, and heterotrophic bacteria occurred all through the process. Nitrogen-fixing populations were composed by cyanobacteria at the early stages, and shifted to *Rhodopseudomonas* and *Rhodobacter* in the older soils. The observed changes may be related to an increase of K, Mg^+ , NH_4^+ , NO_3^- and/or CO_2 , detected after 15-20 years of soil exposure. The community of permafrosts varies by location and age (5,000 - 8 millions of years). The *alkM* gene was detected in old Arctic permafrosts (3 millions of years), while *alkB* genes were found on Arctic samples from 15,000 to 120,000 years, and in Antarctic modern soils. Some of these clones may represent new *alk* genes. The contributions of this project covers the goals of the International Polar Year (IPY 2007-2009), particularly in assessing the microbial ecology of Antarctica.

Key words: Antarctica. Microbial diversity. Glacial retreat. Glacier. Permafrost. Alkane monooxygenases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração do ambiente resultado do recuo de geleiras..	36
Figura 2 - Variações nas médias anuais de temperatura na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica.....	38
Figura 3 - Área de retração das frentes de geleira da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica.....	39
Figura 4 - Frequência e identificação de genes de alceno monoxigenase obtidos através de biblioteca de genes <i>alk</i> nas amostras de sedimento marinho da Ilha Rei George, Antártica..	43
Figura 5 - Organograma da metodologia empregada no estudo da diversidade microbiana das amostras de gelo de geleiras.	50
Figura 6 - Mapa da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica, indicando os pontos de coleta das amostras de gelo.....	52
Figura 7 - Fotografias do procedimento de coleta de amostras de gelo na Antártica.	53
Figura 8 - Testemunhos de gelo coletados pelo Prof. Dr. Jefferson Simões (NUPAC/UFRGS) durante a 1º Travessia Brasileira na Antártica..	53
Figura 9 - Organograma da metodologia empregada no estudo dos solos expostos por recuo de geleira.....	59
Figura 10 - Mapa da área de solo exposto por recuo da geleira Baranowski, indicando os pontos de coleta (amostras BAS).....	60
Figura 11 - Organograma da metodologia empregada no estudo da diversidade filogenética e funcional das amostras de <i>permafrost</i>	69

Figura 12 - A) Ilha Rei George, indicando o ponto de amostragem (★); B) <i>Drill</i> seco utilizado na coleta; C) Amostra de <i>permafrost</i> ; D) Assepsia da amostra recém coletada.	72
Figura 13 - Análise por microscopia de fluorescência das amostras de gelo da Geleira Baranowski (B) e do Pólo Sul Geográfico (PSG), coradas com DAPI (B1 e PSG1), e após hibridização com sondas específicas (B2 e PSG2)..	81
Figura 14 - Distribuição percentual dos grupos de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> encontrados nas amostras de gelo da geleira Baranowski e do Pólo Sul Geográfico através da técnica de FISH.....	82
Figura 15 - Membranas de 0,22 mm após a filtração das amostras de gelo da Ilha Rei George, Antártica..	83
Figura 16 - Árvore filogenética construída a partir dos clones da amostra de gelo da Ilha Rei George, Península Antártica, e sequências de referência com maiores valores de identidade do banco de dados RDP.	88
Figura 17 - Árvore filogenética construída a partir dos clones da amostra de gelo da Ilha Rei George, Península Antártica, e sequências de referência com maiores valores de identidade do banco de dados RDP. A árvore foi construída com o método Neighbor Joining, com modelo de Kimura 2-parâmetros e teste de 1000 bootstraps. A escala indica a distância de similaridade dos ramos. Os clones correspondem a sequências do inserto no sentido 3'-5' (<i>Reverse</i>) das geleiras Baranowski (BAI), Ecology (ECO), Domeyko (DOM) e Znosko (ZNO).	89
Figura 18 - Fluxo de CO ₂ (linha azul) nas amostras de solo expostos por recuo da geleira Baranowski, Ilha Rei George, Antártica.....	93
Figura 19 - Gel de eletroforese de gradiente desnaturante (35%-65%) das amostras de solo da geleira Baranowski, <i>primers</i> GC338F-518R.	95

Figura 20 - Dendrograma de distância dos perfis de bandas das amostras de solo.....	96
Figura 21 - Gel de eletroforese de gradiente desnaturante (40%-70%) das amostras de solo da geleira Baranowski coletadas em 2004, amplificadas com os <i>primers</i> GC338F-518R.....	97
Figura 22 - Análise de componentes principais (PCA) entre os perfis de bandas de DGGE e diferentes parâmetros físico-químicos do solo de recuo da geleira Baranowski...	98
Figura 23 - Curva de rarefação de amostragem da biblioteca do solo BAS01-04.	99
Figura 24 - Curva de rarefação de amostragem da biblioteca do solo BAS14-04.	100
Figura 25 - Composição de Filo nas bibliotecas de gene 16S rRNA das amostras de gelo (BAI-08), e solo (BAS01-04 e BAS14-04).	104
Figura 26 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS01 e as sequências com maiores identidades no banco de dados.....	105
Figura 27 - Árvore filogenética gerada a partir dos clones da amostra BAS01 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para o Filo <i>Actinobacteria</i>	106
Figura 28 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS01 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para o Filo <i>Proteobacteria</i>	107
Figura 29 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS01 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para o Filo <i>Bacteroidetes</i>	108
Figura 30 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS01 e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Em detalhe os Filos <i>Cyanobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Gemmatimonadetes</i> , <i>Verrucomicrobia</i> e <i>Actinobacteria</i> ainda não-classificados.	109

Figura 31 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS01 e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Em detalhe os Filos <i>Acidobacteria</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Chloroflexi</i> e <i>Gemmatimonadetes</i>	110
Figura 32 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS14 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para o Filo <i>Actinobacteria</i>	111
Figura 33 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS14 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe <i>Alpha-proteobacteria</i>	112
Figura 34 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS14 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe <i>Beta-proteobacteria</i>	113
Figura 35 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS14 e as sequências com maiores identidades no banco de dados, em detalhe a Classe <i>Delta-proteobacteria</i>	114
Figura 36 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS14 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe <i>Gamma-proteobacteria</i>	115
Figura 37 - Curvas de rarefação estimadas para a amostra de gelo da geleira Baranowski coletada em 2009. As estimativas foram calculadas para os <i>cutoffs</i> de espécie (0,03), gêneros (0,05), famílias (0,10) e filios (0,20)	117
Figura 38 - Curvas de rarefação estimadas para as amostras de solo de Baranowski coletadas em 2004. As estimativas foram calculadas para os <i>cutoffs</i> de espécie (0,03), gêneros (0,05), famílias (0,10) e filios (0,20).	118

Figura 39 - Curvas de rarefação estimadas para as amostras de solo de Baranowski coletadas em 2009. As estimativas foram calculadas para os <i>cutoffs</i> de espécie (0,03), gêneros (0,05), famílias (0,10) e filos (0,20).	119
Figura 40 - Índices de riqueza Chao1 e Ace calculados para as amostras de gelo (BAI-09) e solo exposto por recuo da geleira Baranowski (BAS01 a BAS14).	123
Figura 41 - Índices de diversidade Shannon e Simpson calculados para as amostras de gelo (BAI-09) e solo exposto por recuo da geleira Baranowski (BAS01 a BAS14)...	123
Figura 42 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de gelo (BAI-09) e solos recém expostos por recuo da geleira Baranowski (BAS01-04 e BAS01-09)..	129
Figura 43 - Diagramas de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de solo de Baranowski, e respectiva porcentagem de OTU compartilhadas.....	130
Figura 44 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de solo da cronossequência de Baranowski. Amostras: próxima da geleira (BAS01-04), intermediária (BAS03-04) e mais distante (BAS14-04)....	131
Figura 45 - Mapa de cores representando a similaridade de estrutura de comunidade das amostras de Baranowski. Mapa calculado com o índice Jclass e <i>cutoff</i> 0,10.....	133
Figura 46 - Mapa de cores representando a similaridade de estrutura de comunidade das amostras de Baranowski. Mapa calculado com o índice Jclass e <i>cutoff</i> 0,20.....	133
Figura 47 - Mapa de cores representando a similaridade de estrutura de comunidade das amostras de Baranowski. Mapa calculado com o índice Thetayc e <i>cutoff</i> 0,10. .	134
Figura 48 - Mapa de cores representando a similaridade de estrutura de comunidade das amostras de Baranowski. Mapa calculado com o índice Thetayc e <i>cutoff</i> 0,20. .	134

Figura 49 - Abundância relativa de Filos para as amostras de gelo (BAI-09) e do solo de Baranowski coletado em 2004 (BAS01 a BAS14-04).	143
Figura 50 - Abundância relativa de Filos para as amostras de gelo (BAI-09) e do solo de Baranowski coletado em 2009 (BAS01 a BAS12-09).	143
Figura 51 - <i>Ranking</i> dos 50 gêneros mais abundantes obtidos através do pirosequenciamento das amostras de gelo e solos de Baranowski coletados em 2004 e 2009	149
Figura 52 - Produto de amplificação do gene 16S rRNA em gel de agarose 1%.....	158
Figura 53 - Gel de eletroforese em gradiente desnaturante (40%-70%) das amostras de <i>permafrost</i> , com <i>primers</i> que amplificam a região V3 do gene 16S rRNA	159
Figura 54 - Dendrograma de similaridade de perfis de bandas para todas as amostras de <i>permafrost</i> . Método: UPGMA, coeficiente de Dice.....	160
Figura 55 - Dendrograma de similaridade dos perfis de bandas de <i>permafrost</i> . Método: UPGMA, coeficiente de Dice.	161
Figura 56 - Dendrograma de similaridade dos perfis de bandas de <i>permafrost</i> . Método: UPGMA, coeficiente de Jaccard.....	161
Figura 57 - Dendrograma de similaridade dos perfis de bandas gerado a partir do testemunho de <i>permafrost</i> da Ilha Rei George, Antártica. Método: UPGMA, coeficiente de Dice.....	162
Figura 58 - Dendrograma de similaridade dos perfis de bandas gerado a partir do testemunho de <i>permafrost</i> da Ilha Rei George, Antártica. Método: Neighbor Joining, coeficiente de Dice.	162
Figura 59 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos de alcano monooxigenase das amostras de <i>permafrost</i> do Ártico (P01, P07 e P10) e do solo da Antártica (BAS01).....	168

- Figura 60** - Árvore de similaridade construída a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos dos clones de *permafrost* (P01, P07 e P10), clones do solo antártico (BAS01) e as sequências de referência da enzima alcano monoxigenase..... 171
- Figura 61** - Árvore de similaridade construída a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos dos clones de *permafrost* (P01, P07 e P10), clones do solo antártico (BAS01) e as sequências de referência da enzima alcano monoxigenase..... 172
- Figura 62** - Árvore de similaridade construída a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos dos clones de *permafrost* (P01, P07 e P10), clones do solo antártico (BAS01) e as sequências de referência da enzima alcano monoxigenase..... 173
- Figura 63** - Cladograma circular de agrupamento das sequências de gene *alk* dos clones de *permafrost* (P01, P07 e P10), dos clones do solo antártico (BAS01) e das sequências de referência da enzima alcano monoxigenase. 174

LISTA DE TABELAS

Tabela 2 - Sondas específicas utilizadas no experimento de FISH.	55
Tabela 3 - Relação dos <i>primers</i> utilizados, sequência, posição e região alvo.....	56
Tabela 4 - Amostras coletadas na área da geleira Baranowski.....	61
Tabela 5 - Amostras de solo e gelo da área de Baranowski submetidas ao pirosequenciamento.	66
Tabela 6 - Lista das amostras de <i>permafrost</i> estudadas neste trabalho.	71
Tabela 7 - Comparação das concentrações de células bacterianas encontradas em diferentes ambientes criogênicos.....	80
Tabela 8 - Concentração final de DNA obtido após a extração do DNA total das amostras de gelo da Península Antártica e Pólo Sul Geográfico.....	83
Tabela 9 - Composição granulométrica, condutividade elétrica e pH das amostras de solo....	91
Tabela 10 - Composição físico-química das amostras de solo.....	92
Tabela 11 - Comparação dos parâmetros físico-químicos entre os solos de Baranowski e de outras áreas da Baía do Almirantado.	92
Tabela 12 - Índices de riqueza (Ace e Chao) e diversidade (Simpson e Shannon) para as bibliotecas BAI-08, BAS01-04 e BAS14-04, sob um <i>cut-off</i> de 95% (Gênero). 100	
Tabela 13 - Índices de riqueza (Ace e Chao) e diversidade (Simpson e Shannon) para as bibliotecas BAI-08, BAS01-04 e BAS14-04, sob uma linha de corte de 75% (Filo).	100

Tabela 14 - Lista das amostras submetidas ao pirosequenciamento, número total e comprimento médio das sequências.	116
Tabela 15 - Número de OTUs únicas e índices de alfa-diversidade estimados para as sequências do gelo e solo de Baranowski obtidas através do pirosequenciamento. Valor de <i>cutoff</i> 0,03.	120
Tabela 16 - Número de OTUs únicas e índices de alfa-diversidade estimados para as sequências do gelo e solo de Baranowski obtidas através do pirosequenciamento. Valor de <i>cutoff</i> 0,05.	121
Tabela 17 - Número de OTUs únicas e índices de alfa-diversidade estimados para as sequências do gelo e solo de Baranowski obtidas através do pirosequenciamento. Valor de <i>cutoff</i> 0,10.	121
Tabela 18 - Número de OTUs únicas e índices de alfa-diversidade estimados para as sequências do gelo e solo de Baranowski obtidas através do pirosequenciamento. Valor de <i>cutoff</i> 0,20.	122
Tabela 19 - Índices de beta-diversidade calculados entre as amostras de gelo e solo de Baranowski coletado em 2004, para um <i>cutoff</i> de 0,03.	125
Tabela 20 - Índices de beta-diversidade calculados entre as amostras de gelo e solo de Baranowski coletado em 2004, para um <i>cutoff</i> de 0,05.	126
Tabela 21 - Índices de beta-diversidade calculados entre as amostras de gelo e solo de Baranowski coletado em 2004, para um <i>cutoff</i> de 0,10.	127
Tabela 22 - Índices de beta-diversidade calculados entre as amostras de gelo e solo de Baranowski coletado em 2004, para um <i>cutoff</i> de 0,20.	128
Tabela 23 - Teste de hipótese Libshuff entre as amostras de gelo e solos de Baranowski, sob um <i>cutoff</i> de 0,1.	136

Tabela 24 - Resultado do teste de Parcimônia realizado entre as amostras de gelo e solo de Baranowski. Dados calculados a partir de uma árvore filogenética contendo sequências representativas das amostras em um <i>cutoff</i> de 0,10.....	138
Tabela 25 - Resultados do teste UniFrac quantitativo entre as amostras de gelo e de solo de Baranowski, a partir de uma árvore filogenética com sequências representativas sob um <i>cutoff</i> de 0,10.....	139
Tabela 26 - Resultado da amplificação dos genes <i>alk</i> e 16S rRNA.	163
Tabela 27 - Identificação das sequências de alceno monoxigenases clonadas a partir de amostras de solo e <i>permafrost</i> , com suas respectivas sequências referência mais próximas.	165
Tabela 28 - <i>Ranking</i> de abundância de sequências para cada intervalo de <i>cutoff</i> de distância. O <i>cutoff</i> escolhido para determinar OPF nos clones de <i>alk</i> está destacado em negrito.	169

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Número de sequências de Baranowski classificadas em cada Filo a partir da ferramenta Classifier (RDP).....	142
Quadro 2 - Número de sequências de Baranowski classificadas nos 50 gêneros mais abundantes, classificadas segundo a ferramenta Classifier (RDP). O <i>cutoff</i> utilizado para gênero foi 0,05.....	147
Quadro 3 - Gêneros de micro-organismos fixadores de nitrogênio encontrados no gelo e solos de Baranowski.	150

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	Objetivos	26
1.1.1	Objetivo geral	26
1.1.2	Objetivos específicos	26
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	O continente antártico como habitat microbiano.....	27
2.2	Ecologia microbiana em geleiras	27
2.3	Ecologia microbiana no gelo de geleiras da Antártica.....	30
2.4	Microbiologia de solos permanentemente congelados (<i>permafrost</i>)	32
2.5	Derretimento de geleiras e a exposição de novos habitats.....	35
2.6	Aquecimento global e a retração de geleiras na Península Antártica	38
2.7	Diversidade e biogeografia de genes de degradação de hidrocarbonetos em ambientes criogênicos.....	40
2.8	Métodos independentes de cultivo empregados no estudo de comunidades microbianas	43
2.8.1	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE – <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)	45
2.8.2	Bibliotecas de genes 16S rRNA	46
2.8.3	Sequenciamento de segunda geração: 454 Pyrosequencing (Life Sciences) ...	46
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1	Diversidade microbiana em amostras de gelo da Antártica.....	50
3.1.1	Coleta das amostras de gelo.....	51
3.1.2	Procedimentos de descontaminação das amostras de gelo.....	54
3.1.3	Hibridização por sondas fluorescentes (FISH) das amostras de gelo.....	54
3.1.4	Extração do DNA total e amplificação do gene 16S rRNA das amostras de gelo	55
3.1.5	Biblioteca de genes 16S rRNA das amostras de gelo.....	56
3.1.6	Análise <i>in silico</i> da biblioteca de genes 16S rRNA das amostras de gelo	57
3.2	Sucessão ecológica em solos expostos por recuo de geleira	59
3.2.1	Coleta das amostras de solo expostas por recuo de geleira	60
3.2.2	Análise dos parâmetros físico-químicos do solo	62

3.2.3	Fluxo de CO ₂ no solo de retração da geleira Baranowski	62
3.2.4	Extração de DNA das amostras de solo e amplificação do gene 16S rRNA por PCR	62
3.2.5	Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) das amostras de solo de Baranowski	63
3.2.6	Análise dos perfis de DGGE do solo	64
3.2.7	Biblioteca do gene 16S rRNA das amostras de solo e gelo	64
3.2.8	Sequenciamento dos clones da biblioteca de genes 16S rRNA	65
3.2.9	Pirosequenciamento das amostras de solo e gelo de Baranowski	65
3.2.10	Análise <i>in silico</i> das sequências de 16S rRNA do solo e gelo de Baranowski ..	66
3.2.10.1	Análise das sequências de 16S rRNA obtidas através da biblioteca de clones	66
3.2.10.2	Análise das sequências de 16S rRNA obtidas através da técnica de pirosequenciamento	67
3.3	Diversidade funcional de genes <i>alk</i> em solos <i>permafrost</i>	69
3.3.1	Amostras utilizadas no estudo	70
3.3.2	Amplificação do gene 16S rRNA do <i>permafrost</i> por PCR e TempliPhi tm	73
3.3.3	Amplificação do gene 16S rRNA do <i>permafrost</i> para DGGE	74
3.3.4	Análise dos perfis de DGGE	74
3.3.5	Deteção dos genes funcionais através da amplificação por PCR	75
3.3.6	Construção da biblioteca de genes funcionais	75
3.3.7	Análise <i>in silico</i> da biblioteca de genes funcionais do <i>permafrost</i>	76
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1	Diversidade microbiana em amostras de gelo da Antártica	80
4.1.1	Contagem de células totais das amostras de gelo glacial por DAPI	80
4.1.2	Hibridização por sondas fluorescentes (FISH) das amostras de gelo	80
4.1.3	Extração de DNA e biblioteca de genes 16S rRNA das amostras de gelo	82
4.2	Sucessão ecológica em solos expostos por recuo de geleira	91
4.2.1	Análise dos parâmetros físico-químicos do solo	91
4.2.2	Fluxo de CO ₂ no solo de retração da geleira Baranowski	93
4.2.3	Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) das amostras de solo	94
4.2.4	Análise de componentes principais (PCA)	97
4.2.5	Biblioteca do gene 16S rRNA das amostras de solo e gelo	98
4.2.6	Análise <i>in silico</i> das sequências de 16S rRNA do solo e gelo	99

4.2.7	Análise da sucessão ecológica no solo exposto pela geleira Baranowski através da técnica de pirosequenciamento.....	116
4.2.7.1	Estimativa de riqueza e diversidade das amostras de Baranowski analisadas por pirosequenciamento.....	117
4.2.7.2	Comparação da estrutura de comunidade das amostras de Baranowski através de métodos baseados em OTU.....	124
4.2.7.3	Comparação da estrutura de comunidade das amostras de Baranowski através de métodos de testes de hipótese	135
4.2.7.4	Composição de membros da comunidade bacteriana das amostras de Baranowski obtidas por pirosequenciamento.....	140
4.2.8	Análise comparativa dos resultados da clonagem e pirosequenciamento.....	151
4.2.9	Aspectos gerais da sucessão ecológica nos solos expostos pela geleira Baranowski.....	154
4.3	Diversidade funcional de genes <i>alk</i> em solos <i>permafrost</i>	157
4.3.1	Extração do DNA total das amostras de <i>permafrost</i>	157
4.3.2	Amplificação de 16S rRNA nas amostras de <i>permafrost</i>	157
4.3.3	Caracterização da estrutura de comunidade do <i>permafrost</i> através da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)	159
4.3.4	Deteção de genes <i>alk</i> por PCR nas amostras de <i>permafrost</i>	163
4.3.5	Análise dos clones de gene <i>alk</i> das amostras de <i>permafrost</i> e solo	164
4.3.5.1	Determinação das Famílias Protéicas Operacionais (OPF) para o gene <i>alk</i>	167
5	CONCLUSÕES	178
5.1	Diversidade microbiana em amostras de gelo da Antártica:	178
5.2	Sucessão ecológica em solos expostos por recuo de geleira na Antártica:	178
5.3	Diversidade funcional de alcano monoxigenase em amostras de <i>permafrost</i> e solos do Ártico e Antártica:	180
	REFERÊNCIAS	181

1 INTRODUÇÃO

Micro-organismos são de fundamental importância dentro da biosfera como colonizadores primários de novos habitats, fornecedores de biomassa e energia nas cadeias alimentares, reciclando macro- e micro-nutrientes ou como patógenos e simbiontes. Em muitos ecossistemas os micro-organismos influenciam também o balanço respiratório-fotossintético, e a disponibilidade de oxigênio, de dióxido de carbono, de metano e de outros gases. Neste contexto, o estudo da diversidade dos micro-organismos é fundamental para a compreensão dos processos ciclagem de nutrientes na Biosfera, bem como para o desenvolvimento de estratégias de monitoramento ambiental e de novas biotecnologias.

Uma das principais dificuldades do estudo da diversidade microbiana é o isolamento e cultivo dos micro-organismos de origem ambiental. Normalmente, apenas uma pequena fração dos micro-organismos (<5% em solos e <1% em ambientes aquáticos) é recuperada através de métodos tradicionais de isolamento e cultivo em laboratório. Esta limitação foi definida por Stanley e Konopka (1985) como “A Grande Anomalia da Contagem de Placas” e foi atribuída às limitações técnicas de simular as condições ambientais necessárias para o crescimento microbiano. Entretanto, o número de novas espécies descritas vem crescendo nos últimos anos em virtude do desenvolvimento de estratégias independentes de cultivo.

Neste contexto destaca-se o emprego de métodos baseados na amplificação de genes específicos por reação em cadeia da polimerase (PCR), os quais permitem analisar o DNA bacteriano diretamente de amostras ambientais. Estas metodologias moleculares, associadas às técnicas de microscopia com hibridização por sondas grupo-específicas, têm permitido uma avaliação mais precisa da diversidade microbiana no ambiente e a descoberta de novos grupos de organismos nunca antes cultivados. Mais recentemente, os avanços nas tecnologias de sequenciamento de DNA vêm ampliando o grau de resolução dos estudos de ecologia. A técnica do pirosequenciamento, por exemplo, expandiu a amostragem de sequências de DNA em várias ordens de grandeza, permitindo a detecção mais precisa dos membros abundantes e raros da comunidade microbiana.

A diversidade de comunidades microbianas tem sido explorada em uma grande variedade de ambientes, incluindo solos, ar, águas marinhas, lagos, plantas, animais, e ambientes considerados extremos como sedimentos de mar profundo, fontes termais, vulcões, alta atmosfera, sítios contaminados por radiação e ambientes polares. Nestes últimos, o

conhecimento sobre diversidade microbiana ainda é escasso, uma vez que tais estudos envolvem dificuldades logísticas para amostragem e difícil simulação do ambiente para isolamento e cultivo, além da grande diversidade genética e metabólica apresentada pelos micro-organismos (HUSE et al., 2008).

A diversidade de micro-organismos nas regiões polares ainda é pouco conhecida, apesar do grande número de taxa relatados no Ártico e na Antártica. Alguns ecossistemas polares, como o gelo e o solo, têm sido alvos de pesquisas recentes com objetivos que variam do estudo do ecossistema microbiano, descoberta de novas espécies, bioprospecção e biotecnologia, e até como modelos de ambientes extra-terrestres.

A Antártica é um dos ambientes mais extremos do Planeta. Isolada dos demais continentes por correntes oceânicas e pela distância, a Antártica possui extremos de clima, habitats e biogeografia. Exceto pelas áreas costeiras livres de gelo, o continente antártico é habitado exclusivamente por micro-organismos. Dessa forma, os micro-organismos têm papel fundamental no transporte de energia e matéria orgânica, e muitas vezes constituem a base do funcionamento dos ecossistemas terrestres e aquáticos na Antártica. Os habitats microbianos na Antártica incluem as águas marinhas, lagos, ar, neve, gelo glacial, solos de superfície e solos permanentemente congelados (*permafrost*).

Os ecossistemas antárticos estão sujeitos a grandes variações ambientais, principalmente de temperatura, dessecação, escassez de nutrientes, alta incidência de radiação ultra-violeta, e longos períodos de ausência ou presença de luz. As respostas fisiológicas, ecológicas e evolutivas das comunidades microbianas frente às mudanças climáticas acentuadas, como o caso do aquecimento global, ainda não são totalmente compreendidas.

O objetivo deste projeto é estudar a comunidade microbiana em diferentes ecossistemas polares, sendo eles: a) Diversidade microbiana em testemunhos de gelo glacial da Península Antártica e do Pólo Sul Geográfico; b) Solos recém expostos por recuo de geleiras como modelos de sucessão ecológica; c) Diversidade genética e biogeografia de genes de degradação de hidrocarbonetos (genes *alk*).

O trabalho foi desenvolvido dentro dos projetos MERGE (*Microbiological and Ecological Responses to Global Environmental change in the polar regions*) e MIDIAPI (*Microbial Diversity of Terrestrial and Maritime ecosystems in Antarctic Peninsula*), no escopo do Ano Polar Internacional 2007-2009, e apoiado pelo Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR). O estudo da diversidade microbiana em amostras de gelo da Antártica foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Jefferson C. Simões, do Núcleo de Pesquisas Antárticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (NUPAC/UFRGS). O estudo da

sucessão ecológica microbiana em solos expostos por recuo de geleiras obteve colaboração dos Profs. Heitor Evangelista, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), e Prof. Artur Luiz da Costa da Silva, do Laboratório de Polimorfismo de DNA da Universidade Federal do Pará (UFPA). O recente trabalho sobre biogeografia e evolução de genes *alk* *permafrost* da Antártica e do Ártico foi realizado com recursos de bolsa sanduíche (CNPq/SWE) e co-orientação do Prof. Dr. David Gilichinsky, do Instituto de Problemas Físico-químicos e Biológicos do Solo, Academia de Ciências da Rússia (IPCBPS/RAS), cidade de Puschino, Rússia.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O presente projeto teve por objetivo estudar a biodiversidade filogenética e funcional microbiana em ambientes criogênicos distintos do Ártico e da Antártica através do emprego de métodos moleculares independentes de cultivo.

1.1.2 Objetivos específicos

O presente estudo é dividido em três objetivos específicos:

- a) Caracterizar a diversidade microbiana presente em amostras de gelo de geleiras na Península Antártica e no Pólo Sul Geográfico (PSG), e estabelecer correlações com parâmetros abióticos.
- b) Avaliar a sucessão ecológica microbiana em solos de morainas expostos por recuo de geleiras da Antártica e correlacioná-las com mudanças físico-químicas do solo, com a comunidade presente na geleira e com mudanças climáticas locais.
- c) Realizar o estudo da diversidade microbiana (gene 16S rRNA) e funcional (genes *alk*) de solos *permafrost* do Ártico (Sibéria) e da Antártica (Ilha Rei George).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O continente antártico como habitat microbiano

Isolada dos demais continentes por correntes oceanográficas e pela distância, a Antártica é um ambiente que se caracteriza por extremos de clima, habitats e biogeografia. Nos ecossistemas antárticos podem ocorrer grandes variações de temperatura e salinidade, dessecação, escassez de nutrientes, alta incidência de radiação ultra-violeta, longos períodos de ausência de luz, mudanças climáticas acentuadas e descontínuas, além dos ciclos de congelamento e degelo. Estas características extremas da Antártica influenciam a distribuição das massas de água no Oceano Austral e geram alterações climáticas locais e globais (CLARKE, 2003; VINCENT, 2000; WYNN-WILLIAMS, 1996).

Em um ambiente tão inóspito, os ciclos biogeoquímicos e as cadeias alimentares chegam a ser exclusivamente formadas por micro-organismos, como nos solos minerais dos desertos frios e em porções mais profundas de gelo glacial (VINCENT, 2000). Dessa forma, os micro-organismos têm um papel fundamental no transporte de energia e matéria orgânica, e muitas vezes constituem a base do funcionamento dos ecossistemas terrestres e aquáticos na Antártica (CLARKE, 2003).

A variedade de ecossistemas existentes na Antártica é grande. Alguns exemplos são os solos minerais, ornitogênicos ou aquecidos geotermicamente, como os encontrados na Ilha Deception (Arquipélago das Ilhas Shetlands do Sul), a neve, o gelo de geleiras e o gelo marinho, lagos continentais de salinidade variada, cobertos perenemente ou sazonalmente por gelo, sistemas endolíticos, solos permanentemente congelados (*permafrost*), ecossistemas marinhos (bentônico e pelágico), sedimentos de mar profundo, entre outros. Muitos desses ambientes possuem cadeias alimentares de complexidade bastante reduzida, servindo como excelentes modelos para o estudo de processos microbianos em geral e das interações de significado evolutivo sem a influência das plantas e animais superiores (COWAN e TOW, 2004; VINCENT, 2000).

2.2 Ecologia microbiana em geleiras

A formação do gelo ocorre a partir da precipitação da neve, cuja composição é de 90% de ar e 10% de água. O desequilíbrio entre precipitação de inverno e derretimento no verão

leva ao acúmulo de neve sobre a superfície continental ao longo dos anos. Ao atingir uma massa demasiadamente grande, a neve passa a exercer pressão sobre as camadas mais inferiores. Esta força causa transformações na neve depositada e expulsa o ar para a atmosfera. Durante este processo, a estrutura da neve é recristalizada e passa a formar grânulos denominados *firn*, o qual contém 50% de água. A compressão do *firn* leva finalmente à formação do gelo glacial, cuja proporção de água é de 90% (em sua maior parte indisponível, exceto por derretimentos transitórios), em um processo que leva cerca de 100 anos para acontecer (COWAN e TOW, 2004; MA et al., 2005).

Durante a transformação de neve em gelo glacial, as substâncias insolúveis e o material particulado são expulsos dos núcleos de congelamento, concentrando-se nas regiões adjacentes. Estes materiais incluem ácidos, óleos, álcoois, íons, e materiais sólidos trazidos pela neve, como poeira, minerais, grãos de pólen e micro-organismos. As altas concentrações de materiais entre os núcleos de congelamento causam uma diminuição no ponto de fusão e levam à formação de "veias" líquidas (6-12 μm diâmetro) no interior do gelo (WOLFF e PAREN, 1984; PRICE, 2000). Este microhabitat de baixas temperaturas, altas pressões, hipersalino, com escassez de nutrientes e bioelementos, foi sugerido como um dos únicos ambientes do gelo onde micro-organismos são capazes de sobreviver (PRICE, 2001). De fato, estudos por microscopia de fluorescência conduzidos em amostras de gelo polares mostraram que a maioria das células estavam concentradas em veias e canais dentro do gelo (JUNGE et al., 2004a, JUNGE et al., 2004b).

A microbiota presente no gelo glacial é composta essencialmente por depósitos de micro-organismos precipitados pela neve ou transportados pelo vento (MARSHALL, 1996), por correntes oceânicas (MURRAY et al., 1999) e por animais (SCHLICHTING et al., 1978). Embora muitos destes micro-organismos sejam mortos ou inviabilizados pelas características extremas do ambiente, muitos permanecem em estado de latência (esporulados) ou viáveis sob condições basais de metabolismo. A exemplo disto, experimentos de assimilação de timidina e leucina marcadas com trítio confirmaram a presença de células metabolicamente ativas em temperaturas de $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ (COWAN e TOW, 2004). A viabilidade celular dentro do gelo glacial é possível não apenas devido à capacidade de metabolismo em baixas temperaturas, mas também pela disponibilidade de matéria orgânica (ou inorgânica, no caso de quimio-organotróficos) no interior das veias líquidas. Price (2000) propôs que o interior das veias contém água, sais e carbono orgânico disponíveis para manter uma pequena população (10 a 100 bactérias.mL⁻¹) por até 400.000 anos.

A quantidade de micro-organismos imersos no gelo glacial não é uniforme e varia muito de um ambiente para outro. Em termos do número total de células, Mader et al. (2006) calcularam a média de 10^2 a 10^3 células.mL⁻¹ no gelo puro e 10^6 a 10^8 células.mL⁻¹ no interior das veias líquidas, entretanto, estas últimas ocupam apenas uma pequena fração do volume do gelo (< 0,2% v). Apesar desta quantidade parecer baixa, estima-se que com a taxa atual de derretimento polar isto significaria uma reintrodução de 10^{17} a 10^{21} micro-organismos viáveis na atmosfera por ano. Além disso, os eventos que colaboram para o aquecimento global aumentariam ainda mais estes números (ROGERS et al., 2005).

Diferentes estudos indicam que a topografia, posição geográfica, sazonalidade, condições climáticas globais, e a proximidade com outros ecossistemas influenciam na concentração e diversidade de micro-organismos trazidos pelo ar (LIGHTHART e SHAFFER, 1995; GIORGIO et al. 1996; FUZZI et al. 1997; MARSHALL e CHALMERS, 1997). Consistente com isto, amostras de gelo de regiões não polares (geleiras de grandes altitudes) contém um número e variedade maior de espécies bacterianas cultiváveis do que os gelos polares. Da mesma forma, as maiores amostragens de micro-organismos imersos em gelo polar foram obtidas de regiões da Antártica adjacentes a solos expostos e rochas da superfície do McMurdo Dry Valley (CHRISTNER et al., 2000).

Hughes et al. (2004) analisaram, através de técnicas independentes de cultivo, a diversidade de micro-organismos e outros materiais biológicos presentes na atmosfera amostrada sobre a região de Rothera Point (Península Antártica), na tentativa de explicar a origem destes organismos na superfície do gelo antártico. A diversidade relatada pelos autores foi alta, compreendendo representantes de cianobactérias, actinomicetos, diatomáceas, bem como grupos de bactérias ainda não cultivadas. Segundo estes autores, foi possível correlacionar a presença de algumas espécies com o transporte atmosférico a partir de outros pontos da península ou mesmo por distâncias ainda maiores. Em outro estudo, foram isoladas maiores quantidades de esporos do fungo *Cladosporium* sp. na península Antártica (Ilha Signy) em épocas que coincidiam com a ocorrência da chegada de massas de ar da América do Sul (MARSHALL, 1996, 1997).

Diferentes grupos microbianos já foram encontrados em amostras de gelo glacial, incluindo cianobactérias, actinobactérias, fungos filamentosos e leveduras, com predominância de micro-organismos esporulados em testemunhos de gelo mais antigos (COWAN e TOW, 2004; RIVKINA et al., 2004).

2.3 Ecologia microbiana no gelo de geleiras da Antártica

O gelo e a neve são características dominantes no continente antártico. O manto de gelo da Antártica ocupa cerca de 13,95 milhões de km² e contém 90% do volume do gelo terrestre. Estas propriedades, somadas às geladas correntes marinhas circumpolares, tornam a Antártica o principal vórtice de energia (*heat sink*) do planeta e, portanto, um dos principais controladores do sistema climático (BROEKE, 2004).

O gelo das geleiras antárticas teve origem após uma rápida mudança climática, há cerca de 34 milhões de anos (ZACHOS et al., 2001). A teoria atualmente mais aceita sugere que ocorreu nesta época uma significativa diminuição da concentração atmosférica de dióxido de carbono (< 280 ppm CO₂) que, em conjunto com o desenvolvimento da corrente circumpolar antártica, levou a um rápido resfriamento global (DECONTO e POLLARD, 2003).

As geleiras da Antártica preservam, dentro de microbolhas de ar, um registro atmosférico da época da formação do gelo. Neste processo, o gelo em formação também preserva todo o material em suspensão, incluindo partículas inorgânicas e material de origem biológica (CHRISTNER, 2002). Apesar das pesquisas glaciológicas já terem estudado o manto de gelo antártico há pelo menos 50 anos, apenas recentemente foi dada atenção ao estudo da origem e longevidade dos micro-organismos em amostras de gelo (CHRISTNER, 2002).

Os trabalhos sobre diversidade microbiana no gelo antártico são mais escassos que os estudos no gelo do Ártico, concentrando-se na região dos Vales de McMurdo e em lagos sub-glaciais como o Lago Vostok (ABYZOV et al., 1998; CHRISTNER et al., 2001).

A região dos Vales de McMurdo compreende um dos ambientes mais extremos da Antártica continental. Caracterizada por baixa precipitação de neve, os Vales de McMurdo é um dos desertos mais secos e frios do planeta. O gelo nesta região está restrito às grandes altitudes de montanhas e constituem uma fonte importante para estudos paleoclimáticos. Amostras de geleiras alpinas de McMurdo foram estudadas com objetivo de caracterizar a diversidade microbiana do gelo por Bidle et al. (2007). Estes autores coletaram testemunhos de gelo que representavam de 100.000 anos a 8 milhões de anos de deposição de neve na região antártica. Através de métodos independentes de cultivo, os autores observaram baixa diversidade de micro-organismos nas amostras, os quais foram identificados como membros dos grupos Gamma-proteobacteria, Alfa-proteobacteria, Acidobacteria, Firmicutes e Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides. Entretanto, os autores relataram a incorporação de

substratos marcados e a formação de macromoléculas, o que indica atividade metabólica mesmo no interior das amostras de gelo (BIDLE et al., 2007).

O Lago Vostok é o maior lago subglacial da Antártica e está localizado na região centro-leste do continente antártico. O Vostok está isolado da atmosfera por aproximadamente 4 Km de gelo por pelo menos 420.000 anos (PETIT et al., 1999). A descoberta deste lago, em meados da década de 1950, levou a comunidade científica sugerir que o Lago Vostok é um ambiente único no planeta, e que a existência de vida nele é incerta. Apesar das perfurações no gelo terem alcançado 3600 m de profundidade nesta área, a água do Lago Vostok nunca foi amostrada por precauções de contaminação durante a coleta. Entretanto, a água do lago congela e acumula na interface lago-geleira, a aproximadamente 3700 m abaixo da superfície, levando à formação do chamado *gelo de acreção*. Este gelo de acreção constitui, portanto, de material proveniente do Lago Vostok e já foi coletado para estudos glaciológicos e microbiológicos (CHRISTNER et al., 2001). A análise do gelo de acreção, através de métodos de cultivo, permitiu o isolamento de micro-organismos pertencentes aos gêneros *Brachybacteria*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus* e *Sphingomonas*. O emprego de métodos independentes de cultivo resultaram em sequências de genes 16S rRNA similares aos grupos Alfa e Beta-proteobacteria, Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides, e bactérias Gram positivas de baixo e alto G+C, sugerindo a existência de um ecossistema microbiano no interior do Lago (CHRISTNER et al., 2001). Em um estudo mais recente no gelo de acreção (3607 m), também através de métodos independentes de cultivo, foram observadas sequências de gene 16S rRNA com 99% de similaridade ao gene da espécie *Hydrogenophilus thermoluteolus* (LAVIRE et al., 2006). Esta bactéria é uma termofílica descrita em fossas abissais oceânicas e, portanto, sugere que haja fontes termais no leito do Lago Vostok, mantendo-o a temperaturas suficientemente altas para haver água líquida. A semelhança do Lago Vostok a ambientes extraterrestres, como a lua Europa do planeta Júpiter, expandiu o interesse de estudo da microbiologia de geleiras para outros campos da ciência, como a Astrobiologia.

O gelo do manto antártico, no entanto, foi pouco explorado com o objetivo microbiológico. Estudos na camada superficial de neve e *firn* do Pólo Sul (20 cm), indicaram uma densidade celular de apenas 200 a 5000 células.mL⁻¹, bem como a presença de sequências de 16S rRNA homólogas ao gênero *Deinococcus*, conhecido por ter alta resistência à desidratação e radiação ultra-violeta (CARPENTER et al., 2000). Estes trabalhos também demonstraram evidências que indicam a síntese de DNA e proteínas *in situ*, ou seja, ocorrência de metabolismo celular a temperaturas abaixo de zero (até -17 °C). A diversidade

microbiana no Pólo Sul, relatada por estes autores, pode ser considerada baixa, uma vez que entre 10 a 20% das espécies encontradas eram próximas a bactérias do tipo *Deinococcus*.

A baixa diversidade observada no Pólo Sul por Carpenter et al. (2000) corrobora com a premissa que, de acordo com os princípios gerais de ecologia, uma menor diversidade de espécies é esperada com o aumento da latitude geográfica (FRONTIER, 1985). Para testar esta hipótese, Lawley et al. (2004) realizaram uma análise comparativa da diversidade de eucariotos em amostras da Antártica. Estes autores empregaram diferentes métodos moleculares, incluindo biblioteca genômica do gene 18S rRNA e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), para comparar a diversidade em amostras da península Antártica às das regiões próximas ao Pólo Sul. A diversidade encontrada no Pólo Sul foi relativamente menor quando comparada aos resultados obtidos na região peninsular, suportando a hipótese anterior.

A diversidade microbiana foi pouco estudada através de métodos independentes de cultivo em amostras de gelo da Ilha Rei George (Península Antártica) e poucos são os trabalhos deste tipo no gelo do Pólo Sul (LAWLEY et al., 2004). Entretanto, a partir do ano de 2007, novos projetos de pesquisa foram incentivados através dos acordos firmados no Ano Polar Internacional (API). Estas colaborações proporcionaram novos estudos de microbiologia da região Antártica, incluindo a diversidade microbiana no gelo continental e peninsular.

2.4 Microbiologia de solos permanentemente congelados (*permafrost*)

O *permafrost* é um tipo específico de solo que permanece congelado ao longo dos anos. Ocupa cerca de 20% da superfície terrestre, sobretudo nas regiões polares, e sua temperatura permanece abaixo de zero por milhares ou até milhões de anos. No hemisfério norte, o *permafrost* localiza-se principalmente nas regiões da Eurásia (Sibéria) e da América do Norte (Alasca e Canadá), alcançando a espessura de 700-1000 m, tornando-se mais fina ao sul. O *permafrost* ocorre ainda em regiões livres de gelo da Groelândia, Antártica e regiões alpinas. A idade de congelamento do *permafrost* não é uniforme e varia de acordo com a geografia, sendo de 5 milhões de anos no Ártico (Sibéria) e 30 milhões de anos na Antártica (MARGESIN, R. 2009). As baixas e constantes temperaturas do *permafrost* mantém conservado por milhões de anos todo o material sedimentado. Tais características fazem do *permafrost* um repositório de materiais biológicos em escalas geológicas, muitos dos quais adaptados biogeoquimicamente às condições de congelamento (VOROBYOVA et al., 1996).

No contexto das mudanças climáticas globais, o estudo da biodiversidade do solo *permafrost* se mostra importante para que as futuras alterações decorrentes do descongelamento deste solo possam ser monitoradas. Os efeitos do derretimento do *permafrost* sobre o fluxo de carbono e ciclos biogeoquímicos podem ser significativos, uma vez que ele abriga uma grande quantidade de compostos e gases estufa, como o metano (WALTER et al., 2006).

De uma maneira geral, o interesse principal dos estudos envolvendo o *permafrost* tem sido a sobrevivência e estabilidade dos micro-organismos depositados (SHI et al., 1997; RIVKINA et al., 2000; VISHNIVETSKAYA et al., 2000; BAKERMANS et al., 2003). Através desses estudos é possível determinar os períodos de tempo em que os micro-organismos conseguem permanecer viáveis sob temperaturas extremas e seu estresse nutricional. Os estudos recentes no Ártico revelaram a presença de bactérias – com predominância de cianobactérias e actinobactérias – arqueias metanogênicas, fungos filamentosos e leveduras, muitos dos quais em estado metabólico ativo (RIVKINA et al. 2005; PANIKOV e SIZOVA, 2007). Vale citar que o micro-organismo mais antigo foi isolado de amostras de 3 milhões de anos do *permafrost* da Sibéria (SHI et al., 1997). Neste artigo, os autores encontraram diferentes formas de células, sendo 79,3% dos isolados classificados como bastonetes, 17,2% como cocos e 3,5% como filamentosos sem ramificação. A análise filogenética dos isolados do *permafrost* siberiano através do sequenciamento do gene 16S rRNA revelou quatro grandes grupos, sendo eles; bactérias Gram-positivas de alto-GC, bactérias Gram-positivas de baixo-GC, Beta-proteobacteria e Gama-proteobacteria. Algumas sequências obtiveram alta similaridade com o banco de dados, como *Arthrobacter globiformis*, *Rhodococcus fascians*, *Alcaligenes faecalis*, e *Bacillus psychrophilus*. Outros isolados não obtiveram similaridade com o banco de dados e podem representar espécies nunca antes descritas. Embora a baixa temperatura do *permafrost* seja um grande fator de seleção, nenhum psicrofílico foi isolado. Em geral, poucos psicrofílicos são isolados de ambientes terrestres, mesmo em solos da Antártica. Segundo os autores, quando comparadas aos isolados de ambientes marinhos, as bactérias de solos congelados tendem a ter um crescimento mais lento, e desta forma não evoluíram significativamente durante os últimos milhões de anos. As bactérias do *permafrost* representam, portanto, fósseis vivos de eras geológicas passadas (SHI et al., 1997).

Gilichinsky et al. (1992) foram um dos pioneiros a estudar a preservação de micro-organismos em amostras de *permafrost*. Estes autores encontraram bactérias, fungos e algas em amostras de *permafrost* da Sibéria que variavam do Holoceno (12.000 anos) ao Plioceno

(2,5 a 5,3 milhões de anos). A diversidade de organismos encontrados variou entre as amostras, sendo os eucariontes encontrados apenas em amostras do Holoceno, enquanto os procariontes, nas amostras mais antigas do Plioceno.

A longevidade de micro-organismos no *permafrost* da Antártica foi pouco estudada e estes podem representar talvez os mais antigos seres ainda viáveis (GILICHINSKY, 2002). Johnson et al. (2007) demonstraram que a viabilidade dos micro-organismos no interior do *permafrost* está associada à presença de água não congelada em microzonas com baixo conteúdo de gelo, assim capazes de permitir o intercâmbio de íons, moléculas de água, nutrientes e de gases com as células. Os autores comprovaram ainda, através de experimentos com bactérias Gram-positivas de Alto-GC, que a viabilidade celular nesse ambiente é resultado de um eficiente sistema de reparo de DNA em baixas temperaturas, contrapondo a idéia anterior de que o estado de dormência era responsável pela viabilidade celular.

Micro-organismos com metabolismo e reprodução abaixo de zero grau Celcius são frequentemente encontradas em amostras de solos congelados. Um dos primeiros relatos de micro-organismos do *permafrost* revelou isolados bacterianos que apresentaram crescimento – determinado através da formação de colônias – em temperaturas de até -5°C (GILICHINSKY et al., 1993; 1995). Em outro estudo, isolados de bactérias do *permafrost* mostraram metabolismo em temperaturas de -10°C e uma taxa de reprodução de 39 dias nestas condições (BAKERMANS et al., 2003). De forma ainda mais surpreendente, micro-organismos metabolicamente ativos a -20°C foram encontrados em amostras de 2-3 milhões de anos do *permafrost* siberiano, detectados através de técnicas de incorporação de acetato marcado com ^{14}C nos lipídeos de membrana (RIVKINA et al., 2000). Estes dados expandem os limites dos seres vivos quanto à sua capacidade de adaptação, metabolismo e sobrevivência nos ambientes mais extremos conhecidos pelo homem.

Trabalhos recentes mostraram que os *permafrosts* da Sibéria e da Antártica podem ser considerados análogos ao solo congelado de Marte, expandindo o interesse nestas áreas para o campo da Astrobiologia (SMITH e MCKAY, 2005). A pesquisa por biomarcadores em amostras antigas como o *permafrost* incluem gases biogênicos, biominerais, pigmentos biológicos, lipídeos, enzimas, proteínas, nucleotídeos, microfósseis, células mortas e viáveis. Tais biomarcadores representam modelos que podem servir como análogos de possíveis ecossistemas ou seres vivos em outros planetas. Esta analogia torna-se ainda mais evidente ao considerar que sete planetas do nosso Sistema Solar, assim como seus satélites, cometas e asteróides, são de natureza criogênica, ou seja, solos e rochas permanentemente congeladas como o *permafrost* são fenômenos comuns no Universo (GILICHINSKY, 2002).

2.5 Derretimento de geleiras e a exposição de novos habitats

A retração da frente de geleiras do mundo inteiro, de áreas alpinas (HAEBERLI e BENISTON, 1998) à Antártica (COOK et al., 2005), no decurso de algumas décadas, é frequentemente considerada como um sinal evidente de aquecimento global (OERLEMANS, 2005). O solo de moraina coberto por gelo durante centenas ou milhares de anos volta a ser exposto ao ambiente como consequência do derretimento de geleiras. Com esta contínua retração da frente das geleiras, o solo passa a representar um gradiente de fatores físicos, químicos e biológicos que refletem as mudanças regionais ao longo do tempo. Este gradiente espaço-temporal, denominado *cronossequência*, permite o estudo de várias décadas de mudanças ecológicas em distâncias de poucos metros (Figura 1). Desta forma, os solos expostos por recuo de geleira representam um excelente modelo no estudo de sucessão ecológica microbiana em áreas sensíveis a variações ambientais. (SIGLER e ZEYER, 2004).

O cenário comum no contexto do solo exposto por recuo de geleiras é uma sucessão primária composta por organismos autotróficos, incluindo algas, musgos, líquens e plantas superiores, devido à falta de carbono orgânico para sustentar o desenvolvimento de organismos heterotróficos (WALKER e DEL MORAL, 2003). A fixação de carbono pelos autotróficos levaria à síntese da matéria orgânica promovendo fonte de carbono para o desenvolvimento dos heterotróficos, os quais são responsáveis pelos processos ecológicos de decomposição e ciclagem dos nutrientes (BARDGETT e WALKER, 2004; BARDGETT et al., 2005). Entretanto, estudos recentes em substratos expostos por recuo de geleiras no Ártico mostraram que comunidades heterotróficas microbianas ocorrem antes que as comunidades autotróficas estejam presentes (TSCHERKO et al., 2003). Posteriormente, Bardgett et al. (2007), também estudando retração de geleiras no hemisfério Norte, propuseram que estes heterotróficos utilizam o carbono depositado no substrato antes da presença do gelo.

Figura 1 - Ilustração do ambiente resultado do recuo de geleiras. Termos sem tradução para o português: *Drumlin* - colinas de forma alongada e dimensões variadas formadas pela ação das geleiras; *Esker* - depósito de argila ou areia proveniente da erosão provocada pelo degelo; *Kame* - produto do acúmulo de sedimentos (areia, cascalho) transportados pela água de degelo e depositados na frente ou na lateral da geleira; *Kettle* (Chaleiras) - depressões de paredes abruptas e circulares produzidas pela fusão do gelo. Traduções em Rocha-Campos e Santos (2000).

Fonte: Adaptado de Benítez (2006).

A sucessão ecológica microbiana em solos de recuo de geleira foi recentemente estudada por Nemergut et al. (2007). A região alvo deste estudo foi uma geleira de altitude localizada na cordilheira dos Andes peruana e recuou cerca de 500 m nos últimos 20 anos. Os autores encontraram menor riqueza de espécies e menor diversidade nos solos jovens (recentemente expostos). Nos solos intermediários, tanto a riqueza como a diversidade aumentaram, atingindo um platô nos solos mais desenvolvidos. As evidências de uma sucessão ecológica microbiana foram reforçadas quando encontraram maiores quantidades de *Acidobacteria*, *Verrucobacteria* e *Bacteroidetes* nas amostras de solo distantes da geleira (expostos há mais tempo), uma vez que estes grupos são característicos de solos desenvolvidos. Em contrapartida, alguns grupos como a Família Comamonadaceae foram observados como dominantes no solo mais recente, decresceram nos solos intermediários e não foram detectados no solo mais antigo. Membros desta Família são normalmente encontrados habitando sistemas endolíticos e glaciares, o que sugere uma colonização a partir da exposição do substrato subglacial do derretimento da geleira. Adicionalmente, estes autores avaliaram a disponibilidade de nitrogênio ao longo da cronossequência como fator determinante na sucessão ecológica, e observaram que os níveis de compostos nitrogenados aumentava com o tempo de exposição do solo. Cianobactérias de vida livre, fixadoras de

nitrogênio com heterocisto (*Anabaena* e *Nostoc*) e sem heterocisto (*Oscillatoria* e *Microcoleus*) estavam presentes nos solos jovens e foram os organismos dominantes nos solos mais antigos.

O papel do nitrogênio como fator limitante no desenvolvimento de comunidades microbianas em solos de recuo de geleira alpina foi estudado em maiores detalhes por Duc et al. (2009). Estes autores utilizaram métodos moleculares para averiguar a diversidade do gene *nifH* (nitrogenase redutase) em amostras de solo dos Alpes Suíços, em escalas temporais de 8 e 70 anos de recuo de geleira. A diversidade de fixadores de nitrogênios (diazotróficos) encontrada nos solos mais jovens foi maior quando comparado ao solo mais antigo. Surpreendentemente, a diversidade de diazotróficos encontrada nestas amostras foi uma das maiores já relatadas em ambientes naturais.

Um dos primeiros trabalhos de diversidade microbiana em recuo de geleiras polares foi realizado na Ilha de Svalbard, norte da Noruega (KASTOVSKA et al., 2005). A comunidade microbiana foi estudada em diferentes habitats derivados do recuo da geleira, incluindo solo subglacial, solo recentemente exposto, solo mais antigo com vegetação e buracos de crioconito (*cryoconite holes*). A diversidade de cianobactérias presentes em todas as regiões superou os outros grupos de micro-organismos. Maiores quantidades de cianobactérias Nostocales e Chroococcales foram encontradas nos solos recentemente expostos, onde também foram detectadas as menores concentrações de nitrogênio e matéria orgânica disponível. Este resultado demonstra como o nitrogênio e o carbono são elementos importantes no desenvolvimento da sucessão ecológica, e que a escassez dos dois representa uma vantagem seletiva para cianobactérias de vida livre. Com o tempo estas cianobactérias aumentam os níveis de nitrogênio e de carbono orgânico no solo e geram condições ideais para o desenvolvimento de outros organismos. Neste trabalho, os autores também avaliaram diferenças nas taxas de respiração nos diferentes ambientes como indicador do desenvolvimento da comunidade microbiana. A emissão de CO₂ encontrada foi baixa no início da cronossequência (solo subglacial), cresceu no solo jovem e atingiu seu máximo no solo antigo, demonstrando que a atividade de heterotróficos aumenta com o desenvolvimento da sucessão ecológica.

A sucessão ecológica microbiana ainda não foi estudada em solos da Antártica, embora o continente tenha uma das maiores taxas de derretimento e retração de geleiras (COOK et al., 2005).

2.6 Aquecimento global e a retração de geleiras na Península Antártica

A Antártica representa uma região em frequente debate sobre os efeitos do aquecimento global. Segundo os relatórios do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC), as áreas com maiores taxas de mudanças climáticas do planeta constituem as regiões de grandes altitudes (gelo alpino, como a Cordilheira dos Andes), e regiões de altas latitudes, sobretudo o sul da Groenlândia e norte da Península da Antártica (ANISIMOV et al., 2007). Hansen et al. (1999) detectaram na Península Antártica um aumento de 1.5 K na média de temperatura anual desde 1950, comparado ao aumento médio de aproximadamente 0.6 K no resto do planeta. Um segundo estudo apresentou um quadro ainda mais preocupante, onde a Península Antártica teve uma taxa de aumento de $3.7 \text{ K} \pm 1.6 \text{ K}$ por século (VAUGHAN et al., 2003), causando o recuo de 87% das geleiras desta região em taxas aceleradas (COOK et al., 2005). Os registros meteorológicos do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) indicam um aumento de aproximadamente $1,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ na média de temperatura dos últimos 60 anos na Ilha Rei George (Península Antártica) (Figura 2), o que levou ao recuo de frentes de geleiras da região (Figura 3).

Figura 2 - Variações nas médias anuais de temperatura na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica.

Fonte: INPE (2008)

Figura 3 - Área de retração das frentes de geleira da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica.

Fonte: Dados obtidos em Pudenko (2002, 2007), Arigony-Neto et al. (2004) e Simões et al. (2004). Ilustração por Dr. André Rosch Rodrigues (IO/USP).

As causas do aumento da temperatura no planeta ainda não são totalmente compreendidas e os modelos climáticos atuais, incluindo aqueles que consideram os gases estufa, falham ao tentar reproduzi-los (KING et al., 2003). Entretanto, o resultado das mudanças climáticas na Península Antártica é bastante evidente e inclui a fragmentação de

plataformas de gelo, recuo de frente de geleiras e exposição de novos habitats terrestres (VAUGHAN e DOAKE, 1996; VAUGHAN, 2006). Sob o ponto de vista da Microbiologia, a re-atividade das comunidades microbianas do solo – presas abaixo do gelo por centenas ou milhares de anos – pode levar a um aumento na concentração de carbono atmosférico e assim causar um processo de “efeito estufa local”, acelerando ainda mais o recuo de geleiras (BIASI et al., 2005). Apesar desta nítida importância, até o presente momento não há relatos de estudo de sucessão ecológica microbiana em amostras de solo expostos por recuo de geleiras da Antártica.

2.7 Diversidade e biogeografia de genes de degradação de hidrocarbonetos em ambientes criogênicos

Os solos *permafrost* representam modelos únicos no estudo da evolução e biogeografia de genes microbianos em escalas geológicas, tornando-se uma grande vantagem na avaliação de impactos antrópicos sobre o meio ambiente. Neste contexto, o Laboratório de Ecologia de Micro-organismos do Instituto Oceanográfico (IO/USP) tem realizado estudos da diversidade de genes associados à degradação de hidrocarbonetos na região da Península Antártica. Estes estudos são baseados na análise molecular das amostras ambientais através de *primers* degenerados universais para enzimas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos, como por exemplo as enzimas alcano monoxigenases (alk). Cabe ainda ressaltar que o crescente interesse no impacto causado pelas mudanças globais é recente, mas traz estímulo ao importante conhecimento da diversidade microbiana e seu papel nos processos de degradação de hidrocarbonetos na natureza. Explorar a versatilidade metabólica dos micro-organismos constitui uma estratégia importante para compreender a diversidade microbiana, seus mecanismos de evolução, adaptação e seu papel ecológico, como o balanço no estoque de carbono do solo e a disponibilização de nutrientes.

Os hidrocarbonetos, de origem natural ou antropogênica, são estruturalmente diversos e formados por diferentes compostos orgânicos. A classe dos hidrocarbonetos alifáticos é formada por compostos orgânicos de cadeia aberta, saturados e insaturados, e que podem conter dezenas de moléculas de carbono em sua composição (*n*-alcanos). Compostos como alcanos, ciclo-alcanos, alcenos, alcinos, terpanos e esteranos são alguns dos hidrocarbonetos alifáticos mais comuns.

Na Antártica, a origem biogênica de *n*-alcanos está associada à atividade de micro-organismos marinhos e terrestres, por ser um dos principais componentes lipídicos da

membrana celular (CRIPPS, 1990). Além disso, os alcanos de cadeia longa e par (entre C₂₀ e C₃₂) predominam na região antártica, enquanto em outras regiões do planeta predominam os de cadeia mais curta e ímpar (C₁₆ e C₂₁) (REINHARDT e VAN VLEET, 1986). Este fenômeno pode estar relacionado à utilização de uma via metabólica não usual, baseada na descarboxilação de ácidos graxos em relação à redução de alcoóis, que é a rota utilizada na síntese de *n*-alcanos de cadeia ímpar (REINHARDT e VAN VLEET, 1986).

A principal fonte abiótica de hidrocarbonetos nas regiões polares é a circulação atmosférica global. Esta circulação ocorre em virtude das diferenças de pressão atmosférica entre o equador e os pólos. Compostos voláteis, como os hidrocarbonetos alifáticos, são facilmente transportados até as regiões polares, onde precipitam e se depositam no ambiente marinho e terrestre (CRIPPS e PRIDDLE, 1991). Outra importante fonte abiótica de hidrocarbonetos é a atividade antrópica. As atividades de pesquisa científica, pesca e turismo na Antártica, por exemplo, vem crescendo desde as últimas décadas, aumentando a concentração destes compostos no ambiente. Estudos realizados na tentativa de medir o impacto antrópico na Antártica mostraram que maiores concentrações de *n*-alcanos foram encontradas próximas às saídas de efluentes das estações de pesquisa (BÍCEGO, 1996; MARTINS, 2001). Os trabalhos também revelaram que as concentrações de *n*-alcanos e outros hidrocarbonetos alifáticos diminuem com o aumento da distância das estações de pesquisa e efluentes de esgoto destas (MARTINS, 2001).

Assim como a síntese de hidrocarbonetos, a degradação de *n*-alcanos no ambiente é essencialmente realizada por micro-organismos. O processo de degradação está relacionado ao uso do composto como fonte de carbono e envolve a participação de uma série de enzimas. Em ambientes aeróbios, as enzimas oxigenases iniciam o processo através da incorporação de átomos de oxigênio na molécula do hidrocarboneto e, assim, permite que outros organismos participem do processo. Uma vez que participam da primeira etapa da degradação de hidrocarbonetos, estas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza, inclusive em micro-organismos filogeneticamente distintos (WACKETT, 2004).

A degradação de *n*-alcanos já foi observada em várias espécies de bactérias e fungos, e incluem isolados de ambientes contaminados e naturais (WHYTE et al., 1996; VAN BEILEN et al., 2003; HEAD et al., 2006). As enzimas envolvidas na primeira etapa da degradação são denominadas alcano monoxigenases (Alk). Estas enzimas – que são NAD⁺ e NADP⁺ dependentes – introduzem um dos átomos do oxigênio molecular no alcano e formam um ácido carboxílico a partir do grupo metil oxidado (WYATT, 1984).

Micro-organismos degradadores de *n*-alcanos através da enzima Alk normalmente pertencem às classes Alfa-, Beta- e Gamma-proteobacteria ou a ordem Actinomycetales (Gram positivas de alto G+C) (VAN BEILEN et al., 2003; COLEMAN et al., 2006). Entretanto, trabalhos recentes observaram a presença do gene *alk*, que codifica as alcane monooxigenases, em isolados dos gêneros *Bacillus* e *Geobacillus* (Filo Firmicutes) e *Thermus* (Filo Deinococcus-Thermus), expandindo a ocorrência destas enzimas para outros Filos.

Os trabalhos em desenvolvimento no Laboratório de Ecologia de Micro-organismos (IO/USP) visam estudar a diversidade de genes funcionais associados ao ciclo de carbono, através da construção de bibliotecas de genes *alk*. A análise em andamento de 800 sequências destes genes demonstra que a diversidade encontrada em amostras de solos difere bastante dos ambientes aquáticos, apresentando uma assinatura diferente mesmo em diferentes biomas.

No que se refere aos trabalhos envolvendo as amostras de ambientes criogênicos, o desenvolvimento de projetos junto ao Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR-CNPq) permitiu observar o comportamento destes genes funcionais em solos e sedimentos marinhos em áreas preservadas e com características físico-químicas diferenciadas, como alto conteúdo de metais e baixo teor de matéria orgânica. Diversos genes catabólicos já foram relatados e publicados pelo grupo na região da Península Antártica (WHYTE et al., 2002; LUZ et al., 2004; LUZ et al., 2006; KUHN et al., 2009).

Além disto, sequências de alcane monooxigenase nunca antes descritas têm sido recentemente encontradas na região Antártica, indicando o potencial existente para o isolamento e descrição de novas espécies, algumas talvez endêmicas (Figura 4) (KUHN et al., 2009).

Figura 4 - Frequência e identificação de genes de alcano monoxigenase obtidos através de biblioteca de genes *alk* nas amostras de sedimento marinho da Ilha Rei George, Antártica. CF: Comandante Ferraz (área com atividade antrópica); BP: Botany Point (área não-contaminada).

Fonte: Kuhn et al., 2009.

Desta forma, a exploração da diversidade funcional de amostras de solo *permafrost* na Antártica e no Ártico (Sibéria) pode ser ainda mais interessante, pela possibilidade de encontrarmos genes funcionais e micro-organismos nunca anteriormente descritos. Além disso, a análise de solos tão antigos irá ajudar a compreensão da origem filogenética destes genes encontrados atualmente no meio ambiente. Estes dados irão compor um banco de dados de uma nova ferramenta desenvolvida dentro do Ribossomal Database Project (Michigan State University) chamada “*Functional Gene Pipeline Repository*”. Este banco de dados de proteínas, ainda em desenvolvimento, permitirá a busca no banco de dados NCBI através do programa *Hidden Markov Model* (HMM).

2.8 Métodos independentes de cultivo empregados no estudo de comunidades microbianas

Antes do desenvolvimento de técnicas moleculares, os estudos de ecologia microbiana eram baseados em métodos de isolamento e cultivo de micro-organismos em laboratório. Uma vez que tais métodos selecionam apenas alguns membros da comunidade, isto é, aqueles em que o meio de cultura e a incubação fornecem as condições apropriadas para seu crescimento, a diversidade microbiana é grosseiramente subestimada (AMANN et al., 1995; TORSVIK et al., 1990). Desta forma, o emprego de técnicas independentes de cultivo tornou-se uma necessidade metodológica no campo da ecologia microbiana. Este empasse é ainda mais

evidente ao se tratar de ambientes extremos, onde o isolamento e cultivo de micro-organismos ocasionam maiores dificuldades.

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

De maneira geral, os métodos moleculares podem ser divididos em dois grupos. O primeiro inclui métodos que analisam a estrutura de uma comunidade a partir de um perfil de amplificação de genes 16S rRNA via PCR. Estes perfis são gerados pela presença ou ausência do *amplicon*, tamanho do produto, razão entre guanina e citosina (G:C), sítios de clivagem por endonucleases, entre outros. Na comunidade científica, as técnicas que envolvem a análise destes perfis são conhecidas pelo termo em inglês *fingerprinting*. Como exemplo de técnicas de *fingerprinting* utilizadas em ecologia microbiana podem ser citados a análise de restrição de DNA ribossomal (ARDRA) (MARTÍNEZ-MURCIA et al., 1995), polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminal (T-RFLP) (LIU et al., 1997), e a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (MUYZER et al., 1993).

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 *fingerprinting*, o sequenciamento pode permitir tanto a identificação dos micro-organismos (até o nível taxonômico de gênero ou espécie), como também inferir relações entre o genótipo e o ambiente estudado (CHENEY et al., 2000).

Até pouco tempo atrás, a maioria dos estudos de ecologia microbiana por sequenciamento baseava-se na construção de bibliotecas de genes 16S rRNA e posterior sequenciamento do maior número possível de clones únicos da comunidade. Contudo, os altos custos da construção de bibliotecas, manutenção dos clones e sequenciamento baseados em capilaridade do DNA (método de Sanger) frequentemente limitam o número de sequências incluídas nas pesquisas. A detecção de taxa com baixas abundâncias exige o sequenciamento de um número de clones várias ordens de grandeza a mais que a reportada na literatura (HUSE et al., 2007). Entretanto, as mais recentes técnicas de sequenciamento de moléculas de DNA, como o pirosequenciamento (454 Life Sciences, Roche, EUA), permitem analisar

centenas de milhares de sequências diferentes de uma amostra em apenas algumas horas. Estas novas tecnologias estão começando a ser utilizadas para explorar a grande diversidade microbiana nos mais variados ambientes (HALL, 2007).

2.8.1 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

O DGGE foi introduzido por Muyzer et al. (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 os micro-organismos por meio do sequenciamento das bandas obtidas, a análise de várias amostras no mesmo gel, e o acompanhamento da dinâmica de populações específicas em função de variações ambientais (MUYZER e RAMSING, 1995). Até poucos anos atrás, o DGGE era uma das técnicas de *fingerprinting* mais aplicadas no estudo da riqueza e distribuição de espécies ambientais (HUI et al., 2008).

O princípio da técnica de DGGE é separar, por meio de eletroforese, os produtos de PCR de 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 uréia 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 a sua composição de nucleotídeos (MUYZER et al., 1993).

No início do desenvolvimento da técnica, a sensibilidade de separação de nucleotídeos por DGGE era estimada em apenas 50% de mudanças de base em fragmentos de DNA de 50 a 1000 pares de base (MYERS et al., 1985a). 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, forma pontes de hidrogênio sobre si mesmo e é denominado grampo de GC. A presença deste grampo de GC aumenta o ponto de desnaturação da molécula e, conseqüentemente, 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 mutações em sequências de DNA (MYERS et al., 1985b, SHEFFIELD et al., 1989)

Os estudos de ecologia microbiana por DGGE utilizam, na maioria dos casos, *primers* que amplificam o gene 16S rRNA de membros taxonomicamente diferentes de uma comunidade, sendo portanto, denominados de *primers* universais (MUYZER et al., 1993; HEUER et al., 1997). A especificidade de um *primer* universal pode variar de domínios (*primers* para o Domínio Bacteria ou Domínio Archaea), filos, sub-filos, famílias ou mesmo de gêneros bacterianos, e portanto a escolha do *primer* depende do objetivo do trabalho.

2.8.2 Bibliotecas de genes 16S rRNA

A construção de bibliotecas de genes 16S rRNA é um dos métodos mais sensíveis e mais utilizados no estudo de ecologia microbiana. Ao contrário dos métodos de *fingerprinting*, a clonagem de genes 16S rRNA permite a identificação e quantificação direta dos micro-organismos de uma amostra. O procedimento mais comum consiste em extrair o DNA total de uma determinada amostra ambiental e amplificar por PCR o gene 16S rRNA diretamente deste DNA. Os produtos de PCR (insertos), advindos de micro-organismos diferentes da comunidade, são ligados a plasmídeos de clonagem (vetores) e estes, por fim, são separados através da transformação de células hospedeiras (normalmente *Escherichia coli* competentes). As células hospedeiras (clones), cada uma contendo um produto de PCR diferente ligado a um vetor, são selecionadas em meios seletivos específicos e o inserto é sequenciado através de técnicas tradicionais de sequenciamento de Sanger.

No contexto de análises ecológicas, a clonagem e sequenciamento de clones fornece dados qualitativos, através da identificação e classificação dos organismos sequenciados, e quantitativos, através do emprego de métodos estatísticos para medir a diversidade. No entanto, todo o processo pode exigir muito tempo na elaboração, além dos altos custos de sequenciamento caso um número grande de clones seja analisado.

2.8.3 Sequenciamento de segunda geração: 454 Pyrosequencing (Life Sciences)

A crescente demanda por sequenciamento em pesquisas científicas, somado ao alto custo dos métodos atuais, levou ao desenvolvimento de novas tecnologias de obtenção de sequências. Uma das mais recentes técnicas é o sequenciamento massivo de moléculas de DNA desenvolvido pela companhia 454 Life Sciences (Roche Applied Sciences, Bélgica),

também conhecido como pirosequenciamento. Este método permite a obtenção de centenas de milhares de sequências curtas de DNA em apenas algumas horas, sem a necessidade da exaustiva etapa de clonagem (HUSE et al., 2007).

O pirosequenciamento foi inicialmente descrito por Ronaghi et al. (1996) ao demonstrar que a molécula de pirofosfato (PPi), produzida durante a reação de polimerização do DNA, poderia ser utilizada para detectar a incorporação de um nucleotídeo específico. Este método foi denominado "sequenciamento pela síntese", pois a sequência 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, os *primers*, o DNA molde, o conjunto de enzimas e seus substratos (adenosina 5'fosfosulfato – APS, e luciferina). Os nucleotídeos para a síntese da fita complementar são inseridos na reação em etapas separadas. Após a adição de um dos nucleotídeos – e caso seja a base complementar da fita molde – este é incorporado pela DNA polimerase e gera uma molécula de PPi como subproduto da reação. A reação continua com a ação da enzima sulfúrilase, que converte o PPi em ATP (através do substrato APS), e então a enzima luciferase transforma o ATP em sinal luminoso. A conversão de PPi em luz é um processo estequiométrico, isto é, cada molécula de PPi gera uma quantidade definida de fótons. A intensidade de luz emitida pela reação é detectada por sensores do equipamento. Finalmente, o ciclo é finalizado com a atividade da enzima apirase, que tem o papel de degradar os nucleotídeos e as moléculas de ATP que sobraram da reação (RONAGHI, 2001).

Jonasson et al. (2002) aplicaram o pirosequenciamento com o gene 16S rRNA e demonstraram que o método pode ser utilizado para explorar a diversidade microbiana em larga escala. Estes autores criaram o conceito de "assinaturas" (*signature matching*). O método foi aperfeiçoado por Binladen et al. (2007) com o uso de *primers* marcados na PCR, seguida do pirosequenciamento. Esta estratégia permitiu o sequenciamento de alto rendimento (*high throughput sequencing*) de vários produtos de PCR diferentes em paralelo (BINLADEN et al., 2007). Outro avanço significativo deve-se ao trabalho de Parameswaran et al. (2007), os quais adaptaram ao *primer* uma sequência curta de nucleotídeos, denominada código de barras ou *barcode*. Da mesma forma que o método dos *primers* marcados, este código de barras permitiu o uso do pirosequenciamento em várias amostras diferentes em paralelo. Após a reação de sequenciamento, o código de barras é usado como referência na identificação e separação das amostras por bioinformática. Neste estudo em específico, os autores

sequenciaram com sucesso os genes 16S rRNA de 25 amostras diferentes, e foram capazes de separar 99,8% das sequências sem qualquer ambiguidade (PARAMESWARAN et al., 2007).

Um dos primeiros trabalhos a aplicar o pirosequenciamento em ecologia teve por objetivo caracterizar a diversidade microbiana em amostras de solo (ROESCH et al., 2007). Os autores obtiveram de 26.000 a 53.000 sequências de 16S rRNA de cada amostra, que incluíam solos da América do Norte (EUA e Canadá) e da América do Sul (Brasil). Após aplicarem as análises estatísticas sobre as sequências, os autores estimaram que o número total de espécies bacterianas variou de 6.000 (solos do Brasil e EUA) a 20.000 (Canadá) espécies, 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).

Os recentes avanços nas técnicas de sequenciamento e bioinformática estão proporcionando novos horizontes no estudo da ecologia e evolução de micro-organismos (BOUCK e VISION, 2007). Isto torna-se ainda mais interessante para o estudo de ecologia microbiana em ambientes polares, onde a técnica de pirosequenciamento ainda não foi aplicada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Em termos gerais, a metodologia empregada neste trabalho consistiu na coleta das amostras, extração do DNA total da comunidade microbiana, amplificação de genes 16S rRNA e *alk* por PCR, seguido do uso de ferramentas moleculares específicas para cada objetivo proposto. Em cada fase do projeto foram necessárias adaptações metodológicas, as quais serão discutidas neste tópico.

A fim de representar os métodos utilizados de forma mais clara, a sessão "3 Materiais e Métodos" será apresentada separadamente para cada um dos três objetivos do projeto:

(3.1) Diversidade microbiana em amostras de gelo da Antártica

(3.2) Sucessão ecológica em solos expostos por recuo de geleira

(3.3) Diversidade funcional de genes *alk* e ARHD em solos *permafrost*

3.1 Diversidade microbiana em amostras de gelo da Antártica

Figura 5 - Organograma da metodologia empregada no estudo da diversidade microbiana das amostras de gelo de geleiras.

3.1.1 Coleta das amostras de gelo

As amostras de gelo da Península Antártica foram coletadas em cinco diferentes geleiras da Baía do Almirantado, Ilha Rei George (Figura 6, Tabela 1). As coletas foram realizadas junto ao Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR/CNPq) durante as Operações Antárticas XXV (verão 2006/2007), XXVI (verão 2007/2008) e XXVII (verão 2008/2009). As duas primeiras coletas foram realizadas apenas na Geleira Baranowski (ponto 5 na Figura 6) e, posteriormente, estendeu-se a amostragem para as demais geleiras.

Tabela 1 - Relação das amostras de gelo coletadas na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica.

Amostra n° (Figura 6)	Nome da amostra ¹	Local (Geleira)	GPS (WGS84) - (LAT XX°YY'ZZ") (LON XX°YY'ZZ")	Temperatura (°C)
1	Dom-09	Domeyko	62°03'37.09"S; 58°24'47.12"O	-0,4
2	Zno-09	Znosko	62°05'71.90"S; 58°28'24.70"O	-0,5
3	Wan-09	Wanda	62°06'25.58"S; 58°21'18.01"O	-0,5
4	Eco-09	Ecology	62°10'10.13"S; 58°28'15.58"O	-0,4
5	BAI-09	Baranowski	62°11'53.42"S; 58°26'53.19"O	-0,4
5	BAI-08	Baranowski	62°11'53.42"S; 58°26'53.19"O	n.d.
5	BAI-07	Baranowski	62°11'53.42"S; 58°26'53.19"O	n.d.

¹ Os dois dígitos no nome das amostras referem-se ao ano da coleta.
n.d. = não determinado

O procedimento de coleta consistiu em delimitar uma área de 40 cm x 40 cm na superfície da geleira e, com o auxílio de uma picareta de gelo, esculpir um bloco com 40 cm de profundidade (Figura 7). As amostras de gelo foram removidas e acondicionadas em sacos de autoclave previamente esterilizados a 121 °C e 1 atm por 20 minutos. Imediatamente após a coleta, as amostras foram colocadas em caixas térmicas e levadas ao laboratório de Química da Estação Antártica Comandante Ferraz, onde foram armazenadas em freezers a -20° C até serem processadas.

Figura 6 - Mapa da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica, indicando os pontos de coleta das amostras de gelo. 1) Geleira Domeyko; 2) Geleira Znosko; 3) Geleira Wanda; 4) Geleira Ecology; 5) Geleira Baranowski. Criado por Dr. André Rosch Rodrigues (IO/USP).

Figura 7 - Fotografias do procedimento de coleta de amostras de gelo na Antártica. (A-E) Perfuração do gelo e coleta da amostra; (F) Amostra de gelo descontaminada em laboratório.

As amostras continentais da Antártica (manto de gelo antártico, latitudes entre 80°S e 90°S) foram coletadas pelo Prof. Dr. Jefferson C. Simões, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), durante a 1ª Travessia Antártica Brasileira ao Pólo Sul Geográfico (PSG) (Figura 8) (MAYEWSKI et al., 2005). As amostras foram retiradas com um equipamento de coleta de testemunhos de gelo e imediatamente acondicionadas em sacos esterilizados. As amostras empregadas neste estudo corresponderam ao gelo coletado entre 22 e 46 metros, cuja datação indicou uma origem por volta de 350 anos atrás (Prof. Jefferson Simões, comunicação pessoal)¹.

Figura 8 - Testemunhos de gelo coletados pelo Prof. Dr. Jefferson Simões (NUPAC/UFRGS) durante a 1ª Travessia Brasileira na Antártica.

Fonte: Acervo pessoal do Prof. Jefferson Simões (NUPAC/UFRGS).

¹ Comunicado durante o XV Simpósio Brasileiro de Pesquisas Antárticas – USP/São Paulo, 2007.

3.1.2 Procedimentos de descontaminação das amostras de gelo

Todos os métodos de amostragem de testemunhos de gelo resultam em algum grau de contaminação. Considerando que na maioria dos casos a concentração celular destas amostras é baixa, torna-se necessário o uso de procedimentos de descontaminação a fim de garantir a autenticidade dos resultados (ROGERS et al., 2005). O método utilizado neste trabalho consistiu no protocolo sugerido por Rogers et al. (2004), com modificações.

Inicialmente, as amostras de gelo foram fracionadas em subunidades menores (aproximadamente 200 g cada fração) e separadas em um recipiente esterilizado. Em seguida, a superfície externa das amostras (2 mm) foi removida a seco com uma resistência elétrica de autoclave (110V, 1000W) adaptada para esta finalidade. Após este procedimento, as amostras foram rinsadas com uma solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 10 segundos, seguido por três a quatro lavagens com água MilliQ gelada autoclavada. As amostras descontaminadas foram transferidas em sacos de autoclave esterilizados e armazenados a 4 °C para descongelamento, evitando, assim, quaisquer danos na amostra por consequência de choques térmicos. Após o descongelamento, as amostras foram submetidas à filtração em membranas de éster de celulose (porosidade de 0,22 µm), sendo o volume de 500 mL filtrado para as análises em microscopia (item 3.1.3) e o volume de 1800 a 2000 mL filtrados para a extração de DNA (item 3.1.4).

3.1.3 Hibridização por sondas fluorescentes (FISH) das amostras de gelo

A comunidade microbiana das amostras de gelo da Península Antártica (Geleira Baranowski) e Pólo Sul Geográfico foi inicialmente caracterizada por microscopia com o emprego do corante de ácidos nucleicos 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e por hibridização com sondas fluorescentes (Tabela 2). Para tal, cerca de 500 mL de cada amostra descontaminada foram filtrados em membranas de polycarbonato (Millipore) com porosidade de 0,22 µm, as quais foram posteriormente fixadas em paraformaldeído 2%. Após a fixação, as membranas foram coradas com DAPI por 5 minutos, seguido de hibridização com sondas específicas conforme o método descrito por Cottrell e Kirchman (2000).

Após a hibridização, as membranas foram observadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axioplan 2, Germany), e foram contados 15 campos aleatórios. Um controle negativo (auto-fluorescência) foi preparado com uma membrana sem sonda.

Tabela 1 - Sondas específicas utilizadas no experimento de FISH.

Grupo	Sonda
Domínio <i>Bacteria</i>	
Classe <i>Alphaproteobacteria</i>	ALF98g
Classe <i>Betaproteobacteria</i>	BET42a
Classe <i>Gammaproteobacteria</i>	GAM42a
Classe <i>Deltaproteobacteria</i>	SRB385
Domínio <i>Archaea</i>	ARCH915

3.1.4 Extração do DNA total e amplificação do gene 16S rRNA das amostras de gelo

Após a análise inicial da comunidade do gelo antártico através de técnicas de microscopia (item 3.1.3), as amostras foram estudadas por técnicas de biologia molecular baseadas na amplificação do gene 16S rRNA via PCR. Nesta etapa, foram incluídas outras amostras de geleiras da Península Antártica (Tabela 1, amostras 1 a 4).

Inicialmente, o DNA total das amostras de gelo foi extraído utilizando o UltraClean™ Water DNA Isolation Kit com as seguintes modificações: 1) A membrana filtrante do kit foi substituída por uma membrana de éster de celulose com porosidade de 0,22 µm (Millipore, USA); 2) A solução para eluição do DNA na última etapa do protocolo foi substituída por água MilliQ esterilizada pré-aquecida a 60 °C. Estas modificações tiveram o objetivo de aumentar a quantidade final de DNA. Após a extração, o DNA foi purificado e concentrado utilizando o kit comercial DNA Clean e Concentrator™ (Zymo Research, USA) para um volume final de 10 µL. A concentração e a pureza do DNA extraído foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA).

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada utilizando os *primers* 27F e 1401R (Tabela 3). As reações foram realizadas com volume final de 25 µL contendo entre 2 e 5 ng do DNA molde, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM de MgCl₂, 200 mM de cada um dos deoxirribonucleosídeos trifosfato (ou seja, 0,8 µM do mix de dNTPs), 1,2 µM de cada *primer* e 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil). Um controle positivo de reação foi preparado utilizando 25 ng de DNA de *Escherichia coli* JM109 (ATCC 53323). O controle negativo de reação foi preparado substituindo o volume do DNA molde pelo mesmo volume de água MilliQ esterilizada.

A amplificação foi programada para uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, e 72 °C por 90

segundos. Uma extensão final foi realizada a 72 °C por 7 minutos. A amplificação do fragmento esperado (1400 pb) foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (w/v) em tampão TAE 1X, seguido de coloração em brometo de etídio e observação em luz ultravioleta.

Tabela 2 - Relação dos *primers* utilizados, sequência, posição e região alvo.

Primer ^a	Posição Bases ^b	Região alvo 16S rRNA	Sequência do <i>primer</i>	Referências
27F	8-27	Universal V1-V3	5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'	1
1401R	1385-1401	Universal V6-V8	5'CGG TGT GTA CAA GAC CC 3'	2
GC-338F ^a	338-357	<i>Bacteria</i> V3	5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG 3'	3
518R	518-534	Universal V3	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'	3;4

^aF, *primer forward*; R *primer reverse*.

^bA numeração das posições é baseada no gene 16S rRNA de *Escherichia coli*.

^cgrampo de GC: 5' – CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G –3'

1. LANE, D. J. 1991

2. FELSKY, et al. 1996

3. AMPE et al., 1999.

4. MUYZER et al., 1993.

3.1.5 Biblioteca de genes 16S rRNA das amostras de gelo

A biblioteca de genes 16S rRNA foi construída a partir de uma mistura de três repetições de PCR purificados com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham-Pharmacia, Inglaterra). Os produtos de PCR purificados foram clonados em plasmídeo pGEM-T Easy Vector System (Promega, EUA) seguindo as indicações do fabricante.

Após as clonagens, os vetores foram inseridos em células competentes de *Escherichia coli* JM109 (Promega, EUA) por choque-térmico e as colônias obtidas foram selecionadas pelo sistema de alfa-complementação do gene da β -galactosidase (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

As colônias que apresentaram plasmídeos com insertos (brancas) foram repicadas em meio LA contendo 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina e incubadas a 37 °C por 14 horas. Após a incubação, uma pequena quantidade da colônia foi inserida em um tubo de microcentrífuga contendo a reação de PCR para amplificação do inserto. A reação de PCR possuía um volume final de 25 μL contendo tampão de PCR 1X, 1,7 mM de MgCl_2 , 0,8 mM de dNTPs, 0,3 μM de cada *primer* e 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil). Para a amplificação dos insertos, foi utilizado o par de *primers* M13F (5' – GTT TTC CCA GTC ACG AC – 3') e M13R (5' – CAG GAA ACA GCT ATG AC – 3'), os quais hibridizam nas regiões do vetor

adjacentes ao sítio de ligação do inserto. As reações de amplificação foram realizadas com ciclo inicial de desnaturação a 97 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, e 72 °C por 90 segundos, com extensão final a 72 °C por 5 min. O produto de PCR foi submetido ao sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (CEGH-USP) no qual utilizou-se o *primer* T7-F (5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3') com temperatura de anelamento de 56 °C.

3.1.6 Análise *in silico* da biblioteca de genes 16S rRNA das amostras de gelo

A análise das sequências obtidas procedeu-se em diferentes *softwares*. Inicialmente, a qualidade do sequenciamento foi averiguada através da ferramenta Phred, disponível online no software *Electropherogram quality analysis* da EMBRAPA. Esta ferramenta analisa o eletroferograma gerado pelo sequenciador e atribui valores de qualidade aos nucleotídeos de acordo com um limiar pré-determinado (EWING et al., 1998). Em seguida, as sequências foram manualmente editadas no *software* BioEdit v7.0.9.0 (HALL, 1999), a fim de remover as sequências do vetor e do *primer*, bem como sequências de baixa qualidade resultantes da análise de qualidade no Phred. As sequências foram convertidas para o formato FASTA e alinhadas com o *software* ARB (WOLFGANG et al., 2004). As sequências alinhadas foram avaliadas quanto à presença de quimeras com o *software* Bellerophon (HUBER et al., 2004). As sequências quimeras foram excluídas das análises subsequentes. Em seguida, as sequências foram identificadas em bancos de dados através dos *softwares online* SeqMatch (Ribosomal Database Project, Michigan State University), Classifier (Ribosomal Database Project, Michigan State University), RDPQuery (Sapelo Island Microbial Observatory, University of Georgia) (DYSZYNSKI e SHELDON, 2006) e BLAST v2.2.23 (National Center for Biotechnology Information) (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências únicas de cada geleira e suas respectivas sequências de referência mais próximas foram utilizadas para construir uma árvore filogenética no *software* ARB. A árvore foi construída utilizando um filtro de posição de bases e estrutura secundária do ribossomo baseado na frequência de nucleotídeos das sequências. Este filtro foi construído no *software* ARB a partir das sequências alinhadas, e para tal estabelecido um limiar mínimo de 50% de bases por coluna do alinhamento. O método empregado na construção da árvore foi Neighbor Joining, modelo de evolução Kimura 2-parâmetros (KIMURA, M. 1980) e teste de *bootstrap* de 1000 repetições.

A diversidade das amostras foi analisada com o *software* Dotur v1.53 (SCHLOSS, 2005), a partir de uma matriz de distância construída com o *software* DNADIST v3.5c (FELSENSTEIN, 1993). Para o cálculo da rarefação foram utilizados como limites de corte os valores de 75% para o nível taxonômico de Filo, 85% para Classe, 95% para Gênero e 97% para Espécie (STACKEBRANDT e GOEBEL, 1994; WHITMAN e DYSZYNSKI, dados não publicados)². A riqueza de espécies nas amostras foi calculada segundo os índices de Ace e Chao1. Os índices de diversidade de Simpson e de Shannon foram calculados para cada biblioteca.

² Disponível online em http://simo.marisci.uga.edu/public_db/taxonomy.htm

3.2 Sucessão ecológica em solos expostos por recuo de geleira

Figura 9 - Organograma da metodologia empregada no estudo dos solos expostos por recuo de geleira.

3.2.1 Coleta das amostras de solo expostas por recuo de geleira

As amostras de solo foram coletadas na área exposta pela geleira Baranowski, localizada na Ilha Rei George, Península Antártica (Figura 10). Tal geleira apresentou um recuo de aproximadamente 450 m nos últimos 25 anos (Prof. Dr. Heitor Evangelista, UERJ, comunicação pessoal)³, dando a esta geleira uma taxa de recuo médio de 18 m.ano⁻¹. As coletas foram realizadas junto ao Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR/CNPq) durante as Operações Antárticas XXV (verão 2006/2007), XXVI (verão 2007/2008) e XXVII (verão 2008/2009).

Figura 10 - Mapa da área de solo exposto por recuo da geleira Baranowski, indicando os pontos de coleta (amostras BAS).

Fonte: Dados obtidos em Pudielko (2002, 2007), Arigony-Neto et al. (2004) e Simões et al. (2004). Ilustração por Dr. André Rosch Rodrigues (IO/USP).

³ Correspondência eletrônica.

Tabela 3 - Amostras coletadas na área da geleira Baranowski.

Nome da amostra ^{1,2}	Tipo de amostra	Temperatura (°C)	GPS (WGS84) - (LAT XX°YY'ZZ") (LON XX°YY'ZZ")	Distância da geleira (m)	Ano da coleta ³
BAI-08	Gelo	-0,7	62°11'53.58"S, 58°26'50.71"O	0	2008
BAI-09	Gelo	-0,4	62°11'53.42"S, 58°26'53.19"O	0	2009
BAS01-04	Solo	n.d.	62°16'48.2"S, 58°26'36.5"O	0	2004
BAS03-04	Solo	n.d.	62°16'47.8"S, 58°26'32.3"O	59,60	2004
BAS04-04	Solo	n.d.	62°16'47.3"S, 58°26'58.5"O	90,12	2004
BAS05-04	Solo	n.d.	62°16'17.1"S, 58°26'27.8"O	118,71	2004
BAS06-04	Solo	n.d.	62°16'46.5"S, 58°26'26.5"O	148,43	2004
BAS07-04	Solo	n.d.	62°16'45.1"S, 58°26'24.8"O	178,34	2004
BAS08-04	Solo	n.d.	62°16'66.2"S, 58°26'21.3"O	209,11	2004
BAS09-04	Solo	n.d.	62°16'46.8"S, 58°26'19.4"O	238,08	2004
BAS11-04	Solo	n.d.	62°16'46.2"S, 58°26'14.2"O	311,51	2004
BAS14-04	Solo	n.d.	62°16'46.4"S, 58°26'37.2"O	417,04	2004
BAS01-09	Solo	-0,3	62°11'53.42"S, 58°26'53.19"O	0	2009
BAS02-09	Solo	5,7	62°11'53.30"S, 58°26'50.30"O	41,82	2009
BAS03-09	Solo	6,2	62°11'53.17"S, 58°26'47.75"O	78,81	2009
BAS04-09	Solo	6,3	62°11'53.04"S, 58°26'45.23"O	115,58	2009
BAS05-09	Solo	7,2	62°11'53.09"S, 58°26'42.57"O	154,10	2009
BAS06-09	Solo	6,3	62°11'52.87"S, 58°26'40.19"O	189,10	2009
BAS07-09	Solo	8,7	62°11'52.72"S, 58°26'37.37"O	230,04	2009
BAS08-09	Solo	7,3	62°11'52.41"S, 58°26'33.54"O	286,06	2009
BAS09-09	Solo	8,0	62°11'52.45"S, 58°26'30.19"O	334,62	2009
BAS10-09	Solo	8,0	62°11'52.72"S, 58°26'27.01"O	381,13	2009
BAS11-09	Solo	6,9	62°11'52.72"S, 58°26'24.00"O	424,76	2009
BAS12-09	Solo	9,7	62°11'52.56"S, 58°26'20.62"O	473,79	2009
BAS13-09	Solo	7,8	62°11'52.53"S, 58°26'18.28"O	507,70	2009

¹ BAS (Baranowski soil); BAI (Baranowski ice); Os dois últimos dígitos no nome das amostras referem-se ao ano da coleta.

² As amostras BAS02, BAS10, BAS12 e BAS13 coletadas em 2004 não foram analisadas neste estudo, e portanto foram excluídas da tabela.

³ Os anos de coleta indicados correspondem aos verões de 2004/2005 (solo "2004"), de 2007/2008 (gelo "2008"), e de 2008/2009 (solo e gelo em "2009").

As amostras de solo foram coletadas em um transecto de 500 m perpendicular à frente da geleira, isto é, ao longo da cronossequência. Neste transecto foram determinados 10 pontos de amostragem equidistantes entre si. Em cada ponto o solo foi coletado a 1-5 cm de profundidade, em triplicatas, homogenizados e armazenados em sacos de coleta esterilizados

whirl-pak (Nasco, USA), somando um total de aproximadamente 500 g de cada amostra. No momento da coleta foram determinadas a temperatura do solo com um termômetro de campo e a posição geográfica por GPS. Todas as amostras foram armazenadas sob refrigeração (-20 °C) durante o transporte até o Brasil.

Amostras de gelo de Baranowski foram coletadas na base da geleira com o auxílio de uma picareta de gelo, conforme descrito no item 3.1.1. Uma lista simplificada das amostras utilizadas neste estudo encontra-se na Tabela 4.

3.2.2 Análise dos parâmetros físico-químicos do solo

Parâmetros físico-químicos do solo foram analisados no Laboratório de Solos da Universidade Federal de Lavras (UFV). Os parâmetros medidos foram: potencial de oxido-redução, fósforo total e dissolvido, potássio, sódio, cálcio, magnésio, alumínio, zinco, ferro, manganês, cobre, berílio, enxofre, nitrogênio total (amônia e nitrato). A análise físico-química foi realizada nas amostras de solo coletadas em 2004.

3.2.3 Fluxo de CO₂ no solo de retração da geleira Baranowski

A respiração do solo – medida como fluxo de CO₂ para a atmosfera – é um parâmetro importante para se estudar a atividade microbiana no solo ao longo do tempo. Desta forma, consideramos importante medir os fluxos de CO₂ nos pontos de amostragem do recuo de geleira. As medições foram realizadas nas amostras coletadas durante a Operação Antártica XXVII (verão 2008/2009).

O fluxo de CO₂ foi medido com um equipamento portátil LI-COR 8100 (LI-COR Biosciences, USA) em triplicatas, com intervalo de 2 horas entre os testes. Cada medida foi realizada em 3 ciclos consecutivos sendo 30 segundos iniciais para estabilização da câmara, seguidos por 90 segundos de medida de fluxo. O resultado foi determinado através da média de cada triplicata.

3.2.4 Extração de DNA das amostras de solo e amplificação do gene 16S rRNA por PCR

O DNA total do solo foi extraído em duplicatas a partir de 10 g de amostra com o kit PowerMax[™] Soil DNA (Mo Bio), segundo as especificações do fabricante. Após a extração, o

DNA total foi quantificado por eletroforese em gel de agarose 0.8% (g/mL) em tampão TAE 1X a 70 V e por espectrômetro NanoDrop[™] ND-1000 (Thermo Scientific, USA).

O gene 16S rRNA da comunidade microbiana do solo foi amplificado por PCR para os experimentos de DGGE e para a construção da biblioteca de clones. Para a análise do perfil da comunidade nas amostras de solo por DGGE foram empregados os *primers* GC338F e 518R, que amplificam a região variável V3 do gene 16S rRNA de *Bacteria*, gerando um fragmento de aproximadamente 190 pb (LANE, 1991; MUYZER et al., 1993). Os *primers* 27F e 1401R amplificam um fragmento de aproximadamente 1400 pb e foram utilizados na construção da biblioteca de genes 16S rRNA. A sequência dos *primers* utilizados no trabalho encontra-se na Tabela 3.

A concentração dos reagentes utilizados para a amplificação continha 1X tampão PCR 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (Platinum Taq polimerase, Invitrogen), 0,2 µM de cada *primer*, 0,8 mM de dNTP e 15-20 ng de DNA num volume final de 25µL de reação. As condições de amplificação foram as mesmas descritas por Sakamoto (2001) e iniciou-se com *hotstart* de 95 °C por 10 min; seguido por 30 ciclos de 30 s de desnaturação a 94 °C, 30 s de anelamento a 55 °C e 30 s de extensão a 72 °C e a extensão final 72 °C por 10 min. Um controle positivo de reação foi preparado utilizando 25 ng de DNA de *Escherichia coli* JM109 (ATCC 53323). O controle negativo de reação foi preparado substituindo o volume do DNA molde pelo mesmo volume de água MilliQ esterilizada. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler Personal (Eppendorf, USA). As concentrações dos reagentes de PCR e as condições de amplificação descritas acima foram utilizadas tanto para o DGGE, quanto para a construção da biblioteca de clones.

Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (g/mL) em TAE 1X a 100 V, corados com brometo de etídeo, expostos em um transiluminador UV, e visualizados e fotografados no *software* de imagens Kodak 1D 3.6 (Kodak). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese juntamente com 200 ng de marcadores de peso molecular 100bp DNA Ladder ou λ-*Hind*III (Invitrogen).

3.2.5 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) das amostras de solo de Baranowski

O produto de amplificação com os *primers* GC338F e 518R das amostras de solo foi submetido à análise em DGGE utilizando-se o sistema Dcode Universal Mutation Detection

System (Bio-Rad Laboratories, Richmond Calif.). Os géis utilizados foram preparados com poliacrilamida 8% (solução estoque 40% acrilamida/bis acrilamida 37,5:1; Bio Rad Laboratories, Inc.) em tampão TAE 1X.

Os gradientes de desnaturação utilizados foram 35-60% e 40-70% (no qual 100% de desnaturante continha 7 M de uréia e 40% de formamida). A eletroforese foi estabelecida a 60 V e 60 °C durante 14 h. Após a corrida, os géis foram corados com nitrato de prata segundo o protocolo modificado de Sanguinetti et al. (1994), e a imagem foi obtida com auxílio de máquina fotográfica digital Canon Rebel XTi de 10 Megapixels (Canon, Japão).

3.2.6 Análise dos perfis de DGGE do solo

A análise multivariada dos perfis de bandas do DGGE foi realizada com o *software* BioNumerics (Applied Maths, Bélgica). Inicialmente, as canaletas foram identificadas e suas respectivas curvaturas foram alinhadas. Em seguida, as bandas da amostra controle foram identificadas e estabelecidas como referências para a normalização das canaletas. Após a normalização, o *software* identificou as bandas das amostras através da intensidade das mesmas. Esta fase foi avaliada com cuidado e as correções necessárias foram feitas manualmente. Os dados de posição e intensidade de bandas foram transformados em uma matriz para as análises comparativas.

Os perfis de DGGE foram comparados entre si através da construção de um dendrograma de similaridade de bandas no *software* BioNumerics. O método de distância empregado foi UPGMA e correção de Jukes e Cantor. Esta metodologia resulta em uma árvore de distância de perfis de bandas e indica quais estruturas de comunidade são mais e menos similares, não representando, necessariamente, similaridade na composição de seus membros.

A correlação entre o perfil de comunidade (a partir das bandas de DGGE) e as variáveis físico-químicas foi avaliada através de uma análise de componentes principais (PCA). O *software* Canoco v4.5 (BRAAK e SMILAUER, 2002) foi utilizado para a análise por PCA a partir da matriz de bandas do DGGE e dos parâmetros físico-químicos do solo.

3.2.7 Biblioteca do gene 16S rRNA das amostras de solo e gelo

A amostra da geleira Baranowski (BAI-08) e duas amostras do solo exposto (BAS01-04 e BAS14-04) foram selecionadas para a construção de uma biblioteca do gene 16S rRNA

após os resultados do DGGE. Para tal, o DNA das amostras foi amplificado em triplicatas com os *primers* 27F e 1401R, como descrito anteriormente. O produto de amplificação foi clonado em vetores pGEM-T[™] Easy Vector (Promega, EUA), segundo as especificações do fabricante, em células de *Escherichia coli* JM109 competentes. A transformação das células foi realizada através de choque térmico 0°/42 °C por 45 segundos e os clones foram selecionados após 14 horas de crescimento a 37 °C em meio LA acrescido de ampicilina 100 µg.mL⁻¹, IPTG 0,2 µM e X-Gal 40 pg.mL⁻¹.

3.2.8 Sequenciamento dos clones da biblioteca de genes 16S rRNA

Inicialmente, as sequências clonadas foram amplificadas por PCR utilizando os *primers* M13F e M13R, que correspondem às sequências flanqueadoras do inserto no vetor. A concentração dos reagentes utilizado para a amplificação dos fragmentos continha 1X tampão PCR 10X, 1,7 mM de MgCl₂, 1 U de Taq polimerase (Platinum Taq polimerase, Invitrogen), 0,3 µM de cada *primer*, 0,8 mM de dNTP e uma pequena quantidade de células de cada clone para um volume final de 25 µL de reação. Após a amplificação por PCR, as amostras foram purificadas com o kit de purificação de microplacas ZR-96 DNA Clean-up Kit[™] (Zymo Research, Califórnia - EUA), segundo as instruções do fabricante, e quantificadas em eletroforese em gel de agarose 2%. A concentração de DNA em cada produto de PCR foi corrigida para aproximadamente 35 ng.µL⁻¹ e submetida ao sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH-USP), no qual utilizou-se o *primer* T7-Fwd (5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3') com temperatura de anelamento de 56 °C.

3.2.9 Pirosequenciamento das amostras de solo e gelo de Baranowski

Os resultados iniciais do estudo obtidos através das técnicas de DGGE e clonagem demonstraram-se promissores e, desta forma, decidiu-se por expandir as análises através de técnicas de sequenciamento de segunda geração (454 Life Sciences Pyrosequencing). Um total de 15 amostras foi submetido ao pirosequenciamento no laboratório do Prof. Dr. James Tiedje, da Michigan State University, EUA (sete amostras de cada coleta do solo, e uma amostra de gelo – Tabela 5). A amplificação inicial foi realizada com os *primers* 520F (5' - AYT GGG YDT AAA GNG - 3') e 802R (5' - TAC NVG GGT ATC TAA TCC - 3'), que

amplificam a região hipervariável V4 do gene 16S rRNA, e sequências *barcode* foram inseridas nos amplicons de cada amostra antes da reação de pirosequenciamento.

Tabela 4 - Amostras de solo e gelo da área de Baranowski submetidas ao pirosequenciamento.

Amostra	Tipo da amostra	Ano de coleta
BAI-09	Gelo	2009
BAS01-04	Solo	2004
BAS03-04	Solo	2004
BAS05-04	Solo	2004
BAS07-04	Solo	2004
BAS09-04	Solo	2004
BAS11-04	Solo	2004
BAS14-04	Solo	2004
BAS01-09	Solo	2009
BAS02-09	Solo	2009
BAS04-09	Solo	2009
BAS06-09	Solo	2009
BAS08-09	Solo	2009
BAS10-09	Solo	2009
BAS12-09	Solo	2009

3.2.10 Análise *in silico* das sequências de 16S rRNA do solo e gelo de Baranowski

A composição e a diversidade microbiana do solo e gelo de Baranowski foram analisadas *in silico* com o auxílio de diferentes *softwares* de bioinformática descritos a seguir. As análises foram desenvolvidas nas sequências provenientes da clonagem (item 3.2.7) e do pirosequenciamento (item 4.2.9).

3.2.10.1 Análise das sequências de 16S rRNA obtidas através da biblioteca de clones

As sequências da biblioteca de genes 16S rRNA (BAI-08, BAS01-04 e BAS14-04) foram analisadas conforme o método empregado na análise dos clones das amostras de gelo (item 3.1.6). Os índices de diversidade das comunidades microbianas foram obtidos através do *software* Dotur v1.53 (SCHLOSS, 2005), a partir de uma matriz de distância construída com o *software* DNADIST v3.5c (FELSENSTEIN, 1993). Para o cálculo da rarefação, foram utilizados como limites de corte os valores de 75% para o nível taxonômico de Filo, 85% para Classe e 95% para Gênero (WHITMAN e DYSZYNSKI, dados não publicados)⁴. Os índices

⁴ Disponível online em http://simo.marsci.uga.edu/public_db/taxonomy.htm

de riqueza (Ace e Chao1) e diversidade (Simpson e Shannon) foram calculados para cada biblioteca.

3.2.10.2 Análise das sequências de 16S rRNA obtidas através da técnica de pirosequenciamento

Duas estratégias foram desenhadas para o estudo da diversidade microbiana nas amostras da cronosequência: A) Método baseado em OTUs; B) Método por teste de hipóteses. Entretanto, o volume de dados gerado por pirosequenciamento, somado à complexidade dos métodos de análise, demanda um grande esforço computacional. Desta forma, as sequências foram submetidas a um pré-tratamento antes do início das estratégias de estudo.

As sequências de 16S rRNA geradas por pirosequenciamento foram inicialmente analisadas quanto à qualidade dos nucleotídeos no *software* do próprio equipamento (454 Life Sciences), o qual descartou as leituras de baixa qualidade. As regiões dos *primers* e *barcode* foram removidas e as sequências resultantes foram submetidas à identificação no banco de dados do Ribosomal Database Project. O *software* Mothur v.1.9.0 (SCHLOSS et al., 2009) foi aplicado para realizar o alinhamento das sequências, a construção da matriz de distância, o agrupamento das OTUs, o cálculo dos índices de diversidade e os testes de hipótese.

As sequências das 15 amostras (Tabela 5) foram alinhadas contra o banco de dados Silva (release 98) (PRUESSE et al., 2007), o qual contém aproximadamente 370.000 sequências de Bacteria e Archaea pré-alinhadas segundo a estrutura secundária do RNA ribossomal. Após o alinhamento, os *gaps* comuns foram removidos e as sequências únicas foram separadas em um novo arquivo, de forma a diminuir o tempo computacional. O dado quantitativo (número de vezes que cada sequência se repete) foi armazenado em um arquivo separado para ser utilizado nos testes subsequentes (ver abaixo, teste UniFrac quantitativo). Uma matriz de distância foi calculada a partir do arquivo FASTA contendo o alinhamento das sequências únicas de cada amostra. A matriz foi calculada para todo o intervalo de *cut-off* entre 0% (sequências únicas) e 20%.

O método de análise baseado em OTUs permite analisar a frequência de distribuição de sequências de uma ou mais amostras através da matriz de distância. Esta estratégia possibilita calcular os índices de riqueza e diversidade de uma comunidade microbiana. Para tal, foram gerados grupos de OTUs em cada intervalo de *cut-off* da matriz de distância. Para cada amostra foram calculados individualmente os índices de Ace, Chao1, Simpson, Shannon,

e rarefação. Para a análise da diversidade entre amostras foram calculados os índices de riqueza compartilhada (riqueza observada, Ace e Chao1), similaridade de membros de comunidade (Jaccard e Sorenson) e similaridade de estrutura de comunidade (abundância de Jaccard e Theta de Yue-Clayton).

O método baseado em testes de hipóteses permite determinar se há evidências suficientes para sugerir que os dados da estrutura de comunidade poderiam ou não ser gerados pelo acaso. Inicialmente foi calculado o índice β -Libshuff a fim de testar estatisticamente se duas comunidades possuem a mesma estrutura. O índice foi calculado a partir da matriz de distância entre pares de amostras, em todo o intervalo de *cut-off*. Cada análise gerou dois valores-P, os quais foram considerados significativos se abaixo de 0,05 dividido pelo número de amostras comparadas (correção de Bonferroni).

O teste de hipótese da Parcimônia (também chamado de "teste-P") determina se duas ou mais comunidades microbianas têm a mesma estrutura. A significância deste teste estatístico indica apenas a probabilidade das comunidades terem a mesma estrutura por acaso e, portanto, não indica níveis de similaridade. O teste é calculado através dos comprimentos dos ramos da comunidade em uma árvore filogenética, considerando o número mínimo de mudanças ao longo da árvore que seriam necessárias para produzir o agrupamento observado na árvore. Uma árvore filogenética foi construída no *software* ARB a partir das sequências únicas alinhadas de todas as amostras juntas. A árvore foi construída com o método Neighbor Joining, com filtro de posição de nucleotídeos baseados na estrutura secundária do gene 16S rRNA, tal como descrito no item 3.2.10.2. O teste de Parcimônia foi executado no *software* Mothur v1.9.0 a partir da árvore filogenética construída.

O teste UniFrac foi realizado para avaliar a diferença de estrutura de comunidade entre as amostras. Este teste – medido como índice UniFrac qualitativo ou quantitativo – é capaz de identificar ramos únicos de uma comunidade em uma árvore filogenética e testar se tais ramos podem ser gerados pelo acaso. A árvore filogenética utilizada no cálculo dos índices UniFrac foi a mesma empregada no teste de parcimônia. Para o teste UniFrac quantitativo utilizou-se os dados do número de repetições de sequências gerados anteriormente.

Por fim, a estrutura de comunidade compartilhada entre as amostras de solo e gelo de Baranowski foi comparada em um mapa bidimensional de cores (também conhecido por *heatmap*) e por diagramas de Venn, ambos baseados da matriz de distância no *software* Mothur. Uma árvore de distância foi produzida a fim de identificar as amostras com estruturas de comunidade mais similares.

3.3 Diversidade funcional de genes *alk* em solos *permafrost*

Para determinar a diversidade microbiana nas amostras de *permafrost*, o DNA total da comunidade será extraído e analisado através do sequenciamento de clones da biblioteca de genes, construída a partir do produto de amplificação por PCR do gene 16S rRNA e gene alceno monooxigenase (gene *alk*).

Figura 11 - Organograma da metodologia empregada no estudo da diversidade filogenética e funcional das amostras de *permafrost*.

3.3.1 Amostras utilizadas no estudo

As amostras de *permafrost* utilizadas no trabalho pertencem à coleção do Laboratório de Criosolos do Instituto de Problemas Físico-químicos e Biológicos do Solo (IPCBPS/RAS), Universidade Estadual de Moscou, Rússia, e estão listadas na Tabela 6.

O *permafrost* do Ártico foi coletado nas planícies Kolyma-Indigirka, localizada no nordeste da Sibéria (Latitude 70°N; Longitude 160°E). Nesta região, o *permafrost* tem cerca de 800 m de espessura e uma temperatura média entre -9 °C e -11 °C (GILICHINSKY et al., 1992). As coletas na Sibéria foram realizadas através de um *drill* seco (sem uso de óleos de perfuração, Figura 12b) e o método de detecção de contaminantes desenvolvido por Willerslev et al. (2004), baseado no emprego de células marcadas. Este método permite a detecção de possíveis contaminantes durante a coleta, transporte e manuseio das amostras, garantindo a autenticidade dos micro-organismos da amostra.

As amostras de *permafrost* da Antártica foram coletadas durante a Operação Antártica Brasileira XXVII e a 54ª Expedição Antártica Russa (verão 2008/2009). Amostras foram coletadas com o mesmo *drill* seco, porém, não foi utilizado o sistema de células marcadas. As amostras de *permafrost* foram extraídas de 4 e 9 m de profundidade e imediatamente descontaminadas em laboratório com uso de luvas e bisturis esterilizados (Figura 12d). Estas amostras representam, portanto, um perfil de profundidade (e tempo) de um mesmo ambiente (P13, P14, P16 e P17). Em seguida, um *data logger* com sensores de temperatura foi instalado para determinar o limite entre camada ativa e camada congelada do *permafrost*. A datação geológica e análise mineralógica destas amostras estão sendo conduzidas no Laboratório de Criosolos do IPCBPS/RAS.

Tabela 5 - Lista das amostras de *permafrost* estudadas neste trabalho.

Amostra	Identificação¹	Localização	Profundidade	Idade congelamento	Tipo	Informações
P01	1/98	Ártico, planície Kolyma	21,45 - 21,5 m	3,0 milhões de anos	Solo	Fim do Plioceno
P02	1/98	Ártico, planície Kolyma	8,10 - 8,25 m	1,8 milhões de anos	Solo	Fim do Plioceno
P03	3/07	Ártico, planície Kolyma	5,15 – 5,20 m	5.000 anos	Solo	Planície de rio
P04	516/07	Ártico, planície Kolyma	0-10 cm	Moderno	Solo	Superficial de tundra
P05	A11/08	Antártica, Ilha Rei George	6,75 - 6,80 m	~10.000 anos	Sed. marinho	
P06	4/91	Ártico, planície Kolyma	21,3 m	120.000 anos	Sed. marinho	
P07	1/07	Ártico, planície Kolyma	4,7 m	~10.000 - 15.000 anos	Solo	Fim do Pleistoceno
P08	A11/08	Antártica, Ilha Rei George	8,15 - 8,20 m	~20.000 - 30.000 anos	Solo	
P09	2/08	Ártico, planície Kolyma	7,95 m	n.d.	Solo	
P10	14/99	Ártico, planície Kolyma	17,80 - 17,85 m	120.000 anos	Sed. marinho	
P11	7/02	Ártico, vulcão Kamchatka	7,2-7,5 m	n.d. (~Alguns milhares)	Solo vulcânico	
P12	1/99	Antártica, Beacon Valley	14-15 m	8 milhões de anos	Solo	Amostra mais antiga
P13	1-1B09	Antártica, Ilha Rei George	4,6 m	n.d.	Sed. marinho	
P14	4-1B09	Antártica, Ilha Rei George	5,8 m	n.d.	Sed. marinho	
P15	7-1B09	Antártica, Ilha Rei George	6,9 m	n.d.	Sed. marinho	
P16	18-1B09	Antártica, Ilha Rei George	8,1 m	n.d.	Sed. marinho	
P17	21-1B09	Antártica, Ilha Rei George	9,2 m	n.d.	Sed. marinho	

¹ Nome de identificação na coleção de amostras do Laboratório de Criosolos (IPFQBS/Rússia); n.d. = ainda não determinado

Figura 12 - A) Ilha Rei George, indicando o ponto de amostragem (★); B) *Drill* seco utilizado na coleta; C) Amostra de *permafrost*; D) Assepsia da amostra recém coletada.

A biblioteca de genes deve representar ao máximo a diversidade real do ambiente. Desta forma, torna-se importante o emprego de um protocolo capaz de extrair o DNA do maior número de tipos celulares da amostra. A extração foi realizada com o kit PowerMax™ Soil DNA (Mo Bio), a partir de 10 g de cada amostra, segundo o protocolo do fabricante. Em qualquer pesquisa ambiental, as amostras estão sujeitas a contaminação durante os procedimentos de coleta e extração de DNA. Portanto, alguns cuidados devem ser tomados para evitar as contaminações e garantir a autenticidade dos resultados. Tais cuidados tornam-se fundamentais quando se tratar de amostras de difícil acesso e relativo baixo conteúdo biológico, como o caso do *permafrost* (WILLERSLEV et al., 2004). Desta forma, o procedimento de extração do DNA foi realizado em uma sala limpa e com materiais esterilizados descritos a seguir.

O procedimento de manipulação da amostra e extração do DNA foi realizado em uma sala limpa (*Molecular Biology Class Grade*) do Laboratório de Criossolo do IPFQBS/Rússia. A sala limpa era composta por um fluxo laminar Classe II e equipamentos de biologia

molecular dedicados para trabalho com amostras de *permafrost*. Antes de cada procedimento, um módulo portátil de ultra-violeta (UV-C) foi utilizado para esterilização da sala limpa, realizando disparos de radiação UV-C durante 120 segundos e consequente produção de gás ozônio. Todo o procedimento foi realizado com luvas, avental, máscara e touca esterilizados por radiação. Os materiais não fornecidos pelo kit, como e tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (Eppendorff, EUA) e tubos de centrífuga de 50 mL (TPP, Suíça) foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121 °C e 1 atm. Para evitar contaminação cruzada entre as amostras de *permafrost*, as extrações de DNA foram realizadas individualmente e em dias diferentes.

Após extraído, o DNA foi purificado em colunas de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (BERTHELET et al., 1996) para a remoção de possíveis inibidores de PCR. A concentração e qualidade do DNA extraído foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.3.2 Amplificação do gene 16S rRNA do *permafrost* por PCR e TempliPhitm

A amplificação de genes específicos por PCR nas amostras de *permafrost* pode ser impossibilitada em virtude da baixa concentração de DNA extraído destas amostras, como consequência de baixas concentrações celulares, presença de inibidores químicos, ou mesmo por danos na estrutura do DNA devido à ação das temperaturas baixas por milhares ou milhões de anos (WILLERSLEV et al., 2004). Neste contexto, optou-se por iniciar os experimentos com testes de amplificação do gene 16S rRNA para verificar a presença de DNA amplificável nas amostras de *permafrost*.

O DNA total extraído foi submetido à amplificação por PCR com os *primers* universais **27F** (5' - AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3') e **1401R** (5' - CGG TGT GTA CAA GAC CC - 3'), os quais correspondem às regiões 8 até 27 e 1401 até 1417 do gene 16S rRNA de *Escherichia coli*, respectivamente. A reação de PCR foi realizada com o kit Encyclo PCR kit (Evrogen, Rússia), composto de tampão Encyclo 1X, 0,2 mM de dNTPs e mix de DNA Polimerase 1X. A esta reação foram adicionados o par de *primers* (concentração final de 0,2 µM) e o DNA molde (10 ng), e a reação foi finalmente completada para um volume final de 25 µL com água Milli-Q. O programa de temperaturas utilizado foi composto de uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento de *primers* a 52 °C por 1 minuto, e extensão a 72 °C por 1,5 minuto. A extensão do último ciclo foi a 72 °C por 7 minutos (MITEVA et al., 2004).

As amostras que apresentaram baixas concentrações finais de DNA extraído, ou a não-amplificação do gene 16S rRNA por PCR, foram submetidas à amplificação do DNA total através do kit TempliPhi™ (GE Healthcare Life Sciences, EUA), segundo as especificações do fabricante. Este kit é capaz de amplificar o DNA total de uma amostra através do princípio da amplificação por círculo rolante (*rolling circle amplification*, RCA) usando *primers* curtos e aleatórios sob atividade da DNA Polimerase do bacteriófago $\Phi 29$ (LIZARDI et al., 1998). A quantidade e qualidade do DNA amplificado após a reação com TempliPhi™ foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.3.3 Amplificação do gene 16S rRNA do *permafrost* para DGGE

O perfil da comunidade das amostras de *permafrost* foi comparado em DGGE. A reação de PCR – na qual foram empregados os *primers* GC338F e 518R – seguiu os mesmos procedimentos descritos para as amostras de solo, descritos com detalhes no item 3.2.5. O produto de amplificação foi submetido à análise em DGGE utilizando-se o sistema Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California). Os géis utilizados foram preparados com poliacrilamida 8% (solução estoque 40% acrilamida/bis acrilamida 37,5:1; Bio Rad Laboratories, Inc.) em tampão TAE 1X. O gradiente de desnaturação utilizado foram 40-70% (no qual 100% de desnaturante continha 7 M de uréia e 40% de formamida). A eletroforese foi estabelecida a 60 V e 60 °C durante 14 h. Após a corrida, os géis foram corados com nitrato de prata, segundo o protocolo modificado de Sanguinetti et al. (1994), e a imagem foi obtida com auxílio de máquina fotográfica digital Canon Rebel XTi 10 Megapixels (Canon, Japão).

3.3.4 Análise dos perfis de DGGE

A análise multivariada dos perfis de bandas do DGGE foi realizada com o *software* BioNumerics (Applied Maths, Bélgica), como descrito no item 3.2.6.

Os perfis de DGGE das amostras de *permafrost* foram comparados através de um dendrograma de similaridade de bandas construído com métodos UPGMA e Neighbor Joining, e com os coeficientes de Jaccard e Dice.

3.3.5 Detecção dos genes funcionais através da amplificação por PCR

Os genes funcionais de degradação de alcanos foram amplificados com os *primers* degenerados **AlkF** (5' – GCI CAI GAR ITI RKI CAY AA – 3') e **AlkR** (5' – GCI TGI TGI TCI SWR TGI CGY TG – 3'), os quais geram um produto de amplificação de 542 pb. Ambos os *primers* foram construídos por Bellicanta (2004) para amostras de sedimento marinho da Antártica.

A reação de PCR utilizada para amplificar os genes funcionais seguiu dois protocolos. Inicialmente, no Laboratório de Criossolos do IPFQBS/Rússia, foi empregado o mesmo protocolo da amplificação do gene 16S rRNA descrito acima (Encyclo PCR kit, Evrogen), exceto pela concentração dos *primers*, os quais foram utilizados 1,2 μ M para Alk e α -ARHD. Em uma segunda etapa, no Laboratório de Ecologia de Micro-organismos do IO/USP, a reação de PCR foi otimizada para: tampão 1X (PCR buffer Invitrogen), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,8 mM de dNTPs, 0,6 μ M de cada *primer*, 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), e 20 ng de DNA molde da amostra em um volume final de 25 μ L. A reação de PCR original, descrita em Kuhn et al. (2009), foi otimizada para as baixas concentrações de DNA do *permafrost*, e aplicado em ambos os laboratórios descritos anteriormente. As condições de amplificação otimizadas consistiram de uma desnaturação inicial a 97 °C por 3 minutos, seguida de 38 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 48 °C e 1 minuto a 72 °C, com uma etapa final de extensão de 5 minutos a 72 °C. Os produtos de amplificação foram confirmados e quantificados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), utilizando como referência o marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, Brasil). Um controle positivo de reação foi preparado utilizando 25 ng de DNA dos isolado *Acinetobacter* sp. ADP1 (*alkM*). O controle negativo de reação foi preparado substituindo o volume do DNA molde pelo mesmo volume de água MilliQ esterilizada.

3.3.6 Construção da biblioteca de genes funcionais

A biblioteca de genes funcionais foi construída a partir de uma mistura de três repetições do produto de PCR, os quais foram purificados e concentrados com o kit DNA Clean e Concentratortm (Zymo Research, USA). Os produtos de PCR purificados foram clonados em plasmídeo pGEM-T Easy Vector System (Promega, EUA) seguindo as indicações do fabricante.

Após a ligação, os vetores foram inseridos em células competentes de *Escherichia coli* JM109 (Promega, EUA) por choque térmico a 42 °C por 45 segundos. Em seguida as células foram distribuídas em meio seletivo (LA acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina, 40 pg.mL⁻¹ de X-Gal e IPTG 0,2 µM) e incubadas a 37 °C por 16 horas (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

As colônias que apresentaram plasmídeos com insertos (brancas) foram repicadas em meio LA contendo 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina e incubadas a 37 °C por 14 horas. Após a incubação, uma pequena quantidade da colônia foi inserida em um tubo de microcentrífuga contendo a reação de PCR para amplificação do inserto. A reação de PCR possuía um volume final de 25 µL contendo tampão de PCR 1X, 1,7 mM de MgCl₂, 0,8 mM de dNTPs, 0,3 µM de cada *primer* e 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil). Para a amplificação dos insertos, foi utilizado o par de *primers* M13F (5' – GTT TTC CCA GTC ACG AC – 3') e M13R (5' – CAG GAA ACA GCT ATG AC – 3'), os quais hibridizam nas regiões do vetor adjacentes ao sítio de ligação do inserto. As reações de amplificação foram realizadas com ciclo inicial de desnaturação a 97 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, e 72 °C por 90 segundos, com extensão final a 72 °C por 5 min. O produto de PCR foi submetido ao sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (CEGH-USP), no qual utilizou-se o *primer* T7-Fwd (5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3') com temperatura de anelamento de 56 °C.

3.3.7 Análise *in silico* da biblioteca de genes funcionais do *permafrost*

A metodologia de análise *in silico* dos genes funcionais diferiu em alguns pontos daquela utilizada para as análises dos genes 16S rRNA. As alterações metodológicas foram necessárias pelo fato destas sequências codificarem proteínas funcionais e, principalmente, pela escassez de sequências depositadas nos bancos de dados.

Inicialmente, a qualidade do sequenciamento foi averiguada através da ferramenta Phred, disponível online no software *Electropherogram quality analysis* da EMBRAPA, e as sequências com *score* < 10 foram removidas. Em seguida, as sequências foram manualmente editadas no *software* BioEdit v7.0.9.0 (HALL, 1999), a fim de remover as sequências do vetor e dos *primers*.

A identificação das sequências foi realizada com o *software* BLAST v.2.2.23 (NCBI) através dos algoritmos Blastn e Tblastx. O método Blastn procura sequências de nucleotídeos

similares dentro do banco de dados de nucleotídeos (GenBank Nucleotide Collection), enquanto o método TBlastx busca sequências de nucleotídeos traduzidas em um banco de sequências de nucleotídeos também traduzidas. O TBlastx traduz as sequências de DNA inseridas pelo usuário e as sequências do banco de dados, de forma a criar sequências de aminoácidos a partir de todas as fases abertas de leitura (*Open Reading Frame*, ORF) e em ambos os sentidos, e executa a comparação. Este método é mais sensível que o Blastn para encontrar genes novos, nos casos onde a variabilidade é maior na sequência de nucleotídeos e menor na de aminoácidos.

As sequências mais similares, advindas de ambos os métodos, foram selecionadas como referências. Durante a seleção das sequências referências foi dada prioridade às sequências cuja origem seja de isolados microbianos descritos na literatura. Na impossibilidade, foram escolhidas as sequências da literatura obtidas através de métodos independentes de cultivo. Adicionalmente, as sequências de genes funcionais encontradas por Kuhn et al. (2009) em amostras de sedimentos marinhos da Antártica foram incluídas no grupo de referência para melhor comparar a diversidade encontrada em ambientes polares.

Um banco de sequências foi construído com os clones do *permafrost*, as sequências de sedimentos marinhos da Antártica, e sequências referências mais próximas. Este banco de sequências foi traduzido para aminoácidos no *software* BioEdit. As sequências de aminoácidos foram alinhadas com o *software* Clustal W (THOMPSON et al., 1994) e árvores filogenéticas foram construídas com sequências selecionadas deste banco de dados. As árvores foram construídas com o *software* MEGA 4 (TAMURA et al., 2007) utilizando o método Neighbor Joining, modelo de substituição da matriz PAM (Dayhoff), teste de bootstrap de 1000 repetições, e *gaps* foram considerados deleções par-a-par (*pairwise deletion*).

Duas estratégias foram utilizadas para separar os clones em famílias protéicas operacionais (OPF, *Operational Protein Families*). O primeiro método consistiu em gerar uma árvore filogenética contendo apenas as sequências dos clones. Esta árvore foi criada com a mesma metodologia descrita anteriormente, isto é, a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos traduzidos. O agrupamento das sequências foi analisado de forma a identificar grupos similares e diferentes.

O segundo método consistiu em calcular a distância genética entre cada par de sequências e separá-las em *rankings* de distância. O *software* Mothur v.1.9.0 (SCHLOSS et al., 2009) foi utilizado nos procedimentos desta metodologia. Inicialmente, uma matriz de distância foi construída com o método do vizinho mais distante (*furthest neighbor*) a partir

das sequências traduzidas e alinhadas dos clones de *permafrost*. Em seguida a matriz foi analisada para gerar tabela contendo *rankings* de abundância de sequências em diferentes *cutoffs*. Para determinar o *cutoff* que separa as OPF foi identificado na tabela de *rankings* a linha em que o número de famílias (e abundância de sequências em cada família) correspondesse ao mesmo perfil observado na árvore filogenética construída no primeiro método.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de apresentar os resultados de forma mais clara, a sessão "4 Resultados e Discussão" será tratada separadamente em cada um dos três objetivos do projeto:

(4.1) Diversidade microbiana em amostras de gelo da Antártica;

(4.2) Sucessão ecológica em solos expostos por recuo de geleira;

(4.3) Diversidade funcional de genes *alk* em solos *permafrost*.

4.1 Diversidade microbiana em amostras de gelo da Antártica

4.1.1 Contagem de células totais das amostras de gelo glacial por DAPI

A contagem de células totais (viáveis e não-viáveis) foi realizada com o uso do marcador DAPI nas amostras de gelo da geleira Baranowski (BAI-08, Península Antártica) e do Pólo Sul Geográfico (PSG). A contagem foi realizada sobre as membranas de nitrocelulose filtradas após o procedimento de descontaminação das amostras. As demais amostras de gelo da Península Antártica (Tabela 1, amostras 1-4) não foram analisadas por problemas logísticos durante o transporte das mesmas até o Brasil.

A quantidade de células presente nas duas geleiras analisadas foi considerada semelhante, sendo de aproximadamente $3,0 \times 10^4$ células por mililitro para a Geleira Baranowski e de $2,6 \times 10^4$ células por mililitro para o PSG. Estes valores são comparáveis aos obtidos em outros trabalhos e encontram-se cerca de uma ordem de grandeza abaixo do observado para o gelo marinho e neve; e uma ordem de grandeza maior que a concentração de células no gelo sobre o Lago Vostok (Tabela 7).

Tabela 6 - Comparação das concentrações de células bacterianas encontradas em diferentes ambientes criogênicos.

Concentração	Ambiente	Referência
$2,0 \times 10^5$ cel/mL	Neve sobre geleira	Skidmore 2000, Zhang 2002
$3,0 \times 10^5$ cel/mL	Lagos alpinos e polares	Alfreider 1996, Pearce 2003
$1,0 \times 10^5$ cel/mL	Gelo marinho do Ártico	Brinkmeyer 2003, Junge 2004a
$2,0 \times 10^4$ cel/mL	Nuvens polares	Amato 2005
$3,0 \times 10^4$ cel/mL	Geleira Baranowski	Este trabalho
$2,6 \times 10^4$ cel/mL	Pólo Sul Geográfico	Este trabalho
$3,0 \times 10^3$ cel/mL	Gelo Vostok	Priscu 1999, Abyzov 2001

4.1.2 Hibridização por sondas fluorescentes (FISH) das amostras de gelo

A análise por microscopia de fluorescência empregando-se a hibridização de sondas específicas para diferentes grupos taxonômicos indicou uma divergência na composição da comunidade de cada ambiente (Figuras 13 e 14). A geleira Baranowski apresentou maior abundância de indivíduos da Classe *Alphaproteobacteria* (58%), seguido das Classes *Gamma* (12%) e *Betaproteobacteria* (9%), enquanto foram observados poucos representantes da

Classe *Deltaproteobacteria* (2%). A amostra de gelo do PSG, por sua vez, apresentou os grupos *Beta* (41%) e *Alphaproteobacteria* (35%) como mais abundantes. Entretanto, indivíduos da Classe *Gammaproteobacteria* (2%) foram pouco observados na amostra continental. Ao contrário da amostra de Baranowski, a Classe *Deltaproteobacteria* foi encontrada com maior frequência no PSG (11%). Com relação ao Domínio *Archaea*, poucos representantes foram encontrados na Geleira Baranowski (1%), e um número maior na amostra do PSG (7%).

Figura 13 - Análise por microscopia de fluorescência das amostras de gelo da Geleira Baranowski (B) e do Pólo Sul Geográfico (PSG), coradas com DAPI (B1 e PSG1), e após hibridização com sondas específicas (B2 e PSG2).

Figura 14 - Distribuição percentual dos grupos de *Bacteria* e *Archaea* encontrados nas amostras de gelo da geleira Baranowski e do Pólo Sul Geográfico através da técnica de FISH. A porcentagem da comunidade foi calculada considerando 100% como a soma do total de células contadas pelo DAPI. A comunidade referida como "outros grupos" corresponde às células coradas por DAPI e que não hibridizaram com nenhuma sonda.

4.1.3 Extração de DNA e biblioteca de genes 16S rRNA das amostras de gelo

As amostras de gelo foram descontaminadas e descongeladas com os métodos descritos no item 3.1.2. Após o descongelamento, as amostras foram filtradas em membranas de éster de celulose de 0,22 µm de porosidade e estas membranas foram utilizadas para a extração do DNA total. O primeiro resultado obtido após a filtração das membranas foi a comparação do material particulado sobre as membranas (Figura 15). Estes materiais continham pequenas rochas, grãos de areia, poeira, e potencialmente células agregadas à superfície destes elementos, os quais muito provavelmente têm origem por ação do vento e deposição da neve (HUGHES et al., 2004). A geleira Ecology (amostra ECO-09) apresentou maior quantidade de material imerso no gelo, seguido da geleira Baranowski (BAI-09) (Tabela 8).

O método utilizado para extrair o DNA total das amostras resultou em pouca quantidade de DNA para as amostras da Península Antártica, e nenhuma quantidade de DNA para o PSG. A quantificação do DNA total revelada por NanoDrop[™], após a purificação e concentração, está apresentada na Tabela 8.

Figura 15 - Membranas de 0,22 mm após a filtração das amostras de gelo da Ilha Rei George, Antártica. Geleira Domeyko (DOM-09); Geleira Wanda (WAN-09); Geleira Znosko (ZNO-09); Geleira Ecology (ECO-09) e Geleira Baranowski (BAI-09).

Tabela 7 - Concentração final de DNA obtido após a extração do DNA total das amostras de gelo da Península Antártica e Pólo Sul Geográfico.

Amostra ¹	Volume filtrado (aproximado)	Massa do material filtrado ²	Concentração final de DNA ³ (em 10 µL)
DOM-09 a	810 mL	0,059 g	12,76 ng.µL ⁻¹
DOM-09 b	1.100 mL	0,082 g	17,36 ng.µL ⁻¹
ZNO-09 a	930 mL	0,047 g	6,8 ng.µL ⁻¹
ZNO-09 b	1.100 mL	0,071 g	6,9 ng.µL ⁻¹
WAN-09 a	720 mL	0,049 g	10,11 ng.µL ⁻¹
WAN-09 b	980 mL	0,067 g	13,88 ng.µL ⁻¹
ECO-09 a	1.150 mL	1,178 g	5,4 ng.µL ⁻¹
ECO-09 b	890 mL	0,758 g	4,6 ng.µL ⁻¹
BAI-09 a	670 mL	0,192 g	4,0 ng.µL ⁻¹
BAI-09 b	930 mL	0,368 g	10,88 ng.µL ⁻¹
*BAI-08 a	1.800 mL	n.d.	2,9 ng.µL ⁻¹
*BAI-08 b	800 mL	n.d.	0,6 ng.µL ⁻¹
*PSG a	250 mL	n.d.	0 ng.µL ⁻¹
PSG b	300 mL	n.d.	0 ng.µL ⁻¹

¹ As letras **a** e **b** referem-se a repetições de extração. As amostras sinalizadas com (*) correspondem às extrações de DNA antes de otimizar o protocolo.

² Massa total retida na membrana após a filtração da amostra de gelo descontaminada.

³ Concentração de DNA obtido após a purificação e concentração do volume final de extração (3 mL) para um volume de 10 µL de água MilliQ esterilizada. Quantificado em NanoDroptm.

Novas extrações foram realizadas na tentativa de obtenção de DNA da amostra PSG com algumas modificações no protocolo sugeridas pelo Dr. Brent Christner, Louisiana State

University, EUA (comunicação pessoal)⁵. Em princípio, a filtração de maior volume de amostra não foi possível devido à baixa quantidade de amostra disponível (um testemunho de gelo com aproximadamente 300 mL). Portanto optou-se por repetir o método de extração com o UltraClean[™] Water DNA Isolation Kit com as seguintes modificações: 1) Substituir a membrana de filtração do kit (0,22 µm, nylon, Φ47 mm) por membranas menores (0,22 µm poros, nitrocelulose, Φ13 mm); 2) Eluir o DNA em menor volume (1 mL ao invés de 3 mL) de água MilliQ pré-aquecida a 60 °C; 3) Utilizar diferentes volumes (1 a 10 µL) da amostra de gelo do PSG, sem filtrar, diretamente na reação de PCR.

Embora as modificações 1 e 2 acima descritas tenham aumentado a quantidade de DNA extraído em outras amostras de gelo, não foi possível observar quantidades detectáveis de DNA na amostra de gelo do PSG. Mesmo após a amplificação por PCR com volumes diretos da amostra, método que resultou em DNA amplificado para amostras de gelo acima do Lago Vostok (CHRISTNER et al., 2001), nenhum produto de reação foi detectado para a amostra PSG. Desta forma, a biblioteca de genes 16S rRNA foi construída apenas para as amostras de geleiras da Península Antártica.

O total de 121 clones com inserto foi obtido na construção das bibliotecas de genes 16S rRNA. A presença do inserto de tamanho esperado (1500 pb) foi confirmada em todos os clones através da amplificação por PCR da região específica do vetor. Os insertos dos clones de cada amostra foram sequenciados parcialmente com o *primer* T7-fwd e submetidos às análises em bioinformática.

Inicialmente a qualidade das sequências foi avaliada no *software* Phred. Apenas 2 sequências apresentaram *score* < 10 e foram descartadas (BAI-014 e ZNO-17). As demais amostras foram manualmente editadas para remover a sequência do vetor e dos *primers*. Após este procedimento, as sequências foram identificadas nos bancos de dados do RDP e GenBank e árvores filogenéticas foram construídas com as sequências de referência mais próximas.

A análise filogenética gerou uma árvore de distância com quatro grandes grupos, sendo eles os Filos Proteobacteria (67,6%), Actinobacteria (23,5%), Firmicutes (3%) e Cyanobacteria (5,9%).

O primeiro grupo, formado por filotipos mais similares ao Filo Proteobacteria, foi composto principalmente por membros da Classe Alphaproteobacteria (90%), onde se destacou o alto número de sequências similares ao gênero *Rhizobium* ($n = 63$ ou 52% de toda a

⁵ Correspondência eletrônica.

amostra). As maiores abundâncias destas sequências foram observadas nas geleiras Baranowski (BAI-09) e Znosko (ZNO-09), que juntas compreenderam 98,4% de todas as sequências afiliadas ao gênero *Rhizobium*. As demais sequências agrupadas à Classe Alphaproteobacteria foram similares com isolados dos gêneros *Brevundimonas*, *Sphingopyxis*, *Porphyrobacter*, *Paracoccus* e *Blastomonas*. Duas sequências (BAI-006 e ZNO-49) foram afiliadas à Classe Betaproteobacteria e ambas apresentaram maior identidade com sequências do gênero *Delftia*. Um clone foi agrupado na Classe Gammaproteobacteria, apresentando alta identidade com isolados do gênero *Stenotrophomonas*.

O segundo grupo foi composto por 16 filotipos alocados com membros de cinco famílias diferentes do Filo Actinobacteria. Duas sequências (BAI-028 e BAI-042) apresentaram alta identidade com membros da família Microbacteriaceae, em especial aos gêneros *Cryobacterium* (99% de identidade) e *Glaciibacter* (95% de identidade). Estes grupos possuem espécies de micro-organismos psicrófilos comumente encontrados em ambientes polares, como o solo da Antártica (SUZUKI et al., 1997) e cunhas de gelo dentro do *permafrost* (ASANO et al., 2009). Uma sequência (ZNO-50) apresentou afiliação à família Micrococcineae, cujo isolado mais próximo pertence ao gênero *Arthrobacter* (99% de identidade). As outras três sequências deste *cluster* apresentaram identidade com micro-organismos patógenos humanos dos gêneros *Propionibacterium* (99% identidade), *Corynebacterium* (99%) e *Mycobacterium* (98,8%).

O terceiro e último grupo foi composto apenas por duas sequências (BAI-075 e ECO-035), as quais apresentaram maior identidade (96%) com cianobactérias de diferentes ambientes. Estas duas sequências foram consideradas diferentes entre si e serão discutidas adiante.

De modo geral, as sequências encontradas nas amostras de gelo da Península Antártica representam grupos já encontrados em geleiras alpinas, do Ártico e da Antártica. Entre as bactérias mais predominantes de habitats criogênicos estão os bacilos Gram positivos formadores de endósporos (gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*). Estas bactérias foram detectadas e/ou isoladas no gelo do lago Vostok (ABYZOV et al., 2005), geleiras polares e alpinas (CHRISTNER et al., 2005) e na Groenlândia (CASTELLO et al., 2005). Outras bactérias comumente encontradas em amostras de gelo incluem membros de Actinobacteria (*Arthrobacter*), Alphaproteobacteria (*Sphingomonas* e *Methylobacterium*) e Gammaproteobacteria (*Acinetobacter*) (CHRISTNER et al., 2005).

O gênero *Rhizobium* é composto por bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a raízes de plantas vasculares, dentre os quais podem ser citados *Rhizobium radiobacter*

(sinônimo = *Agrobacterium radiobacter*) e *Rhizobium rubi* (YOUNG et al., 2001). Sequências com altas identidades ao gênero *Rhizobium* consideradas dominantes na amostra analisada também foram encontradas em geleiras do Monte Everest (EF190122) (LIU, Y. Dados não publicados)⁶ e no Tibete (EU527087-EU527088; LIU et al., 2009.). A presença de uma grande população de *Rhizobium* no gelo de Baranowski pode indicar a influência do transporte de detritos de solo para a geleira, ou ainda por transporte aéreo em correntes vindas da América do Sul. Há ainda a hipótese de que biases nos procedimentos de extração de DNA, amplificação do gene 16S rRNA ou na clonagem, tenham resultado em superestimativas da presença de *Rhizobium*. Entretanto, a alta abundância desse gênero também foi observada através de outras técnicas, mais especificamente quando a amostra BAI-09 foi submetida ao pirosequenciamento (item 4.2.7.4., Quadro 2), o que sugere não haver efeitos metodológicos no resultado da clonagem. Cabe ressaltar que a técnica de FISH aplicada à amostra de gelo de Baranowski também detectou abundância da Classe Alphaproteobacteria, a qual inclui o gênero *Rhizobium* (Figura 14). As sequências BAI-39 e BAI-44 apresentaram alta identidade com isolados do gênero *Brevundimonas*. Espécies deste gênero foram encontradas em ambientes extremos diversos, incluindo o interior da câmara de esterilização da Sonda Espacial Phoenix (FJ191585; LA DUC et al., 2007.) e em amostras de água condensada no interior da Estação Espacial Russa "MIR" (AB071954; LI et al., 2004). Em ambientes criogênicos, o gênero *Brevundimonas* foi descrito no *permafrost* (ZHANG et al., 2007), em geleiras da ilha de Svalbard (norte da Noruega) (FM955876; SHIVALI, S. Dados não publicados)¹, e foi isolado a partir de culturas de enriquecimento anaeróbico para psicrófilos em amostras de gelo da Groenlândia (AY169433; SHERIDAN et. al., 2003). Na Antártica, o gênero foi encontrado em amostras de aerosol e no solo da Ilha Rei George (EU429504; GONZALES-TORIL et al., 2008).

Membros da família *Sphingomonadaceae* são frequentemente isolados em amostras de gelo e em grandes profundidades sob a superfície (BALKWILL et al., 1997; CHRISTNER, 2002). Muitas espécies desta família possuem a capacidade de sobreviver longos períodos de tempo sob condições de baixo teor de nutrientes, como é o caso do ambiente glacial (CHRISTNER, 2002). Alguns isolados desta família como o caso das sequências altamente similares de *Blastobacter* sp. (U20772) e *Sphingopyxis* sp. (DQ376581) são conhecidos por sua capacidade na degradação de hidrocarbonetos aromáticos (FREDRICKSON et al., 1995; CUNLIFFE e KERTESZ, 2006).

⁶ Informações obtidas no GenBank.

Bactérias da classe Actinobacteria geralmente são encontradas em ambientes glaciais. Muitos membros deste grupo são psicrotróficos ou mesmo psicrofílicos obrigatórios, como as espécies *Leifsonia rubra* (REDDY et al., 2003) e *Cryobacterium psychrophilum* (SUZUKI et al., 1997). Dois clones (BAI-028 e BAI-042) apresentaram altos valores de identidade com organismos descritos no Ártico e na Antártica, incluindo bactérias dos gêneros *Frigoribacterium* (EU584512; LIU et al., dados não publicados)⁷ e *Cryobacterium* (BRAMBILLA et al., 2001). Sequências idênticas a estes clones também foram descritas em camadas de gelo perene sobre lagos hipersalinos da Antártica (Lake Vida, McMurdo Dry Valleys) (MOSIER et al., 2007). Ambos os clones também foram relacionados a aeróbios heterotróficos isolados do solo antártico (AISLABIE et al., 2006).

A presença de sequências similares a micro-organismos patogênicos humanos na amostra de gelo é questionável. Embora cuidados para evitar contaminação durante a coleta, transporte e processamento das amostras tenham sido tomadas, três clones apresentaram altos valores de identidades com sequências de *Propionibacterium* (DQ672259), *Corynebacterium* (DQ778040) e *Mycobacterium* (AY457082) do banco de dados. Ao gênero *Propionibacterium* pertencem bactérias comensais da pele humana, sendo a espécie *Propionibacterium acnes* seu maior representante (MCDOWELL et al., 2008). Entretanto, este gênero não está restrito ao habitat do hospedeiro e já foi encontrado em solos (ROSSI et al., 1999) e aquíferos contaminados com arsênio (EU735720; O'NEIL, S. M. Dados não publicados)⁸.

O gênero *Corynebacterium* é composto por um grupo de bactérias ecologicamente diversificadas que incluem linhagens patógenas e não-patógenas (DWORKIN et al., 2006). A espécie *Corynebacterium diphtheriae* é o agente causador da difteria humana e representa uma das espécies mais bem estudadas do gênero. Este grupo apresenta muitas espécies não-patógenas, como *C. glutamicum* e *C. ammoniagenes*, e incluem linhagens isoladas de solo, água marinha, alimentos, e pele de animais (DWORKIN et al., 2006). Um isolado identificado posteriormente como *C. mediolanum* foi obtido a partir de amostras de gelo de 500.000 anos da geleira Guliya (Platô Tibetano, China) (CHRISTNER, 2002).

Da mesma forma, o gênero *Mycobacterium* possui espécies patogênicas ao homem e incluem as espécies *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis*. A presença de sequências deste gênero já foi relatada em geleiras de 12.000 anos na Bolívia (AF479359; CHRISTNER, 2002), sugerindo alta resistência destes patógenos em ambientes criogênicos.

⁷ Informações obtidas no GenBank.

⁸ Informações obtidas no GenBank.

A espécie *Mycobacterium tuberculosis*, identificada através de métodos bioquímicos, foi descrita apenas uma vez na região sub-antártica habitando tecidos de um lobo marinho (*Arctocephalus tropicalis*) (BASTIDA et al., 1999).

Figura 16 - Árvore filogenética construída a partir dos clones da amostra de gelo da Ilha Rei George, Península Antártica, e sequências de referência com maiores valores de identidade do banco de dados RDP. A árvore foi construída com o método Neighbor Joining, com modelo de Kimura 2-parâmetros e teste de 1000 bootstraps. A escala indica a distância de similaridade dos ramos. Os clones, indicados em negrito, correspondem a sequências do inserto no sentido 5'-3' (*Forward*) das geleiras Baranowski (BAI), Ecology (ECO), Domeyko (DOM), Znosko (ZNO) e Wanda (WAN).

Figura 17 - Árvore filogenética construída a partir dos clones da amostra de gelo da Ilha Rei George, Península Antártica, e sequências de referência com maiores valores de identidade do banco de dados RDP. A árvore foi construída com o método Neighbor Joining, com modelo de Kimura 2-parâmetros e teste de 1000 bootstraps. A escala indica a distância de similaridade dos ramos. Os clones correspondem a sequências do inserto no sentido 3'-5' (*Reverse*) das geleiras Baranowski (BAI), Ecology (ECO), Domeyko (DOM) e Znosko (ZNO).

Os clones BAI-075 e ECO-035 apresentaram-se similares (80-96% de identidade) a sequências do Filo Cyanobacteria no banco de dados. As cianobactérias tem por característica um metabolismo fotossintetizante com oxigênio e, por este motivo, desempenham um papel fundamental na produção primária e ciclagem do carbono no ambiente. A distribuição deste grupo é cosmopolita e algumas espécies já foram observadas habitando ambientes frios e quentes. Na Antártica, elas podem ocorrer em simbiose (liquens) ou de vida livre, como criptoendolíticos (superfície ou interior de rochas), fitoplâncton marinho e lacustre, solos oligotróficos, e *mats* microbianos em lagos e água de degelo (FERNANDEZ-VALIENTE et al., 2001; FIORE et al., 2009; TATON et al., 2003). Muitas cianobactérias isoladas na

Antártica são psicrofílicas com o limite máximo de 20 °C de temperatura para crescimento (SEABURG, 1981). Bactérias do Filo Cyanobacteria também foram isoladas ou encontradas por técnicas independentes de cultivo em amostras de geleiras polares e alpinas (CHRISTNER, 2002; POGLAZOVA et al., 2001; STIBAL et al., 2006).

O clone ECO-035, obtido a partir do gelo da geleira Ecology (Península Antártica), apresentou maiores valores de similaridade com sequências de cianobactérias de vida livre isoladas na Antártica, como os gêneros *Phormidium* (EU852498), *Leptolyngbya* (Y493590), e *Nostoc* (AB325714) (Figura 17). Entretanto, este clone foi ainda mais similar a uma sequência de cianobactéria encontrada em solos da Antártica (EF220274) através de métodos independentes de cultivo (YERGEAU et al., 2007).

O clone BAI-075, por outro lado, apresentou maior similaridade com sequências de cloroplastos de células vegetais (DQ629585) e, simultaneamente, com sequências de cianobactérias encontradas em amostras de *permafrost* da Antártica (EU282441; VISHNIVETSKAYA, 2009). Este resultado pode ser interpretado sob diferentes pontos de vista. Primeiramente, a similaridade demonstrada entre o clone BAI-075 e a cianobactéria do *permafrost* pode ser considerada uma evidência que estes micro-organismos têm ampla distribuição geográfica, incluindo áreas extremas como o gelo e o *permafrost*. Além disso, cianobactérias das Ordens Oscillatoriales, Nostocales e Chroococcales foram relatadas como membros dominantes em alguns ambientes criogênicos (JUNGBLUT et al., 2010).

Em contrapartida, alguns materiais vegetais como algas e grãos de pólen são frequentemente encontrados na superfície e no interior de geleiras (BOURGEOIS, 2000; KOHSHIMA et al., 2007; WILLERSLEV et al., 1999). Neste sentido, pode-se supor que o método de extração de DNA empregado neste trabalho tenha sido eficaz na lise e separação do DNA vegetal contido na geleira. Uma possível origem do material vegetal na amostra de gelo de Baranowski pode ser atribuída à presença de musgos e gramíneas na região da Baía do Almirantado (neste caso, cerca de 500 m da área de coleta). Uma segunda proposição seria a origem por dispersão de plantas superiores através de correntes atmosféricas. O suporte a esta hipótese decorre do trabalho de Kappen e Straka (1988), no qual correlacionaram a deposição de pólenes na Baía do Almirantado com o transporte atmosférico por correntes da Patagônia.

4.2 Sucessão ecológica em solos expostos por recuo de geleira

4.2.1 Análise dos parâmetros físico-químicos do solo

O solo em frente à geleira Baranowski foi caracterizado como arenoso, alcalino (pH médio 8,41), com salinidade natural entre 0,16 – 0,40 mS.cm⁻². A amostra de solo BAS01 foi coletada sob a geleira (solo subglacial) e encontrava-se parcialmente congelada (temperatura - 0,3 °C). A presença de musgos foi registrada após 340 m da geleira (ponto BAS09). Após os 380 m (pontos BAS10 a BAS14), foram encontradas as gramíneas *Deschampsia antarctica* e *Colobanthus quitensis* e líquens; e registrou-se atividade animal (lobos marinhos, fezes de aves e alguns ossos de pinguins). O solo apresentou umidade em profundidades abaixo dos 5 cm do ponto BAS09 ao BAS14.

A análise dos parâmetros físico-químicos do solo demonstrou pouca variação entre as amostras (Tabelas 9 e 10). As análises estatísticas de *outliers* (valor estatisticamente atípico), através dos testes Z-score e Dixon's Q-test (DIXON, 1950), apontaram quantidades significativamente maiores de K, Mg⁺², NH₄⁺ e NO₃⁻ para a amostra mais distante da geleira (BAS14-04). O aumento destes elementos pode estar associado à presença de musgos, líquens, gramíneas e/ou animais nos últimos estágios da cronossequência, podendo refletir alterações na sucessão ecológica microbiana do solo. Os demais parâmetros foram considerados estáveis ao longo do transecto, embora uma discreta tendência de aumento de P tenha sido observada no sentido dos solos mais antigos.

Tabela 8 - Composição granulométrica, condutividade elétrica e pH das amostras de solo.

Amostra	pH	CE	Textura (%)			Classe Textural	Observações na coleta
			Areia	Silte	Argila		
BAS01-04	8,5	0,18	56	41	3	Arenosa	Solo congelado
BAS03-04	8,4	0,27	60	38	2	Arenosa	-
BAS04-04	8,3	0,40	78	18	4	Arenosa	-
BAS05-04	8,6	0,17	85	13	2	Arenosa	-
BAS06-04	8,7	0,17	73	25	2	Arenosa	-
BAS07-04	8,5	0,27	71	29	0	Arenosa	-
BAS08-04	8,6	0,16	65	33	2	Arenosa	Poucos musgos
BAS09-04	8,3	0,20	74	26	0	Arenosa	Poucas gramíneas
BAS11-04	8,1	0,36	78	19	3	Arenosa	Muitas gramíneas
BAS14-04	8,1	0,34	76	21	3	Arenosa	Gram. e animais

Onde: pH = aquoso; CE = Condutividade elétrica (salinidade) (mS.cm⁻²); Ca⁺² = Íon cálcio (cmol.dm⁻³); Obs: nenhuma diferença significativa encontrada para estes parâmetros com p ≤ 0,05 (testes Z-score e Dixon's Q-test)

Tabela 9 - Composição físico-química das amostras de solo.

Amostra	P	K	Ca ⁺²	Mg ⁺²	S	MO	P-rem	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻
BAS01-04	254,4	51	33,0	3,4	13,3	0,9	32,9	20,0	20,0
BAS03-04	276,8	73	29,4	4,9	17,1	0,8	34,7	20,0	20,0
BAS04-04	247,5	66	33,6	5,6	13,3	0,5	35,7	20,0	20,0
BAS05-04	193,8	61	35,4	5,7	10,8	0,3	36,7	20,0	13,3
BAS06-04	261,6	66	43,2	5,4	11,3	0,4	34,7	20,0	13,3
BAS07-04	293,2	67	33,6	4,5	18,3	0,4	34,7	20,0	20,0
BAS08-04	301,9	75	43,2	4,8	13,3	0,3	32,9	20,0	13,3
BAS09-04	311,0	78	41,4	5,1	10,8	0,5	34,7	20,0	13,3
BAS11-04	311,0	112*	30,0	5,4	14,3	0,8	35,7	26,6	13,3
BAS14-04	320,5	265*	30,6	9,3*	17,7	0,6	36,7	33,3*	26,6*

Onde: P = Fósforo (mg.dm⁻³); K = Potássio (mg.dm⁻³); Ca⁺² = Íon cálcio (cmol.dm⁻³); Mg⁺² = Íon magnésio (cmol.dm⁻³); S = Enxôfre (mg.dm⁻³); MO = Matéria orgânica total (dag.kg⁻¹ = % m/m ; cmol C.dm⁻³); P-rem = Fósforo remanescente (mg.L⁻¹); NH₄⁺ = Nitrogênio amoníaco (mg.dm⁻³); NO₃⁻ = Nitrogênio nitrato (mg.dm⁻³). A análise dos parâmetros Na, Zn, Fe, Mn, Cu e B não resultaram em quantidades detectáveis.

*Valores estatisticamente significativos para p ≤ 0,05 (testes Z-score e Dixon's Q-test)

As propriedades físico-químicas do solo da Baía do Almirantado foram avaliadas sob a perspectiva geológica durante os anos de 2002-2005 por Simas (2006), e incluíam amostras coletadas em áreas de recuo de geleira. Neste trabalho, os solos foram classificados segundo a sua localização como basalto-andesito (origem vulcânica), ácido sulfatado, pouco ornitogênicos ou ornitogênicos (influência de aves marinhas antárticas). Em termos comparativos, os parâmetros físico-químicos dos solos próximos à geleira Baranowski (BAS01 a BAS09) corroboram com os solos do grupo basalto-andesitos, enquanto os solos mais antigos do recuo da geleira (BAS11 e BAS14) apresentam-se mais similares aos solos pouco ornitogênicos – característicos por apresentarem maiores teores de carbono e nitrogênio (Tabela 11).

Tabela 10 - Comparação dos parâmetros físico-químicos entre os solos de Baranowski e de outras áreas da Baía do Almirantado.

Amostra	P	K	Ca ⁺²	Mg ⁺²	MO	N	Referência
BAS01-BAS09	267,53	67,13	36,60	4,93	5,1	1,33	Este trabalho
BAS11-BAS14	315,75	188,50	30,30	7,35	7,0	1,82	Este trabalho
Basalto-andesito	266,40	83,50	24,60	7,20	3,50	n.d.	SIMAS, 2006
Ácido sulfatado	39,70	55,20	10,10	5,00	5,00	n.d.	SIMAS, 2006
Pouco ornitogênico	252,40	291,80	13,10	6,40	12,20	2,70	SIMAS, 2006
Ornitogênico	1356,70	856,60	4,70	1,50	32,00	4,30	SIMAS, 2006

OBS: Os valores médios foram convertidos para as mesmas unidades, assumindo a densidade do solo de 1,37g.cm⁻³ (SIMAS, 2006): P (mg.dm⁻³), K (mg.dm⁻³), Ca⁺² (cmolc.dm⁻³), Mg⁺² (cmolc.dm⁻³), MO (C total, g.kg⁻¹), N total (NH₄⁺ + NO₃⁻, g.kg⁻¹), n.d. (não determinado).

4.2.2 Fluxo de CO₂ no solo de retração da geleira Baranowski

A respiração microbiana no solo exposto por recuo de geleira foi avaliada em termos de fluxo de CO₂. O experimento apresentou variações no fluxo de CO₂ nos solos analisados, revelando um aumento no fluxo ao longo da cronossequência (Figura 18, linha azul). A média de emissão de CO₂ entre as amostras BAS01 à BAS06, no início do recuo de geleira, foi de 0,07 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e aumentou para uma média de 0,14 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ entre as amostras BAS07 e BAS13. Estes valores são comparáveis ao fluxo de CO₂ observados em solos da Antártica, a exemplo dos Dry Valleys onde foram observados fluxos de -0,1 a 0,15 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (PARSONS et al., 2004; GREGORICH et al., 2006; BALL et al., 2009).

Fatores abióticos como a temperatura podem influenciar no metabolismo microbiano e, desta forma, causar alterações na taxa de respiração celular. A temperatura também pode influenciar na cinética química de compostos orgânicos alterando, da mesma forma, o fluxo de CO₂ para a atmosfera por meios abióticos. Por estes motivos foi registrada a temperatura interna da câmara do equipamento durante todo o experimento. As temperaturas médias registradas durante as análises não variaram entre as amostras e sugere, portanto, que as diferenças encontradas no fluxo de CO₂ devem-se a fatores biológicos (microbianos) (Figura 18, linha vermelha).

Figura 18 - Fluxo de CO₂ (linha azul) nas amostras de solo expostos por recuo da geleira Baranowski, Ilha Rei George, Antártica. A linha vermelha indica a temperatura média da câmara no momento da análise.

No contexto do recuo de geleiras, os estudos de respiração microbiana ainda são incipientes e estão restritos a alguns trabalhos no Ártico e em geleiras alpinas. Bekku et al. (2004) relataram um aumento na taxa de respiração microbiana ao longo de solos expostos pela geleira Ny-Ålesund, em Svalbard, Noruega. Embora a escala temporal desta cronossequencia seja maior (solos expostos entre 30 e 2000 anos), a respiração aumentou do solo mais recente ($0,48 \mu\text{gC.g}^{-1}$ do solo. h^{-1}) para o mais antigo ($1,29 \mu\text{gC.g}^{-1}$ do solo. h^{-1}). Estes autores correlacionaram estas diferenças ao aumento da biomassa microbiana nos solos mais antigos e à mudança de uma comunidade predominantemente bacteriana nos solos mais recentes para uma comunidade dominada por fungos nos solos antigos.

A transformação de bactérias para fungos como dominantes de comunidade em solos de exposição glacial também foi observada em geleiras do Estado de Washington, Estados Unidos (OHTONEN et al., 1999). Neste estudo, os autores analisaram a quantidade total de micro-organismos no solo e a porcentagem ativa em relação à taxa de respiração. Bactérias totais e ativas que compunham a comunidade no início do recuo (20 anos de exposição do solo) foram substituídas por fungos no final do transecto (80 anos). A taxa de respiração aumentou ao longo da cronossequencia e estabilizou após 60 anos, quando apresentou comunidades fúngicas que armazenavam o carbono como biomassa ao invés de realizar respiração.

4.2.3 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) das amostras de solo

O produto de amplificação com os *primers* GC338F e 518R das amostras de solo foi submetido à análise em DGGE com gradiente de desnaturação de 35% a 60% (Figura 19).

Uma árvore de distância dos perfis de bandas do DGGE foi construída com o *software* PC-Ord v4.30 empregando-se o coeficiente de Jaccard e o modelo de agrupamento Nearest Neighbor (Figura 20).

Figura 19 - Gel de eletroforese de gradiente desnaturalante (35%-65%) das amostras de solo da geleira Baranowski, *primers* GC338F-518R. Canaletas: 01- Controle + (*E. coli*); 02- BAS01-04; 03- BAS03; 04- BS04; 05- BS05; 06- BS06; 07- Controle + (*E. coli*); 08- BS07; 09- BS08; 10- BS09; 11- BS11; 12- BAS14-04; 13- Controle + (*E. coli*).

Figura 20 - Dendrograma de distância dos perfis de bandas das amostras de solo.

O dendrograma de distância revelou uma possível sucessão ecológica ao longo da cronossequência. Considerando o gradiente espaço-temporal do transecto, os *clusters* obtidos a partir dos perfis de bandas podem ser divididos em três grupos: a) Comunidade endógena, isto é, a comunidade que já existia no solo, representada pela amostra mais próxima à geleira (BAS01-04); b) Comunidade pioneira, sendo esta a comunidade que dá início à sucessão ecológica, representada pelas amostras intermediárias da cronossequência (BAS03-04 a BAS11-04); c) Um terceiro grupo, a comunidade secundária, composta pela amostra mais distante da geleira (BAS14-04).

Após a análise os perfis de bandas no *software* PC-ORD optou-se por validar a hipótese da sucessão ecológica através da análise dos perfis de bandas com o *software* BioNumerics, o qual emprega coeficientes diferentes para a construção de dendrogramas de distância, como o coeficiente de Dice, que considera a presença e ausência de bandas entre os perfis. Para tal, uma nova eletroforese foi preparada com o mesmo produto amplificado utilizando os gradientes de 40% e 70%, a fim de melhorar a separação dos perfis de bandas (Figura 21).

Figura 21 - Gel de eletroforese de gradiente desnaturalante (40%-70%) das amostras de solo da geleira Baranowski coletadas em 2004, amplificadas com os *primers* GC338F-518R. Canaletas: C – controle positivo *Exiguobacterium* sp.

O dendrograma construído pelo método UPGMA e coeficiente de Dice apresentou o mesmo agrupamento de perfis de bandas que o método anterior. A consistência dos resultados, mesmo com métodos e géis diferentes, suporta a hipótese de que há uma sucessão ecológica no transecto do solo exposto pela geleira Baranowski.

4.2.4 Análise de componentes principais (PCA)

A variação na comunidade microbiana encontrada nos perfis de bandas de DGGE pode estar correlacionada a diferenças nos fatores físico-químicos (Tabelas 9 e 10). Tais correlações foram avaliadas através da análise de componentes principais (PCA) entre os perfis de bandas e os diferentes parâmetros físico-químicos (Figura 22).

A análise mostrou interação entre os *clusters* de bandas do DGGE (Figura 20; *a*, *b* e *c*) e alguns componentes do solo. A comunidade mais próxima à geleira (*cluster a*) apresentou maior correlação com a matéria orgânica, o que sugere uma dependência maior desta comunidade à disponibilidade de carbono no início da sucessão ecológica. O grupo formado pelos organismos pioneiros da sucessão (*cluster b*) foram mais correlacionados ao cálcio e ao pH do solo. Por fim, a comunidade mais desenvolvida da sucessão ecológica (*cluster c*) apresentou maior tendência às variações de magnésio, potássio e nitrogênio (NH_4^+ e NO_3^-).

Figura 22 - Análise de componentes principais (PCA) entre os perfis de bandas de DGGE e diferentes parâmetros físico-químicos do solo de recuo da geleira Baranowski. Os vetores de Mg^{+2} , K, NH_4^+ e NO_3^- foram considerados significativos para a comunidade mais antiga (BAS14), o vetor para matéria orgânica total (OM) foi significativo para o solo recentemente exposto (BAS01), e o vetor Ca^{+2} para as amostras intermediárias da sucessão (BAS03 à BAS11).

4.2.5 Biblioteca do gene 16S rRNA das amostras de solo e gelo

Para melhor caracterizar as populações envolvidas na sucessão, as amostras mais próxima (BAS01-04) e mais distante da geleira (BAS14-04) foram selecionadas para a construção da biblioteca do gene 16S rRNA.

Após uma criteriosa análise inicial das sequências no *software* BioEdit, um total de 41 e 62 sequências foram consideradas de boa qualidade para as bibliotecas BAS01-04 e BAS14-04, respectivamente. Estas 103 sequências foram submetidas às análises de composição e estrutura de comunidade. Para melhor compreender a ecologia microbiana no recuo de geleira foi adicionada às análises de diversidade a biblioteca da comunidade do gelo Baranowski (BAI-08), descrita anteriormente no item 4.1.3, e que apresentou 52 sequências de boa qualidade.

4.2.6 Análise *in silico* das sequências de 16S rRNA do solo e gelo

A composição, riqueza e diversidade das amostras BAS01 (mais recentemente exposta) e BAS14 (mais antiga) foram avaliadas através da análise das sequências das bibliotecas de gene 16S rRNA. A riqueza e diversidade diminuíram do solo BAS01-04 para BAS14-04, e a composição de cada biblioteca foi diferente em termos de Filo, Classe e Gênero.

A análise de cobertura da amostra BAS01-04 revelou a necessidade de uma maior amostragem de clones para representar a diversidade real da amostra, tanto para Gênero quanto para Classe e Filo (Figura 23). A biblioteca BAS14-04 apresentou uma cobertura maior quando comparada à biblioteca BAS01-04, entretanto, ainda assim é necessária a análise de mais algumas sequências para a curva de rarefação atingir um platô para Gênero (Figura 24).

Figura 23 - Curva de rarefação de amostragem da biblioteca do solo BAS01-04.

Figura 24 - Curva de rarefação de amostragem da biblioteca do solo BAS14-04.

A riqueza e a diversidade das amostras foram calculadas através do *software* Dotur (Tabelas 12 e 13). A biblioteca BAS01-04 apresentou maior riqueza e maior diversidade quando comparada à biblioteca BAS14-04, considerando ambos os índices analisados. Entretanto, a análise de cobertura indica que ambas as bibliotecas possuem poucas sequências para que se possam aplicar os índices estatísticos com precisão.

Tabela 11 - Índices de riqueza (Ace e Chao) e diversidade (Simpson e Shannon) para as bibliotecas BAI-08, BAS01-04 e BAS14-04, sob um *cut-off* de 95% (Gênero).

Amostra	Número de Sequências	Riqueza		Diversidade	
		Ace	Chao	Simpson	Shannon
BAI-08	52	20,63	17,20	0,428	1,47
BAS01-04	41	203,96	169	0,007	3,56
BAS14-04	62	38,64	35,09	0,07	2,93

Tabela 12 - Índices de riqueza (Ace e Chao) e diversidade (Simpson e Shannon) para as bibliotecas BAI-08, BAS01-04 e BAS14-04, sob uma linha de corte de 75% (Filo).

Amostra	Número de Sequências	Riqueza		Diversidade	
		Ace	Chao	Simpson	Shannon
BAI-08	52	7,06	6,00	0,604	0,80
BAS01-04	41	38,98	34,20	0,053	2,80
BAS14-04	62	19,28	16,80	0,139	2,30

Para avaliar a composição de cada biblioteca, as sequências foram comparadas ao banco de dados do Ribosomal Database Project (Figura 25), e árvores filogenéticas foram construídas com as sequências de maiores identidades (Figuras 26-36).

Em geral, os clones de ambas as bibliotecas foram mais similares a sequências descritas em ambientes criogênicos incluindo tundra, gelo glacial, solo subglacial, lagos da

Antártica, *permafrost*, e solos polares e alpinos. Entretanto, os grupos dominantes foram diferentes entre as amostras próxima (BAS01) e distante da geleira (BAS14), tanto para Filos quanto para Gêneros.

No início da cronossequência (BAS01) os filotipos mais frequentemente encontrados foram similares a Actinomicetos (52,4%), membros das famílias *Intrasporangiaceae*, *Micrococaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Nocardiodaceae* e *Microbacteriaceae*. Bactérias destas famílias são comumente encontradas em solos e têm ampla distribuição geográfica. Cerca de 40% dos clones (9 sequências) da amostra BAS01 relacionados a Actinomicetos apresentaram alta identidade com sequências descritas em ambientes criogênicos. Cabe ressaltar que 6 filotipos desta amostra apresentaram-se similares ao gênero *Arthrobacter* (Actinobacteria, Micrococaceae), um Gram-positivo aeróbio característico de solos temperados. Isolados psicrotróficos e psicrófilos deste gênero são frequentemente observados em solos de regiões frias, incluindo a Antártica (SHIVAJI et al., 1989; GUPTA et al., 2004; CHEN et al., 2005; WANG et al., 2009). Um clone da amostra BAS01 apresentou baixa identidade com o banco de dados. A sequência mais próxima a este clone apresentou 87% de identidade e pertence a uma bactéria ainda não cultivada encontrada nos Dry Valleys da Antártica (FJ895053, LACAP et al. 2009, dados não publicados)⁹, seguido por um isolado psicrófilo de *Arthrobacter psychrolactophilus* (AF134179) com apenas 85% de identidade. Estes resultados sugerem que o clone BAS01-5-T7 pode representar uma espécie de *Arthrobacter* ainda não descrita.

Os actinomicetos presentes na amostra BAS14 apresentaram dois grupos comuns (*Nocardiodaceae* e *Microbacteriaceae*) e um grupo diferente (*Rubrobacteraceae*) daqueles presentes na amostra BAS01. Bactérias da família *Nocardiodaceae* incluem membros frequentemente encontrados em diferentes tipos de solos. Em regiões criogênicas, esta família foi descrita em habitats endolíticos da cordilheira de Albula (Alpes Suíços) (AB374384; HORATH et al., 2008, dados não publicados)¹⁰ e nos desertos secos e gelados dos Dry Valleys, Antártica (BABALOLA et al., 2008). Da mesma forma, à família *Microbacteriaceae* pertencem bactérias comumente encontradas em solos que variam do alcalino (YOON et al., 2006) ao criogênico, e muitas espécies foram isoladas em solos da Antártica (SUZUKI et al., 1997; KAMPFER et al., 2000; SHERIDAN et al., 2003). A família *Rubrobacteraceae* também é habitualmente encontrada no solo, mas ao contrário das famílias descritas anteriormente, este grupo possui linhagens termofílicas, halofílicas e resistentes à radiação e à

⁹ Informações obtidas no GenBank.

¹⁰ Informações obtidas no GenBank.

dessecação. Na Antártica, a presença deste grupo está associada a solos minerais de baixa umidade (SAUL et al., 2005; AISLABIE et al., 2006; SMITH et al., 2006; SHRAVAGE et al., 2007). A maior parte dos actinomicetos encontrados na amostra BAS14 foi alocada nesta família e podem, desta forma, representar espécies importantes na sucessão ecológica.

O Filo *Proteobacteria* foi encontrado em ambas as bibliotecas, representando uma parcela significativa da amostra BAS01 (20%) e a parte dominante da amostra BAS14 (72%). Os filotipos identificados do grupo incluem membros das Classes *Alpha*, *Beta*, *Gamma* e *Delta-proteobacteria*.

A amostra BAS01 apresentou 3 clones similares aos gêneros *Sphingopyxis* e *Sphingomonas* da classe *Alpha-proteobacteria*. Clones associados a estes gêneros também foram encontrados na amostra de gelo da geleira Baranowski (item 4.1.3), o que sugere a possibilidade de transporte de micro-organismos entre a geleira e o solo recém exposto. A Classe *Beta-proteobacteria* compreendeu 4 sequências (10%) na amostra BAS01 e todas foram altamente similares a fixadores de nitrogênio dos gêneros *Nitrospira*, *Aquaspirillum* e *Herbaspirillum*. Além destes grupos, foram detectadas cianobactérias fixadoras de nitrogênio com similares a isolados de *Microcoleus antarcticus* (CASAMATTA et al., 2005) e outras cianobactérias antárticas ainda não cultivadas (TATON et al., 2003). A presença destes grupos no início da sucessão ecológica sugere que o nitrogênio seja um fator limitante nos primeiros estágios do desenvolvimento da comunidade e, portanto, bactérias fixadoras de nitrogênio teriam vantagem seletiva na população.

No final da sucessão ecológica (BAS14), a comunidade dominante passou a ser formada por membros do Filo *Proteobacteria* (72,6%), sendo a maior parte composta pela Classe *Alpha-proteobacteria* (24 filotipos ou 38,7% do total). Destes, um total de 20 clones (32%) obteve alta identidade a sequências da família *Sphingomonadaceae* (*Proteobacteria*, *Alpha-proteobacteria*). Bactérias desta família são encontradas em diversos ambientes, incluindo água marinha, lagos, solos e associados a raízes de plantas. A ampla distribuição deste grupo ocorre devido à sua diversidade metabólica capaz de utilizar diferentes compostos orgânicos e ao fato de sobreviver em condições de baixa disponibilidade de nutrientes (BALKWILL et al., 2006). Muitos gêneros da família *Sphingomonadaceae* foram detectados em diferentes ambientes da Antártica, que incluem o solo (BARANIECKI et al., 2002), a cobertura de gelo perene do Lago Vida (MOSIER et al., 2007) e o gelo glacial sobre o Lago Vostok (CHRISTNER et al., 2001). Este grupo também foi observado em ambas as amostras de solo da geleira Baranowski, sugerindo que este grupo possui adaptações ao ambiente antártico e tem importante papel na sucessão ecológica.

A amostra BAS14 apresentou um clone similar a uma *Rickettsia* (Proteobacteria, Alpha-proteobacteria) endossimbionte do protozoário *Acanthamoeba* sp. Existem poucos relatos de protozoários na Antártica, contudo o gênero *Acanthamoeba* foi encontrado habitando a região dos Dry Valleys (BROWN et al., 1982; BAMFORTH et al., 2005). Um estudo nas Ilhas Signy correlacionou a presença de protozoários com áreas de maiores teores de matéria orgânica habitadas por musgos, o que corrobora com o fato da presença indireta de protozoários na amostra BAS14 (SMITH, 1984).

Com relação à Classe *Beta-proteobacteria*, a amostra BAS14 apresentou clones similares a metilotróficos dos gêneros *Methylophilus* e *Methylibium*, e sequências de bactérias ainda não cultivadas encontradas em solos expostos por geleira no Alasca (DQ228415, SKIDMORE et al., 2005), gelo dos Alpes Suíços (AJ867658, Yuhana M. 2005) e solo da Antártica (FJ464985, TAM e WONG 2008, dados não publicados)¹¹. A amostra BAS14 apresentou um clone com alta identidade a isolados do gênero *Thiobacillus* (EU685841, KELLERMANN e GRIEBLER, 2009). Em geral, estas bactérias são acidófilas, halofílicas e obtêm energia através da redução de compostos inorgânicos, principalmente os derivados de enxofre e ferro. Considerando que o solo da geleira Baranowski apresentou pH alcalino (Tabela 9), a presença de bactérias do gênero *Thiobacillus* sugere a existência de micronichos com gradientes de pH e/ou compostos inorgânicos no solo.

A amostra BAS14 apresentou mais sequências relacionadas à *Gamma-proteobacteria* quando comparada à BAS01. Apenas uma sequência da biblioteca BAS01 foi considerada *Gamma-proteobacteria* e obteve maiores valores de identidade com isolados do gênero *Thermomonas*. No entanto, a amostra BAS14 apresentou três clones similares a isolados de diferentes espécies de *Thermomonas*. Este gênero tem por característica um metabolismo quimio-organotrófico sem uso de carboidratos, e com temperatura de crescimento entre 18-50 °C (BUSSE et al, 2002). A presença de *Thermomonas* no início e final da sucessão ecológica pode representar a reintrodução de bactérias durante o desenvolvimento do ecossistema ou a adaptação e resistência deste micro-organismo aos extremos do ambiente antártico. Esta última hipótese é reforçada pelo fato de *Thermomonas* ter sido encontrada em salas de esterilização após serem descontaminadas (EU071527, NELLEN, 2007).

Micro-organismos fototróficos foram identificados em ambas as bibliotecas, entretanto grupos diferentes tomaram parte do início e final da sucessão ecológica. A amostra BAS01 apresentou um clone representando cianobactérias já descritas na Antártica, a exemplo de

¹¹ Informações obtidas no GenBank.

Microcoleus antarcticus citado anteriormente (CASAMATTA et al., 2005). No final da sucessão ecológica (BAS14) foram encontrados clones similares ao grupo das fototróficas anoxigênicas, como bactérias verdes não-sulfurosas do Filo *Chloroflexi* e bactérias púrpuras não sulfurosas do gênero *Rhodoplanes* (Proteobacteria, Alpha-proteobacteria, Hyphomicrobiaceae).

Figura 25 - Composição de Filo nas bibliotecas de gene 16S rRNA das amostras de gelo (BGI = BAI-08), e solo (BGS01 = BAS01-04 ; BGS14 = BAS14-04).

Figura 26 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS01 e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Construída com o método Neighbor Joining, modelo Kimura 2 parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas.

Figura 27 - Árvore filogenética gerada a partir dos clones da amostra BAS01 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para o Filo *Actinobacteria*. Construída com o método Neighbor Joining, modelo Kimura 2 e teste de *bootstrap* de 1000 repetições.

Figura 28 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS01 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para o Filo *Proteobacteria*.. Construída com o método Neighbor Joining, modelo Kimura 2 parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas.

Figura 29 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS01 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para o Filo *Bacteroidetes*. Construída com o método Neighbor Joining, modelo Kimura 2 parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas.

Figura 30 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS01 e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Em detalhe os Filos *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Verrucomicrobia* e *Actinobacteria* ainda não-classificados. Construída com o método Neighbor Joining, modelo Kimura 2 parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas.

Figura 31 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS14 e as sequências com maiores identidades no banco de dados. Em detalhe os Filos *Acidobacteria*, *Bacteroides*, *Chloroflexi* e *Gemmatimonadetes*. Construída com o método Neighbor Joining, modelo Kimura 2 parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas.

Figura 32 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS14 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para o Filo *Actinobacteria*. Construída com o método Neighbor Joining, modelo Kimura 2 parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas.

Figura 33 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS14 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe *Alpha-proteobacteria*. Construída com o método Neighbor Joining, modelo Kimura 2 parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas.

Figura 34 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS14 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe *Beta-proteobacteria*. Construída com o método Neighbor Joining, modelo Kimura 2 parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas.

Figura 35 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS14 e as sequências com maiores identidades no banco de dados, em detalhe a Classe *Delta-proteobacteria*. Construída com o método Neighbor Joining, modelo Kimura 2 parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas.

Figura 36 - Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento entre os clones da amostra BAS14 e as sequências com maiores identidades no banco de dados para a Classe *Gamma-proteobacteria*. Construída com o método Neighbor Joining, modelo Kimura 2 parâmetros e teste de *bootstrap* de 1000 réplicas.

4.2.7 Análise da sucessão ecológica no solo exposto pela geleira Baranowski através da técnica de pirosequenciamento

O DNA total extraído das amostras de solo coletadas em 2004 e 2009, bem como da amostra de gelo da geleira Baranowski (BAI-09), foi submetido ao pirosequenciamento no laboratório do Prof. Dr. James Tiedje, da Michigan State University, EUA. Inicialmente as sequências dos *primers* e do *barcode* foram removidas, e uma tabela com o número e comprimento das sequências obtidas foi criada (Tabela 14).

Tabela 13 - Lista das amostras submetidas ao pirosequenciamento, número total e comprimento médio das sequências.

Amostra	Número de sequências	Comprimento das sequências ¹
BAI-09	2.529	205
BAS01-04	3.287	205
BAS03-04	2.596	205
BAS05-04	3.381	205
BAS07-04	2.369	205
BAS09-04	2.421	205
BAS11-04	3.091	205
BAS14-04	3.125	205
BAS01-09	2.524	205
BAS02-09	333	205
BAS04-09	3.541	205
BAS06-09	3.309	205
BAS08-09	0	0
BAS10-09	3.449	206
BAS12-09	3.613	205
Total de sequências	39.568	
Média de sequências	2.827	

¹ Comprimento médio das sequências de cada amostra após a remoção dos *primers* e do *barcode*.

As quinze amostras submetidas compreendem: uma amostra de gelo da geleira Baranowski (BAI-09), sete amostras do solo coletado em 2004 (BAS01-04 a BAS14-04) e sete amostras do solo coletado em 2009 (BAS01-09 a BAS12-09). O número total de sequências obtidas no experimento foi de 39.568 sequências com a média de 2.827 sequências por amostra. Esta quantidade de sequências é aproximadamente uma ordem de grandeza acima da quantidade obtida em experimentos tradicionais de clonagem e sequenciamento pela técnica de Sanger. Entretanto, a amostra BAS08-09 não apresentou nenhuma sequência, e a amostra BAS02-09 apenas 333 sequências. A ausência ou baixo número de sequências nestas amostras pode ser consequência da baixa qualidade do DNA extraído (impurezas) ou concentração insuficiente para as reações de pirosequenciamento.

4.2.7.1 Estimativa de riqueza e diversidade das amostras de Baranowski analisadas por pirosequenciamento

Inicialmente foi calculada a estimativa de rarefação de OTUs das amostras para diferentes *cutoffs* (Figuras 37-39). Os dados foram plotados em função do número de sequências analisadas, o que resulta em uma curva de rarefação. Tais curvas são úteis para indicar se sequências de DNA analisadas representam a riqueza de organismos de uma comunidade.

Figura 37 - Curvas de rarefação estimadas para a amostra de gelo da geleira Baranowski coletada em 2009. As estimativas foram calculadas para os *cutoffs* de espécie (0,03), gêneros (0,05), famílias (0,10) e filos (0,20). Ordenada: número de OTU únicas; Abscissa: número de sequências analisadas.

Figura 38 - Curvas de rarefação estimadas para as amostras de solo de Baranowski coletadas em 2004. As estimativas foram calculadas para os *cutoffs* de espécie (0,03), gêneros (0,05), famílias (0,10) e filos (0,20). Ordenada: número de OTU únicas; Abscissa: número de sequências analisadas.

Figura 39 - Curvas de rarefação estimadas para as amostras de solo de Baranowski coletadas em 2009. As estimativas foram calculadas para os *cutoffs* de espécie (0,03), gêneros (0,05), famílias (0,10) e filós (0,20). Ordenada: número de OTU únicas; Abscissa: número de sequências analisadas.

As curvas de rarefação para as amostras de gelo e solo de Baranowski demonstraram que o esforço amostral não foi suficiente para cobrir a riqueza de espécies (0,03), gêneros (0,05) e famílias (0,10) em nenhuma das amostras. Entretanto, as curvas empregando o *cutoff* de Filo (0,20) começam a apresentar um platô por volta de 3000 sequências analisadas, sugerindo que a estimativa de riqueza de Filós das amostras foi contemplada. A curva de

rarefação da amostra de gelo (BAI-09, Figura 37) apresentou menores estimativas de riqueza em todos os *cutoffs*, quando comparada às curvas das amostras de solo (por exemplo, 268 espécies em 2529 sequências). A amostra de solo BAS02-09 (Figura 39) apresentou claramente uma curva de rarefação mais inclinada em todos os *cutoffs*. Este resultado, que sugere haver maior riqueza taxonômica nesta amostra, pode ter ocorrido também como efeito de cálculo da estimativa de riqueza devido ao pouco número de sequências (333 sequências).

As estimativas de diversidade das amostras de solo coletadas em 2004 e 2009 junto à frente da geleira Baranowski (BAS01-04 e BAS01-09) apresentaram diferenças, apesar de corresponderem ao solo exposto pelo mesmo tempo. O solo BAS01-04 apresentou maiores estimativas de espécies, gêneros e famílias quando comparado ao solo BAS01-09 (Figuras 38 e 39). Em BAS01-04 a curva de rarefação para espécies, por exemplo, está mais inclinada e estima > 1000 espécies em 3287 sequências analisadas. A BAS01-09, por outro lado, indicou apenas 331 espécies em 2524 sequências analisadas. Ao comparar as duas amostras em função do mesmo número de sequências analisadas (2524), a curva de rarefação de BAS01-04 estimou 815 espécies, ou seja, 484 espécies a mais que BAS01-09. Estes resultados sugerem que a amostra coletada em 2004 possui maior riqueza estimada que a amostra coletada em 2009, e que este resultado não parece ser reflexo do menor número de sequências analisadas na amostra de 2009.

Os índices de riqueza e diversidade para as amostras de Baranowski foram calculados a partir de uma matriz de distância entre as sequências. Os intervalos de *cutoffs* 3%, 5%, 10% e 20% foram selecionados e os resultados encontram-se nas Tabela 15.

Tabela 14 - Número de OTUs únicas e índices de alfa-diversidade estimados para as sequências do gelo e solo de Baranowski obtidas através do pirosequenciamento. Valor de *cutoff* 0,03.

0.03	Sobs	Chao1	Ace	Shannon	Simpson
BAI-09	268	505	762	3.661	0.103
BAS01-04	951	1987	2744	6.062	0.005
BAS03-04	491	812	1062	4.981	0.026
BAS05-04	1023	1908	2788	5.957	0.009
BAS07-04	677	1303	1863	5.605	0.010
BAS09-04	524	919	1229	5.154	0.017
BAS11-04	857	1581	2081	5.880	0.007
BAS14-04	604	1098	1457	5.164	0.014
BAS01-09	331	789	1332	4.083	0.041
BAS02-09	200	416	425	5.035	0.008
BAS04-09	835	1198	1245	5.592	0.020
BAS06-09	772	1313	1868	5.634	0.009
BAS10-09	1112	2044	2822	6.283	0.004
BAS12-09	945	1858	2736	5.827	0.010

Tabela 15 - Número de OTUs únicas e índices de alfa-diversidade estimados para as sequências do gelo e solo de Baranowski obtidas através do pirosequenciamento. Valor de *cutoff* 0,05.

0.05	Sobs	Chao1	Ace	Shannon	Simpson
BAI-09	190	319	420	3.425	0.110
BAS01-04	786	1502	1990	5.773	0.007
BAS03-04	407	661	868	4.607	0.036
BAS05-04	841	1464	2011	5.602	0.015
BAS07-04	577	1023	1438	5.345	0.012
BAS09-04	435	686	920	4.839	0.024
BAS11-04	686	1223	1527	5.577	0.009
BAS14-04	506	821	1094	4.952	0.016
BAS01-09	261	666	1107	3.797	0.048
BAS02-09	190	382	437	4.948	0.009
BAS04-09	706	958	973	5.362	0.022
BAS06-09	649	1067	1352	5.387	0.012
BAS10-09	972	1745	2281	6.111	0.005
BAS12-09	802	1451	1996	5.582	0.012

Tabela 16 - Número de OTUs únicas e índices de alfa-diversidade estimados para as sequências do gelo e solo de Baranowski obtidas através do pirosequenciamento. Valor de *cutoff* 0,10.

0.1	Sobs	Chao1	Ace	Shannon	Simpson
BAI-09	112	143	148	3.070	0.123
BAS01-04	540	816	1041	5.215	0.014
BAS03-04	308	438	537	4.368	0.039
BAS05-04	570	915	1139	5.145	0.019
BAS07-04	442	715	941	5.010	0.016
BAS09-04	325	474	608	4.488	0.032
BAS11-04	496	887	1110	5.119	0.012
BAS14-04	379	575	690	4.635	0.020
BAS01-09	198	416	553	3.270	0.075
BAS02-09	166	275	298	4.763	0.012
BAS04-09	510	637	646	5.002	0.025
BAS06-09	475	681	853	5.025	0.016
BAS10-09	734	1220	1436	5.746	0.007
BAS12-09	588	957	1164	5.085	0.021

Tabela 17 - Número de OTUs únicas e índices de alfa-diversidade estimados para as sequências do gelo e solo de Baranowski obtidas através do pirosequenciamento. Valor de *cutoff* 0,20.

0.2	Sobs	Chao1	Ace	Shannon	Simpson
BAI-09	58	66	65	2.772	0.136
BAS01-04	235	310	301	4.407	0.022
BAS03-04	181	217	229	3.930	0.044
BAS05-04	250	344	324	4.265	0.031
BAS07-04	231	320	428	4.188	0.030
BAS09-04	183	244	295	3.920	0.041
BAS11-04	247	387	453	4.361	0.021
BAS14-04	206	257	267	4.061	0.032
BAS01-09	129	221	204	2.980	0.094
BAS02-09	110	145	157	4.279	0.019
BAS04-09	261	317	308	4.356	0.034
BAS06-09	250	336	331	4.328	0.024
BAS10-09	383	529	503	5.042	0.012
BAS12-09	284	446	396	4.373	0.028

A amostra de gelo de Baranowski (BAI-09) apresentou uma riqueza calculada pelos índices de Ace e Chao1 menor que a riqueza das amostras de solo, em todos os *cutoffs* analisados. Este resultado corrobora com as estimativas da curva de rarefação e sugerem que a comunidade do gelo tenha um menor número de táxa quando comparado ao solo. Da mesma forma, a amostra de solo BAS02-09 apresentou menores valores de Ace e Chao1 em relação às outras amostras de solo. Assim como ocorreu na estimativa pela curva de rarefação, a menor riqueza calculada por Ace e Chao1 pode estar relacionada ao baixo número de sequências de BAS02-09.

Os índices Ace e Chao1, comparados entre si numa mesma amostra, apresentaram diferenças nas estimativas do número de taxa. Resultados mais consistentes entre os dois índices foram observados em *cutoffs* mais baixos, como 0,20 para número total de Filos. Por exemplo, para a amostra BAS01-09 a estimativa no *cutoff* 0,03 foi de 789 espécies com o índice Chao1, e 1332 espécies com Ace (Tabela 15). Quando analisado o *cutoff* de 0,20 para esta mesma amostra, a estimativa foi de 221 filos por Chao1 e 204 filos por Ace (Tabela 18).

Os índices Shannon e Simpson revelaram que a amostra de gelo de Baranowski (BAI-09) tem menor diversidade quando comparado às outras amostras, em todos os *cutoffs* analisados. A baixa riqueza e diversidade observada para o gelo pode ser reflexo do grande número de sequências identificadas como *Rhizobium* sp., isto é, alta dominância dessas sequências na comunidade. De forma semelhante, a amostra BAS01-09 apresentou os

menores índices de Shannon e Simpson quando comparado às outras amostras de solo. O solo BAS01-09 apresentou grupos dominantes diferentes das outras amostras, entre eles os gêneros *Thiobacillus*, *Rhodoferax*, *Gemmatimonas*, *Pseudomonas*, *Perlucidibaca* e *Azospira*. Exceto por *Gemmatimonas* e *Pseudomonas*, os outros gêneros não foram considerados dominantes nas outras comunidades, e alguns como *Perlucidibaca* e *Azospira* foram ausentes ou extremamente raros (Quadro 2).

Os índices de riqueza e diversidade não foram constantes quando considerado o desenvolvimento da comunidade ao longo do espaço-tempo (Figuras 40 e 41).

Figura 40 - Índices de riqueza Chao1 e Ace calculados para as amostras de gelo (BAI-09) e solo exposto por recuo da geleira Baranowski (BAS01 a BAS14). Dados obtidos a partir do pirosequenciamento das amostras de solo coletadas em 2004, analisados sob um valor de *cutoff* 0,1.

Figura 41 - Índices de diversidade Shannon e Simpson calculados para as amostras de gelo (BAI-09) e solo exposto por recuo da geleira Baranowski (BAS01 a BAS14). Dados obtidos a partir do pirosequenciamento das amostras de solo coletadas em 2004, analisados sob um valor de *cutoff* 0,1.

Os índices de Ace e Chao1 apresentaram uma flutuação ao longo do transecto (Figura 40). Da mesma forma, os índices de diversidade Shannon e Simpson apresentaram variações ao longo do tempo (Figura 41). No entanto, as flutuações nas estimativas de diversidade foram menos acentuadas que as observadas nos índices de riqueza. Essas variações sugerem que a sucessão ecológica em solos expostos por recuo de geleira seja um processo dinâmico, envolvendo a entrada e extinção de alguns táxa ao longo do tempo.

Cabe lembrar que em paralelo à exposição do solo por recuo da geleira, a comunidade microbiana também está exposta às variações sazonais e anuais do clima, como pode ser observado no banco de dados meteorológicos do INPE para a região.

4.2.7.2 Comparação da estrutura de comunidade das amostras de Baranowski através de métodos baseados em OTU

A comparação da estrutura de comunidade por métodos baseados em OTU permite quantificar a riqueza e a diversidade compartilhada entre duas ou mais amostras. Este tipo de análise ecológica é também conhecido como beta-diversidade.

Os índices de beta-diversidade foram calculados entre as amostras de gelo e solo de Baranowski. Nesta etapa, apenas as amostras de gelo da geleira (BAI-09) e do solo exposto coletado em 2004 (BAS01-04 à BAS14-04) foram utilizadas nos cálculos, exceto na comparação das amostras de solo recém expostos, na qual adicionou-se a amostra BAS01-09. O resultado dos índices de beta-diversidade para os *cutoffs* 0,03, 0,05, 0,10 e 0,20 estão apresentados nas Tabelas 19-22.

Tabela 18 - Índices de beta-diversidade calculados entre as amostras de gelo e solo de Baranowski coletado em 2004, para um *cutoff* de 0,03.

Amostras comparadas		Índices de beta-diversidade ¹						
		Sharedsobs	Sharedace	Sharedchao	Jclass	Sorclass	Jabund	Thetayc
BAI08	BAS0104	15	48.98	54.58	0.012	0.025	0.007	0.001
BAI08	BAS0304	11	13.46	12.75	0.015	0.029	0.010	0.000
BAI08	BAS0504	15	26.52	21.25	0.012	0.023	0.016	0.001
BAI08	BAS0704	11	15.00	14.67	0.012	0.023	0.010	0.001
BAI08	BAS0904	10	9.96	12.50	0.013	0.025	0.014	0.000
BAI08	BAS1104	9	21.59	24.50	0.008	0.016	0.009	0.000
BAI08	BAS1404	19	25.09	25.25	0.022	0.044	0.021	0.001
BAS0104	BAS0304	137	230.26	245.24	0.105	0.190	0.311	0.031
BAS0104	BAS0504	237	440.78	491.59	0.136	0.240	0.441	0.140
BAS0104	BAS0704	211	409.81	391.74	0.149	0.259	0.468	0.148
BAS0104	BAS0904	213	360.85	380.58	0.169	0.289	0.389	0.155
BAS0104	BAS1104	310	592.99	625.65	0.207	0.343	0.550	0.288
BAS0104	BAS1404	129	210.46	325.16	0.090	0.166	0.322	0.043
BAS0304	BAS0504	194	326.96	339.03	0.147	0.256	0.476	0.385
BAS0304	BAS0704	155	318.86	267.77	0.153	0.265	0.422	0.115
BAS0304	BAS0904	116	203.45	202.48	0.129	0.229	0.391	0.127
BAS0304	BAS1104	153	244.61	264.64	0.128	0.227	0.354	0.123
BAS0304	BAS1404	167	255.95	284.81	0.180	0.305	0.547	0.328
BAS0504	BAS0704	274	488.03	617.75	0.192	0.322	0.619	0.509
BAS0504	BAS0904	235	448.74	460.31	0.179	0.304	0.600	0.427
BAS0504	BAS1104	254	507.61	472.59	0.156	0.270	0.509	0.335
BAS0504	BAS1404	240	479.98	1058.64	0.173	0.295	0.569	0.242
BAS0704	BAS0904	245	378.51	502.89	0.256	0.408	0.734	0.528
BAS0704	BAS1104	281	485.91	523.71	0.224	0.366	0.667	0.428
BAS0704	BAS1404	148	252.31	272.60	0.131	0.231	0.440	0.120
BAS0904	BAS1104	272	418.36	448.53	0.245	0.394	0.676	0.482
BAS0904	BAS1404	126	296.96	283.04	0.126	0.223	0.412	0.101
BAS1104	BAS1404	141	264.36	311.79	0.107	0.193	0.361	0.136

¹ Sharedsobs: número de OTU compartilhadas observadas; Sharedace: índice de ACE compartilhado; Sharedchao: índice de Chao1 compartilhado; Jclass: coeficiente de similaridade de Jaccard; Sorclass: coeficiente de similaridade de Sorensen; Jabund: abundância baseada no coeficiente de Jaccard; Thetayc: coeficiente de similaridade theta de Yue-Clayton.

Tabela 19 - Índices de beta-diversidade calculados entre as amostras de gelo e solo de Baranowski coletado em 2004, para um *cutoff* de 0,05.

Amostras comparadas		Índices de beta-diversidade ¹						
		Sharedsobs	Sharedace	Sharedchao	Jclass	Sorclass	Jabund	Thetayc
BAI08	BAS0104	20	41.10	38.95	0.021	0.041	0.011	0.002
BAI08	BAS0304	15	16.32	15.75	0.026	0.050	0.017	0.001
BAI08	BAS0504	20	21.03	25.70	0.020	0.039	0.026	0.002
BAI08	BAS0704	14	18.40	17.00	0.019	0.037	0.014	0.001
BAI08	BAS0904	12	12.85	14.50	0.020	0.038	0.014	0.001
BAI08	BAS1104	17	22.15	53.83	0.020	0.039	0.014	0.001
BAI08	BAS1404	21	22.80	27.08	0.031	0.060	0.034	0.002
BAS0104	BAS0304	137	223.72	258.53	0.130	0.230	0.425	0.059
BAS0104	BAS0504	253	459.06	445.23	0.184	0.311	0.518	0.157
BAS0104	BAS0704	213	379.44	368.40	0.185	0.313	0.583	0.181
BAS0104	BAS0904	199	316.59	306.36	0.195	0.326	0.487	0.173
BAS0104	BAS1104	287	517.74	533.42	0.242	0.390	0.627	0.327
BAS0104	BAS1404	149	228.78	354.90	0.130	0.231	0.349	0.068
BAS0304	BAS0504	177	279.49	276.85	0.165	0.284	0.523	0.541
BAS0304	BAS0704	145	278.84	242.06	0.173	0.295	0.492	0.242
BAS0304	BAS0904	108	163.44	169.01	0.147	0.257	0.462	0.361
BAS0304	BAS1104	145	246.47	260.22	0.153	0.265	0.423	0.189
BAS0304	BAS1404	147	201.88	212.36	0.192	0.322	0.571	0.372
BAS0504	BAS0704	259	464.78	513.94	0.223	0.365	0.713	0.564
BAS0504	BAS0904	225	440.44	385.40	0.214	0.353	0.668	0.565
BAS0504	BAS1104	234	396.38	414.29	0.181	0.306	0.567	0.341
BAS0504	BAS1404	242	457.85	604.18	0.219	0.359	0.607	0.290
BAS0704	BAS0904	226	368.69	375.93	0.288	0.447	0.766	0.553
BAS0704	BAS1104	250	384.43	410.23	0.247	0.396	0.701	0.446
BAS0704	BAS1404	160	314.26	306.82	0.173	0.295	0.545	0.188
BAS0904	BAS1104	236	334.25	348.18	0.267	0.421	0.718	0.476
BAS0904	BAS1404	126	319.38	255.80	0.155	0.268	0.438	0.173
BAS1104	BAS1404	140	241.38	278.55	0.133	0.235	0.430	0.178

¹ Sharedsobs: número de OTU compartilhadas observadas; Sharedace: índice de ACE compartilhado; Sharedchao: índice de Chao1 compartilhado; Jclass: coeficiente de similaridade de Jaccard; Sorclass: coeficiente de similaridade de Sorensen; Jabund: abundância baseada no coeficiente de Jaccard; Thetayc: coeficiente de similaridade theta de Yue-Clayton.

Tabela 20 - Índices de beta-diversidade calculados entre as amostras de gelo e solo de Baranowski coletado em 2004, para um *cutoff* de 0,10.

Amostras comparadas		Índices de beta-diversidade ¹						
		Sharedsobs	Sharedace	Sharedchao	Jclass	Sorclass	Jabund	Thetayc
BAI08	BAS0104	28	32.40	35.62	0.045	0.086	0.069	0.005
BAI08	BAS0304	17	17.71	17.25	0.042	0.081	0.040	0.004
BAI08	BAS0504	27	28.87	31.33	0.041	0.079	0.046	0.004
BAI08	BAS0704	23	32.57	33.25	0.043	0.083	0.048	0.003
BAI08	BAS0904	18	28.67	23.25	0.043	0.082	0.029	0.002
BAI08	BAS1104	25	31.25	39.58	0.043	0.082	0.048	0.004
BAI08	BAS1404	25	32.03	29.25	0.054	0.102	0.093	0.009
BAS0104	BAS0304	141	227.33	199.79	0.199	0.333	0.487	0.148
BAS0104	BAS0504	231	348.39	363.23	0.263	0.416	0.661	0.252
BAS0104	BAS0704	210	335.96	331.30	0.272	0.428	0.714	0.316
BAS0104	BAS0904	193	304.16	286.11	0.287	0.446	0.672	0.273
BAS0104	BAS1104	253	420.69	428.46	0.323	0.488	0.766	0.417
BAS0104	BAS1404	161	244.56	289.17	0.212	0.350	0.502	0.204
BAS0304	BAS0504	173	273.40	319.16	0.245	0.394	0.643	0.551
BAS0304	BAS0704	152	305.77	228.47	0.254	0.405	0.570	0.260
BAS0304	BAS0904	112	162.81	165.88	0.215	0.354	0.552	0.410
BAS0304	BAS1104	141	206.17	234.04	0.213	0.351	0.548	0.213
BAS0304	BAS1404	142	199.32	205.74	0.261	0.413	0.665	0.396
BAS0504	BAS0704	234	346.70	376.99	0.301	0.462	0.802	0.614
BAS0504	BAS0904	195	308.29	285.94	0.279	0.436	0.801	0.625
BAS0504	BAS1104	207	284.53	353.28	0.241	0.388	0.725	0.385
BAS0504	BAS1404	220	355.18	391.47	0.302	0.464	0.753	0.340
BAS0704	BAS0904	205	331.64	325.20	0.365	0.535	0.854	0.556
BAS0704	BAS1104	217	328.76	331.94	0.301	0.463	0.800	0.517
BAS0704	BAS1404	165	292.83	292.39	0.252	0.402	0.613	0.225
BAS0904	BAS1104	200	311.51	325.80	0.322	0.487	0.837	0.471
BAS0904	BAS1404	124	198.47	219.52	0.214	0.352	0.658	0.200
BAS1104	BAS1404	149	219.22	258.51	0.205	0.341	0.615	0.209

¹ Sharedsobs: número de OTU compartilhadas observadas; Sharedace: índice de ACE compartilhado; Sharedchao: índice de Chao1 compartilhado; Jclass: coeficiente de similaridade de Jaccard; Sorclass: coeficiente de similaridade de Sorensen; Jabund: abundância baseada no coeficiente de Jaccard; Thetayc: coeficiente de similaridade theta de Yue-Clayton.

Tabela 21 - Índices de beta-diversidade calculados entre as amostras de gelo e solo de Baranowski coletado em 2004, para um *cutoff* de 0,20.

Amostras comparadas		Índices de beta-diversidade ¹						
		Sharedsobs	Sharedace	Sharedchao	Jclass	Sorclass	Jabund	Thetayc
BAI08	BAS0104	30	33.30	36.83	0.114	0.205	0.261	0.029
BAI08	BAS0304	23	23.35	24.40	0.106	0.192	0.144	0.019
BAI08	BAS0504	32	45.80	38.33	0.116	0.208	0.224	0.018
BAI08	BAS0704	29	32.54	50.00	0.112	0.201	0.331	0.016
BAI08	BAS0904	23	25.38	24.50	0.106	0.191	0.154	0.009
BAI08	BAS1104	27	34.57	28.75	0.097	0.177	0.174	0.018
BAI08	BAS1404	30	32.32	31.60	0.128	0.227	0.279	0.032
BAS0104	BAS0304	111	140.52	137.86	0.364	0.534	0.791	0.254
BAS0104	BAS0504	137	163.08	185.50	0.394	0.565	0.841	0.387
BAS0104	BAS0704	131	184.01	170.66	0.391	0.562	0.929	0.433
BAS0104	BAS0904	127	183.79	172.18	0.436	0.608	0.863	0.397
BAS0104	BAS1104	151	204.30	235.04	0.456	0.627	0.892	0.518
BAS0104	BAS1404	121	161.22	188.74	0.378	0.549	0.787	0.357
BAS0304	BAS0504	125	184.22	162.71	0.408	0.580	0.826	0.543
BAS0304	BAS0704	120	175.70	151.67	0.411	0.583	0.833	0.312
BAS0304	BAS0904	99	133.37	148.18	0.374	0.544	0.801	0.467
BAS0304	BAS1104	115	163.05	160.61	0.367	0.537	0.793	0.292
BAS0304	BAS1404	118	144.41	152.78	0.439	0.610	0.861	0.461
BAS0504	BAS0704	138	176.31	186.84	0.402	0.574	0.919	0.692
BAS0504	BAS0904	126	160.10	152.34	0.410	0.582	0.896	0.680
BAS0504	BAS1104	134	166.38	189.39	0.369	0.539	0.855	0.496
BAS0504	BAS1404	147	176.80	196.67	0.476	0.645	0.932	0.470
BAS0704	BAS0904	124	193.57	158.85	0.428	0.599	0.919	0.657
BAS0704	BAS1104	143	239.24	229.01	0.427	0.598	0.933	0.588
BAS0704	BAS1404	131	201.94	164.96	0.428	0.600	0.869	0.342
BAS0904	BAS1104	128	185.73	179.49	0.424	0.595	0.923	0.540
BAS0904	BAS1404	102	130.71	134.89	0.355	0.524	0.861	0.280
BAS1104	BAS1404	114	164.68	146.05	0.336	0.503	0.857	0.278

¹ Sharedsobs: número de OTU compartilhadas observadas; Sharedace: índice de ACE compartilhado; Sharedchao: índice de Chao1 compartilhado; Jclass: coeficiente de similaridade de Jaccard; Sorclass: coeficiente de similaridade de Sorensen; Jabund: abundância baseada no coeficiente de Jaccard; Thetayc: coeficiente de similaridade theta de Yue-Clayton.

Os índices de riqueza compartilhada (sharedsobs, sharedace e sharedchao) foram menores quando a amostra de gelo (BAI-09) foi comparada às amostras de solo, em todos os valores de *cutoff* analisados. Estes resultados indicam, assim como outros já apresentados neste estudo, que a comunidade do gelo de Baranowski é distinta de todas as amostras de solo, pois o gelo contém menor número de taxa compartilhados. Cabe ressaltar que os índices de riqueza compartilhados demonstram o número de espécies, por exemplo, que há de comum

entre duas amostras, e portanto estes índices não necessariamente indicam qual amostra tem maior ou menor riqueza.

A fim de melhor representar os resultados das análises de riqueza compartilhada entre as amostras, diagramas de Venn foram gerados no *software* Mothur v1.9.0 (Figuras 42-44). Devido ao grande volume de dados, foram escolhidos apenas os resultados do número de OTU compartilhadas (Sharedsobs) sob o *cutoff* de 0,10 para gerar os diagramas. Os resultados nos outros valores de *cutoff* apresentaram o mesmo padrão.

Figura 42 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de gelo (BAI-09) e solos recém expostos por recuo da geleira Baranowski (BAS01-04 e BAS01-09). Valor de *cutoff* utilizado: 0,10.

Figura 43 - Diagramas de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de solo de Baranowski, e respectiva porcentagem de OTU compartilhadas. Acima: coleta de solo em 2004; Abaixo: coleta de solo em 2009. Valor de *cutoff* utilizado: 0,10.

Figura 44 - Diagrama de Venn representando o número de OTU compartilhadas entre as amostras de solo da cronossequência de Baranowski. Amostras: próxima da geleira (BAS01-04), intermediária (BAS03-04) e mais distante (BAS14-04). Valor de *cutoff* utilizado: 0,10.

Inicialmente, as amostras de gelo (BAI-09) e solos recém expostos (BAS01-04 e BAS01-09) foram comparadas quanto ao número de OTU compartilhadas (Figura 42). As amostras de solo recém expostos apresentaram 58 OTU compartilhadas entre si, enquanto apenas 11 (BAS01-04) e 8 OTU (BAS01-09) foram compartilhadas entre os solos e o gelo. Estes resultados sugerem diferenças na composição de membros da comunidade das amostras do gelo e do solo.

A comparação entre as amostras de solo do início e fim da cronossequência mostrou diferenças entre as coletas de 2004 e 2009 (Figura 43). Os solos BAS01-04 e BAS14-04, quando comparados entre si, compartilharam 21,4% das OTU observadas (ou 161 OTU). Os mesmos pontos do transecto, coletados em 2009 (BAS01-09 e BAS12-09), compartilharam 13,7% das OTU observadas (ou 95 OTU). Este resultado pode ser interpretado sob dois pontos de vista: a) Embora as amostras coletas em épocas diferentes representem um estágio similar da sucessão ecológica, as diferenças observadas sugerem que variações sazonais (invernos mais frios, verões mais quentes, etc.) influenciam as comunidades microbianas do solo exposto; b) As duas coletas de solo na região de Baranowski podem estar em escalas

diferentes quando ao tempo de exposição, e por esse motivo as comparações dos solos de 2004 com o solo de 2009 não refletem o real perfil de sucessão ecológica.

A análise do número de OTU compartilhadas entre amostras de uma mesma coleta está apresentada na Figura 44. Para esta análise foram escolhidas três amostras da cronossequência de 2004: o solo recém exposto (BAS01-04), o solo adjacente a este (BAS03-04) e o solo exposto a mais tempo (BAS14-04). Os resultados desta análise indicam que 10,6% das OTU analisadas (ou seja, 93 de um total de 876 OTU analisadas) foram compartilhadas entre essas três amostras do transecto, sugerindo que estes grupos tenham papel importante no desenvolvimento da comunidade. A análise também mostrou que as amostras de solo BAS01-04 e BAS14-04 compartilham mais OTU que o número compartilhado entre BAS01-04 e BAS03-04. Este resultado corrobora com os dados obtidos por DGGE, que mostraram maior similaridade entre o solo recém exposto e o solo exposto a mais tempo, ainda que as amostras sejam diferentes (Figura 20).

A similaridade de membros de comunidade foi medida através dos coeficientes de similaridade de Jaccard (Jclass) e Soreson (Sorclass). O índice de similaridade de Jaccard satisfaz certos requerimentos geométricos e, portanto, pode ser tratado como uma medida de distância (PIELOU, 1984). Da mesma forma, o coeficiente de Soreson mede a similaridade entre os membros de duas comunidades, porém maior peso é dado ao número de OTU compartilhadas (MAGURRAN, 2004). Os resultados obtidos com estes dois índices, apresentados nas Tabelas 19-22, corroboram com a riqueza compartilhada observada (Sharedsobs) e estimada (Sharedace e sharedchao) quanto à diferença da comunidade do gelo em relação às amostras de solo.

Uma limitação dos coeficientes de membros de comunidades é o fato dos cálculos não considerarem as abundâncias relativas (equitatividade) de OTU compartilhadas e não compartilhadas. Entretanto, a similaridade de comunidades, quanto à sua estrutura, pode ser melhor representada através dos coeficientes de abundância de Jaccard (Jabund) e Theta de Yue-Clayton (Thetayc). Estes índices de beta-diversidade introduzem parâmetros quantitativos (abundância relativa de OTU) às fórmulas de similaridade de Jaccard e coeficiente de Soreson. Os resultados dos cálculos de Jabund e Thetayc podem ser melhor comparados através de mapas de cores (*heat maps*), onde a escala de cor corresponde aos valores dos índices. Os mapas de cores foram calculadas com base nos dados obtidos para estes índices em *cutoff* de 0,10 e 0,20 (Tabelas 21 e 22) e estão apresentados nas Figuras 45 a 48.

Figura 45 - Mapa de cores representando a similaridade de estrutura de comunidade das amostras de Baranowski. Mapa calculado com o índice Jclass e *cutoff* 0,10.

Figura 46 - Mapa de cores representando a similaridade de estrutura de comunidade das amostras de Baranowski. Mapa calculado com o índice Jclass e *cutoff* 0,20.

Figura 47 - Mapa de cores representando a similaridade de estrutura de comunidade das amostras de Baranowski. Mapa calculado com o índice Thetayc e *cutoff* 0,10.

Figura 48 - Mapa de cores representando a similaridade de estrutura de comunidade das amostras de Baranowski. Mapa calculado com o índice Thetayc e *cutoff* 0,20.

Os índices Jabund e Thetayc revelaram que a amostra do gelo de Baranowski possui estrutura de comunidade diferente das amostras de solo, corroborando com os outros índices calculados. Este resultado é bastante evidente ao observar que as comparações do gelo com qualquer amostra de solo gerou uma unidade de cor preta nas matrizes (Figuras 46-48). As outras amostras de solo, quando comparadas entre si, apresentaram estruturas de comunidade mais similares. Entre todas as amostras de solo, os pontos BAS03-04, BAS05-04, BAS07-04 e BAS09-04 apresentaram maior similaridade na estrutura de comunidade. Este resultado pode ser observado pelas unidades de cor vermelho mais intenso nas matrizes construídas a partir do índice Thetayc (Figuras 47 e 48). A amostra BAS01-04 apresentou maior similaridade com a amostra BAS11-04, enquanto a amostra BAS14-04 foi mais similar à amostra BAS03-04. Estes resultados não concordam com a análise dos perfis de DGGE, o qual mostrou maior similaridade entre BAS01-04 e BAS14-04 (Figura 20).

4.2.7.3 Comparação da estrutura de comunidade das amostras de Baranowski através de métodos de testes de hipótese

A beta-diversidade também pode ser estimada através de testes de hipóteses, os quais podem ser considerados alternativos aos métodos baseados em OTU. Os testes de hipótese mais empregados em ecologia microbiana são o Libshuff, Parcimônia (ou teste-P) e UniFrac (SINGLETON et al., 2001; SCHLOSS e HANDELSMAN, 2006; LOZUPONE e KNIGHT, 2005). Estes métodos empregam testes de Monte Carlo (amostragens aleatórias) para estimar as diferenças entre cada comunidade. Estes três métodos foram utilizados para comparar a beta-diversidade entre as amostras de gelo e do solo exposto pela geleira Baranowski.

O primeiro teste realizado foi o Libshuff, que testa a hipótese de subamostragens. Por exemplo, em cada comparação, o Libshuff determina se a primeira comunidade é subamostra da segunda. Em cada comparação, um valor de p (p-value) é gerado e, caso esteja abaixo do p crítico, a hipótese é rejeitada (SINGLETON et al., 2001). O valor do p crítico deve ser corrigido para validar a análise de múltiplos testes e, para tal, foi empregado a correção de Bonferroni (DUNNET, 1955). Os resultados do teste de Libshuff estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 22 - Teste de hipótese Libshuff entre as amostras de gelo e solos de Baranowski, sob um *cutoff* de 0,1.

Amostras comparadas	dCXYScore	p-value	Resultado
BAI09-BAS0104	0.03176457	<0.0001	Significativo
BAS0104-BAI09	0.06730331	<0.0001	Significativo
BAI09-BAS0304	0.05571885	<0.0001	Significativo
BAS0304-BAI09	0.08260685	<0.0001	Significativo
BAI09-BAS0504	0.04214599	<0.0001	Significativo
BAS0504-BAI09	0.07189495	<0.0001	Significativo
BAI09-BAS0704	0.04678939	<0.0001	Significativo
BAS0704-BAI09	0.0585346	<0.0001	Significativo
BAI09-BAS0904	0.05630777	<0.0001	Significativo
BAS0904-BAI09	0.07509653	<0.0001	Significativo
BAI09-BAS1104	0.04835866	<0.0001	Significativo
BAS1104-BAI09	0.06805193	<0.0001	Significativo
BAI09-BAS1404	0.04262961	<0.0001	Significativo
BAS1404-BAI09	0.06563783	<0.0001	Significativo
BAS0104-BAS0304	0.01544699	<0.0001	Significativo
BAS0304-BAS0104	0.00431205	<0.0001	Significativo
BAS0104-BAS0504	0.00720075	<0.0001	Significativo
BAS0504-BAS0104	0.00253377	<0.0001	Significativo
BAS0104-BAS0704	0.01051962	<0.0001	Significativo
BAS0704-BAS0104	0.0005128	0.9471	Não significativo
BAS0104-BAS0904	0.00994617	<0.0001	Significativo
BAS0904-BAS0104	0.00037114	0.9999	Não significativo
BAS0104-BAS1104	0.00478664	<0.0001	Significativo
BAS1104-BAS0104	0.00028865	0.6149	Não significativo
BAS0104-BAS1404	0.01631659	<0.0001	Significativo
BAS1404-BAS0104	0.00605335	<0.0001	Significativo
BAS0304-BAS0504	0.00338396	<0.0001	Significativo
BAS0504-BAS0304	0.00680174	<0.0001	Significativo
BAS0304-BAS0704	0.00698631	<0.0001	Significativo
BAS0704-BAS0304	0.0039756	<0.0001	Significativo
BAS0304-BAS0904	0.01064122	<0.0001	Significativo
BAS0904-BAS0304	0.00429079	<0.0001	Significativo
BAS0304-BAS1104	0.00822118	<0.0001	Significativo
BAS1104-BAS0304	0.00781996	<0.0001	Significativo
BAS0304-BAS1404	0.00678503	<0.0001	Significativo
BAS1404-BAS0304	0.00348172	<0.0001	Significativo
BAS0504-BAS0704	0.00295822	<0.0001	Significativo
BAS0704-BAS0504	0.00042688	0.6786	Não significativo
BAS0504-BAS0904	0.00449085	<0.0001	Significativo
BAS0904-BAS0504	0.00042789	0.9792	Não significativo
BAS0504-BAS1104	0.00538682	<0.0001	Significativo
BAS1104-BAS0504	0.00258743	<0.0001	Significativo
BAS0504-BAS1404	0.00428313	<0.0001	Significativo
BAS1404-BAS0504	0.00283399	<0.0001	Significativo
BAS0704-BAS0904	0.00095637	<0.0001	Significativo
BAS0904-BAS0704	0.00011166	0.2468	Não significativo
BAS0704-BAS1104	0.00067525	<0.0001	Significativo
BAS1104-BAS0704	0.00192874	<0.0001	Significativo
BAS0704-BAS1404	0.00614349	<0.0001	Significativo
BAS1404-BAS0704	0.00659679	<0.0001	Significativo
BAS0904-BAS1104	0.0001317	0.8363	Não significativo
BAS1104-BAS0904	0.00211261	<0.0001	Significativo
BAS0904-BAS1404	0.00601596	<0.0001	Significativo
BAS1404-BAS0904	0.01020087	<0.0001	Significativo
BAS1104-BAS1404	0.0084378	<0.0001	Significativo
BAS1404-BAS1104	0.00979841	<0.0001	Significativo

O valor de p corrigido é 0,00089 (0,05 dividido por 56 testes). Portanto, se o resultado do teste mostrou significância menor que p corrigido, então as comunidades de uma das amostras é significativamente diferente. A comparação do par reverso indica qual comunidade é subamostra da outra.

O teste Libshuff foi significativo para a maioria os pares de amostras analisados. Mais especificamente, o teste revelou que todas as amostras são diferentes entre si, e que as amostras BAS07, BAS09 e BAS11 são subamostras de BAS01-04; que as amostras BAS07 e BAS09 são subamostras de BAS05-04; e que BAS09 é subamostra tanto de BAS07-04 quanto de BAS11-09.

O teste de Parcimônia, também conhecido como teste-P, é um método que utiliza árvores filogenéticas para testar a hipótese de que duas amostras tem a mesma estrutura de comunidade. A árvore filogenética deve ser construída com os membros de comunidade de ambas as amostras e o teste indicará a probabilidade das duas amostras apresentarem a mesma estrutura por acaso (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2006). Devido ao grande volume de dados, muito tempo computacional seria exigido para construir árvores com todas as sequências de pirosequenciamento. Portanto, sequências representativas de cada OTU – sob um *cutoff* de 0,10 – foram selecionadas, e a partir desta subamostragem, foram construídas as árvores filogenéticas para os testes de Parcimônia. Os resultados estão apresentados na Tabela 24.

Segundo o teste de Parcimônia, quando analisada uma árvore contendo todas as sequências representativas do gelo e das amostras de solo, pelo menos uma amostra possui estrutura de comunidade diferente. A identificação desta ou de outras amostras significativas foi realizada através da comparação par a par das comunidades. Após este teste, duas amostras (BAI-09 e BAS01-04) foram identificadas com estrutura de comunidade diferente. A amostra BAI-09 foi diferente de todas as outras amostras de solo, segundo o resultado do teste de Parcimônia. Este resultado corrobora com os dados anteriores que indicaram a diferença entre a comunidade do gelo e das amostras de solo. A amostra BAS01-04 foi considerada com estrutura de comunidade diferente da amostra BAS03-04. Este resultado pode ser interpretado da seguinte forma: a comunidade recém exposta por recuo da geleira sofre alterações nos primeiros anos de exposição, e ao longo do tempo a estrutura de comunidade tende a voltar ao estado original. Entretanto, mais dados ecológicos são necessários para chegar a uma conclusão mais precisa.

Tabela 23 - Resultado do teste de Parcimônia realizado entre as amostras de gelo e solo de Baranowski. Dados calculados a partir de uma árvore filogenética contendo sequências representativas das amostras em um *cutoff* de 0,10. Os resultados significativos estão destacados em negrito.

Grupos comparados	ParsScore	ParsSig	Resultado ¹
Todas as amostras	221	<0.0010	Mín. 1 amostra signif.
BAI09-BAS0104	16	<0.0010	Significativo
BAI09-BAS0304	11	<0.0010	Significativo
BAI09-BAS0504	12	<0.0010	Significativo
BAI09-BAS0704	12	<0.0010	Significativo
BAI09-BAS0904	9	<0.0010	Significativo
BAI09-BAS1104	15	<0.0010	Significativo
BAI09-BAS1404	14	<0.0010	Significativo
BAS0104-BAS0304	23	<0.0010	Significativo
BAS0104-BAS0504	38	0.224	Não significativo
BAS0104-BAS0704	23	0.006	Não significativo
BAS0104-BAS0904	21	0.501	Não significativo
BAS0104-BAS1104	38	0.082	Não significativo
BAS0104-BAS1404	33	0.081	Não significativo
BAS0304-BAS0504	29	0.452	Não significativo
BAS0304-BAS0704	21	0.079	Não significativo
BAS0304-BAS0904	17	0.175	Não significativo
BAS0304-BAS1104	26	0.059	Não significativo
BAS0304-BAS1404	28	0.458	Não significativo
BAS0504-BAS0704	28	0.562	Não significativo
BAS0504-BAS0904	21	0.657	Não significativo
BAS0504-BAS1104	41	0.76	Não significativo
BAS0504-BAS1404	38	0.864	Não significativo
BAS0704-BAS0904	16	0.1	Não significativo
BAS0704-BAS1104	22	0.002	Não significativo
BAS0704-BAS1404	27	0.52	Não significativo
BAS0904-BAS1104	22	0.819	Não significativo
BAS0904-BAS1404	19	0.262	Não significativo
BAS1104-BAS1404	34	0.203	Não significativo

¹ Significativo se $p < 0,00178$ (após correção de Bonferroni)

O método UniFrac testa a hipótese de um ramo específico de uma árvore filogenética ser exclusivo de uma comunidade. O UniFrac pode analisar apenas os membros uma árvore filogenética (UniFrac qualitativo), ou executar o mesmo teste levando em consideração o número de sequências que cada membro da árvore representa (UniFrac quantitativo) (LOZUPONE e KNIGHT, 2005). Da mesma forma que o teste de parcimônia, a árvore filogenética empregada na análise pelo UniFrac foi construída com sequências representantes de OTU sob um *cutoff* de 0,10. Os resultados do UniFrac quantitativo demonstraram-se significativos apenas entre as amostras BAI-09 e BAS14-04, considerando um valor de p corrigido de 0,00178 (Tabela 25). O teste UniFrac entre as estruturas de comunidade do gelo e

outras amostras de solo apresentou resultados de p próximo ao valor crítico, mas não foram suficientes para serem considerados significativos. Os resultados observados na comparação das outras amostras de solo também não foram considerados significativos. Os resultados do teste UniFrac quantitativo revelaram, portanto, que a amostra da geleira Baranowski possui uma estrutura de comunidade cujos membros tendem a ser diferentes das amostras de solo, principalmente se comparada ao solo mais distante da geleira (BAS14-04).

Tabela 24 - Resultados do teste UniFrac quantitativo entre as amostras de gelo e de solo de Baranowski, a partir de uma árvore filogenética com sequências representativas sob um *cutoff* de 0,10. O resultado significativo está destacado em negrito.

Grupos comparados	WScore	WSig (p-value)	Resultado ¹
BAI09-BAS0104	0.434624	0.0070	Não-significativo
BAI09-BAS0304	0.458271	0.0030	Não-significativo
BAI09-BAS0504	0.442608	0.0030	Não-significativo
BAI09-BAS0704	0.453089	0.0060	Não-significativo
BAI09-BAS0904	0.469412	0.0350	Não-significativo
BAI09-BAS1104	0.40715	0.0190	Não-significativo
BAI09-BAS1404	0.442797	0.0010	Significativo
BAS0104-BAS0304	0.649380	0.0350	Não-significativo
BAS0104-BAS0504	0.592745	0.2430	Não-significativo
BAS0104-BAS0704	0.667897	0.0130	Não-significativo
BAS0104-BAS0904	0.595748	0.6490	Não-significativo
BAS0104-BAS1104	0.625935	0.2030	Não-significativo
BAS0104-BAS1404	0.642296	0.0640	Não-significativo
BAS0304-BAS0504	0.567249	0.2990	Não-significativo
BAS0304-BAS0704	0.596977	0.0540	Não-significativo
BAS0304-BAS0904	0.655241	0.1750	Não-significativo
BAS0304-BAS1104	0.612767	0.0760	Não-significativo
BAS0304-BAS1404	0.584827	0.0700	Não-significativo
BAS0504-BAS0704	0.618728	0.1470	Não-significativo
BAS0504-BAS0904	0.613670	0.5610	Não-significativo
BAS0504-BAS1104	0.604012	0.5300	Não-significativo
BAS0504-BAS1404	0.613865	0.2370	Não-significativo
BAS0704-BAS0904	0.696200	0.0690	Não-significativo
BAS0704-BAS1104	0.649524	0.0120	Não-significativo
BAS0704-BAS1404	0.588986	0.0780	Não-significativo
BAS0904-BAS1104	0.645088	0.4650	Não-significativo
BAS0904-BAS1404	0.652411	0.2730	Não-significativo
BAS1104-BAS1404	0.587131	0.0350	Não-significativo

¹ Significativo se $p < 0,00178$ (após correção de Bonferroni)

Os testes de hipótese Libshuff, Parcimônia e UniFrac foram empregados na comparação da estrutura de comunidade das amostras da cronossequência de Baranowski. Os três métodos são utilizados para testar hipóteses diferentes, mas, em sua essência, são

métodos que determinam se a estrutura de comunidade é mais variável do que o esperado pelo acaso.

Os resultados apresentados nos três métodos permitem inferir que a comunidade microbiana do gelo de Baranowski (BAI-09) possui estrutura diferente das amostras de solo. Com relação às comunidades do solo, o método de Libshuff apresentou resultados divergentes em relação ao método da Parcimônia e UniFrac.

Schloss (2008) avaliou o uso desses três métodos estatísticos em simulações de computador, a fim de comparar o potencial estatístico destas ferramentas. O autor concluiu que: a) os testes baseados em hipóteses só conseguem detectar diferenças estatisticamente significativas, não necessariamente sendo uma diferença ecologicamente significativa; b) o método Libshuff não é válido para testar hipóteses de subamostragem se houver alta porcentagem de membros compartilhados entre as amostras; c) o método da Parcimônia e UniFrac tendem a sugerir, erroneamente, diferenças significativas quando comparam duas amostras com mesma diversidade genética, mas membros de comunidade diferentes; d) o teste UniFrac não necessariamente mede a real similaridade entre comunidades, podendo distorcer a estimativa de similaridade à medida que se aumenta a amostragem; e) o uso de diferentes métodos baseados em hipóteses pode levar a interpretações confusas, uma vez que a hipótese sendo testada nem sempre é clara. Neste último caso, os métodos baseados em OTU são mais indicados (SCHLOSS, 2008).

Em vista do exposto por Schloss (2008), o teste de Parcimônia para as amostras de Baranowski apresentou os resultados mais consistentes com os métodos baseados em OTU (item 4.2.7.2). Desta forma, o método da Parcimônia foi considerado o teste de hipótese mais adequado para avaliar as diferenças na estrutura de comunidade do solo de Baranowski.

4.2.7.4 Composição de membros da comunidade bacteriana das amostras de Baranowski obtidas por pirosequenciamento

Todas as 39.568 sequências foram submetidas à comparação no banco de dados do Ribosomal Database Project através da ferramenta Classifier. Deste total, 3837 sequências (9,6%) não puderam ser identificadas em um limiar de confiança de até 50%. Este limiar é empregado pelo Classifier para sequências entre 50 e 250 pb. Segundo Claesson et al. (2009), testes de *bootstraps* sob um limiar de 50% demonstraram que este valor é suficiente para classificar sequências curtas com acurácia até o nível de gênero. O resultado da classificação

das sequências encontra-se no Quadro 1, e os gráficos de abundância relativa nas Figuras 49 e 50.

A classificação das sequências da amostra de gelo e do solo de Baranowski apresentou um total de 21 Filos distribuídos ao longo da cronossequência (Quadro 1). Deste total, os Filos Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria e Gemmatimonadetes foram dominantes em todas as amostras analisadas. Os Filos Firmicutes, Bacteroidetes, Chloroflexi e Cyanobacteria também representaram uma população significativa nas amostras de solo, embora com abundâncias menores que os grupos dominantes citados anteriormente. Estes resultados corroboram com os relatos de estudos em solos da Antártica. Nestes estudos, os Filos mais abundantes são Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, Gemmatimonadetes e Cyanobacteria (ASLABIE et al., 2006; NIEDERBERGER et al., 2008; SMITH et al., 2006; SAUL et al., 2005; YERGEAU et al., 2007b). Membros dos Filos Verrucomicrobia e Planctomycetes, os quais normalmente habitam o solo não polar (RONDON et al., 1999; BUCKLEY e SCHMIDT, 2001), foram reportados no solo antártico pela primeira vez no trabalho de Neiderberger et al. (2008). Estes autores estudaram a comunidade microbiana em solos do continente antártico (Victoria Land) através de métodos tradicionais de clonagem e sequenciamento. Entre todas as amostras de solo, os autores relataram os Filos Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Gemmatimonadetes, Cyanobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chloroflexi, Deinococcus-Thermus, Bacteroidetes, Fibrobacteria e os Filos candidatos OP2, OP3 e OP11 (NEIDERBERGER et al., 2008). À exceção do Filo Fibrobacteria e dos Filos candidatos, todos os outros Filos foram encontrados nas amostras de solo de Baranowski através do pirosequenciamento, sugerindo a ampla distribuição desses Filos na Antártica.

As amostras de solo coletadas em 2004 e 2009 apresentaram algumas diferenças quanto à composição de membros da comunidade. Nos solos de 2004, por exemplo, os Filos Verrucomicrobia, Planctomycetes e, em menor proporção, Deinococcus-Thermus, foram observados. Em contrapartida, as amostras de solo de 2009 não apresentaram esses Filos, ou apresentaram em abundâncias muito baixas. Entretanto, os Filos Firmicutes e WS3 foram observados em 2009, mas não em 2004. Estas diferenças entre as comunidades do solo podem refletir a resposta dos micro-organismos a variações ambientais entre uma coleta e outra.

Quadro 1 - Número de sequências de Baranowski classificadas em cada Filo a partir da ferramenta Classifier (RDP).

Filo	Amostras													
	BAI-09	BAS01-04	BAS03-04	BAS05-04	BAS07-04	BAS09-04	BAS11-04	BAS14-04	BAS01-09	BAS02-09	BAS04-09	BAS06-09	BAS10-09	BAS12-09
OD1	0	0	7	8	0	3	2	0	0	0	11	4	19	17
BRC1	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0
Fusobacteria	1	0	0	12	4	3	0	1	1	0	45	1	0	0
Actinobacteria	263	681	341	916	845	640	986	525	121	26	403	880	728	430
Firmicutes	264	34	10	42	15	15	2	30	26	12	136	29	63	10
TM7	0	20	7	31	6	12	13	15	1	6	6	45	35	62
Spirochaetes	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	9	0	0	0
Bacteroidetes	58	56	12	25	16	10	150	32	21	5	50	108	90	303
Proteobacteria	1703	1162	840	936	624	550	515	1457	1931	138	1416	1427	1086	1515
Nitrospira	0	5	0	0	3	0	0	0	0	0	2	0	9	1
Gemmatimonadetes	0	108	329	179	117	118	166	171	212	9	156	75	74	152
Acidobacteria	0	384	368	647	345	592	359	253	67	63	333	250	176	292
Deinococ.-Thermus	0	61	0	2	1	10	42	0	0	0	0	0	1	2
Verrucomicrobia	0	211	271	201	128	243	530	292	5	0	1	0	0	0
WS3	0	1	5	5	11	4	4	3	13	28	192	116	314	386
Planctomycetes	1	53	16	15	1	4	25	5	0	0	1	0	0	3
Cyanobacteria	220	50	7	10	68	9	16	9	0	4	37	36	102	35
Tenericutes	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	10	65	15	4
OP10	0	6	1	0	2	1	0	0	0	0	1	1	2	5
Chloroflexi	0	120	47	34	23	24	36	11	3	10	18	27	42	23
Chlamydiae	0	5	4	11	7	1	1	27	0	0	6	36	126	16
unclassified_Bacteria	19	328	331	307	149	181	243	292	120	32	708	209	561	357

Figura 49 - Abundância relativa de Filos para as amostras de gelo (BAI-09) e do solo de Baranowski coletado em 2004 (BAS01 a BAS14-04).

Figura 50 - Abundância relativa de Filos para as amostras de gelo (BAI-09) e do solo de Baranowski coletado em 2009 (BAS01 a BAS12-09).

A classificação das sequências no nível taxonômico de gêneros encontra-se no Quadro 2. Em geral, os gêneros encontrados no gelo e solo de Baranowski constituem organismos já isolados em uma ampla diversidade de ambientes, incluindo amostras criogênicas como solos oligotróficos do Ártico e Antártica, gelo de geleiras polares e alpinas, lagos, sedimentos e *permafrost*. Entretanto, alguns gêneros encontrados na área de Baranowski só foram descritos através de métodos independentes de cultivo, como os gêneros GP04, GP06, GP16 e GP17 (Filo Acidobacteria), os gêneros Spartobacteria e "Subdivisão 3" (Filo Verrucomicrobia), e o gênero TM7 (Filo candidato TM7).

O Filo Acidobacteria é encontrado como 10 a 50% das bactérias totais de solos e sedimentos, através de métodos independentes de cultivo. Entretanto, apenas 5 das 26 subdivisões propostas foram cultivados em laboratório. Destes, a maioria é aeróbia e heterotrófica, mas grupos anaeróbios e fotossintetizantes também foram descritos (WARD et al., 2009; e outras referências nela contidas). A comparação de genomas entre três isolados deste Filo apresentou o metabolismo heterotrófico (com enzimas adaptadas a condições de oligotrofia), a resistência a dessecação e a formação de biofilme como características comuns do grupo.

Bactérias do Filo Verrucomicrobia representam de 1 a 10% dos micro-organismos encontrados no solo a partir de métodos independentes de cultivo (SANGWAN et al., 2005). Alguns gêneros deste grupo, como Spartobacteria (antiga "Subdivisão 2") e a "Subdivisão 3", ainda não foram isolados. Entretanto, a espécie *Chthoniobacter flavus* foi descrita como primeiro representante da Classe Spartobacteria (a qual pertence o gênero de mesmo nome) e foi caracterizada como um bacilo aeróbio heterotrófico do solo, com crescimento ótimo a 25 °C de temperatura e pH entre 4 e 7 (SANGWAN et al., 2004).

Organismos do Filo TM7, que possui apenas o gênero TM7 como representante, foram descobertos em solos pantanosos (turfas) e em solos da floresta amazônica (RHEIMS et al., 1996; BORNEMAN e TRIPLETT, 1997.). Pouco se conhece sobre o metabolismo destes organismos, mas sequências do gene 16S rRNA deste grupo foram encontradas em diversos ambientes, incluindo o terrestre (solos, rizosfera, turfas), aquático (águas marinhas, lacustres, sedimentos de mar profundo), e clínico (cavidade oral humana e fezes de roedores) (HUGENHOLTZ et al., 2001).

Apesar de pouco conhecimento a cerca do metabolismo e nichos ecológicos dos gêneros descritos acima (Filos Acidobacteria, Verrucomicrobia e TM7), sequências destes grupos estavam presentes em todas as amostras da cronosequência. O verdadeiro papel

destes organismos na sucessão ecológica ainda é desconhecido, mas pode-se inferir que representam grupos adaptados às condições impostas pelo ecossistema antártico.

Outros gêneros também foram observados ao longo de toda a cronossequência: *Gemmatimonas*, *Arthrobacter*, *Sphingomonas*, *Nocardioide*s, *Pseudomonas*, *Ilumatobacter*, entre outros. Estes organismos fazem parte da microbiota do solo de diferentes ambientes e apresentam, normalmente, metabolismo aeróbio heterotrófico. Entre estes gêneros, alguns apresentaram um aumento no número de sequências observadas ao longo do transecto, como *Arthrobacter*, *Nocardioide*s, *Pseudomonas*, *Spartobacteria*, GP4 e TM7 (Quadro 2). Este fenômeno sugere que a proporção de organismos heterotróficos aumente ao longo do tempo de exposição do solo e, portanto, espera-se que haja maior competição entre os organismos nos solos mais desenvolvidos. Esta hipótese corrobora com os resultados do experimento do fluxo de CO₂ (item 4.2.2), onde foi observado um aumento da taxa respiratória ao longo do tempo de exposição do solo.

Organismos do ciclo do nitrogênio (fixadores de N₂, nitrificantes e denitrificantes) ocorreram em todas as fases da cronossequência. Entretanto, a distribuição desses grupos não apresentou um padrão. Por exemplo, o gênero *Nitrosospira* – capaz de oxidar a amônia em nitrito sob aerobiose – ocorreu em maior abundância no solo recentemente exposto em 2004 (5 sequências em BAS01-04) e sua frequência diminuiu com o tempo de exposição (0 sequências em BAS14-04). Este mesmo gênero apresentou outro perfil nas amostras de 2009, sendo menos frequente nos solos expostos recentemente (zero sequências até a amostra BAS04-09) e maior abundância no final da cronossequência (10 sequências em BAS12-09) (dados não apresentados no Quadro 2). O gênero *Nitrosospira* – oxida nitrito a nitrato – apresentou o mesmo padrão: maior frequência no solo recentemente exposto (78 sequências) de 2004, e maior abundância no solo mais desenvolvido de 2009 (33 sequências). Estes dois gêneros são responsáveis por transformar a amônia (NH₃) em nitrito (NO₂⁻) e posteriormente em nitrato (NO₃⁻), que é a forma utilizada por outros organismos para assimilar o nitrogênio e, portanto, representam micro-organismos fundamentais para a ciclagem de nitrogênio no solo. As diferenças nas populações de bactérias nitrificantes das amostras de 2004 e 2009 podem ser interpretadas com a seguinte hipótese: Baseado no resultado da coleta de 2004, há a escassez de nitrogênio (na forma de NO₃⁻) nos primeiros estágios da sucessão ecológica, o que resulta em vantagens seletivas para o crescimento de organismos que utilizam outras fontes de nitrogênio, como *Nitrosospira* (NH₃) e *Nitrosospira* (NO₂⁻). Desta forma, os resultados encontrados nos solos coletados em 2009 podem estar subestimados. De fato, duas amostras desse transecto geraram poucas sequências (BAS02-09) ou nenhuma sequência (BAS08-09),

comprometendo as análises em função do tempo de exposição do solo. Além disso, os resultados dos parâmetros físico-químicos do solo de 2004 indicaram uma tendência no aumento de NH_3 e NO_3^- no final da cronossequência, que pode indicar acúmulo dessas moléculas devido à menor quantidade de nitrificantes e uma provável contribuição de fixadores de nitrogênio.

Bactérias fixadoras de nitrogênio (diazotróficas) ocorreram tanto no gelo quanto nos solos de Baranowski (Quadro 3). Essas bactérias, divididas em simbiontes e de vida livre, são responsáveis por transformar o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), dando início ao ciclo do nitrogênio. Na região da geleira Baranowski, bactérias diazotróficas que estabelecem simbiose com plantas foram encontradas em maior abundância na amostra de gelo BAI-09. Entre estes, o gênero mais freqüente foi *Rhizobium*, seguido por *Methylobacterium* e *Bradyrhizobium*. A presença de *Rhizobium* nesta geleira também foi observado através do método de clonagem de genes 16S rRNA (item 4.1.3). Nas amostras de solo, diazotróficos simbiontes foram encontrados em menor abundância. A ocorrência destes organismos em áreas sem vegetação, como o caso do solo exposto por recuo da geleira Baranowski, pode sugerir que estes organismos não estejam viáveis (e foram transportados por correntes atmosféricas, como no gelo), ou que apresentem outro metabolismo independente da associação simbiótica. Os micro-organismos fixadores de nitrogênio de vida livre foram observados em maior abundância nas amostras de solo. Apesar de ocorrerem ao longo de toda a cronossequência, nos estágios iniciais (BAS01-04) houve predominância de cianobactérias, enquanto nos solos expostos a mais tempo predominou o gênero *Rhodopseudomonas* (BAS14-04 e BAS12-09). Cabe ressaltar que a maioria das sequências de Baranowski, identificadas como Filo Cyanobacteria, não foram classificadas até o nível gênero. As sequências similares ao Filo Cyanobacteria foram classificadas, então, em "Cyanobacteria não classificadas", gênero GPXIII (Filo Cyanobacteria), Bacillariophyta (diatomáceas), Chlorophyta (algas verdes) e cloroplastos. A identificação destas sequências em grupos não bacterianos pode ser resultado de: a) inespecificidade dos *primers* universais para o Filo Cyanobacteria; b) insuficiência de sequências de referência no banco de dados; c) presença desses grupos no solo exposto pela geleira Baranowski. Embora muitos trabalhos tenham relatado a presença de diatomáceas (GUPTA, 2002; VAN DE VIJVER et al., 2008) e algas verdes (OLIVEIRA et al., 2009; RAUTENBERGER e BISCHOF, 2006) na superfície do solo antártico, a última hipótese não explica a identificação parcial de algumas sequências em "Cyanobacteria não classificadas".

Quadro 2 - Número de sequências de Baranowski classificadas nos 50 gêneros mais abundantes, classificadas segundo a ferramenta Classifier (RDP). O *cutoff* utilizado para gênero foi 0,05.

Gêneros	Amostras													
	BAI-09	BS01-04	BS03-04	BS05-04	BS07-04	BS09-04	BS11-04	BS14-04	BS01-09	BS02-09	BS04-09	BS06-09	BS10-09	BS12-09
Acidothermus	0	5	0	41	52	26	13	0	0	0	0	14	0	4
Aeromicrobium	0	13	0	26	27	19	17	0	0	0	31	56	35	29
Arthrobacter	0	106	2	8	7	11	52	10	21	0	6	190	123	189
Azospira	0	0	0	0	0	0	0	2	91	0	0	0	0	0
Bacillariophyta (euc.)	149	4	4	4	16	3	5	5	1	0	5	6	3	0
Bradyrhizobium	44	6	0	11	4	4	2	8	3	10	37	2	0	22
Chlorophyta (euc.)	32	3	2	1	5	0	0	1	1	0	0	51	8	0
Conexibacter	0	21	9	44	59	50	165	16	1	0	48	106	48	1
Corynebacterium	60	0	0	0	0	0	4	1	1	0	1	2	0	0
Deinococcus	0	58	0	0	1	8	28	0	0	0	0	0	0	2
Escherichia/Shigella	0	2	0	13	1	0	0	8	11	6	119	6	0	0
Ferruginibacter	5	13	0	4	2	0	11	9	1	1	1	34	32	62
Flavobacterium	49	0	0	0	1	0	9	5	5	1	1	3	15	48
Gemmatimonas	0	108	329	179	117	118	166	171	212	9	156	75	74	152
Gp16	0	119	299	356	137	344	121	102	8	7	67	133	24	54
Gp17	0	1	0	16	11	9	9	3	0	6	18	5	0	16
Gp4	0	102	1	55	78	90	139	23	7	12	71	24	63	56
Gp6	0	109	66	180	85	108	63	105	46	29	120	58	53	97
Iamia	0	13	57	80	46	52	54	8	0	0	24	90	19	10
Ilumatobacter	13	48	18	30	59	30	50	8	48	5	26	18	60	26
Legionella	0	4	0	13	2	3	4	3	2	0	1	25	74	3
Luteimonas	0	174	5	8	9	5	44	5	0	0	4	6	18	195
Luteolibacter	0	41	78	36	24	30	88	30	0	2	2	2	33	151
Lysobacter	0	74	55	32	54	55	36	81	4	1	62	75	4	16
Massilia	2	4	0	2	4	1	2	0	69	0	0	10	3	3
Methylobacterium	66	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	0	0	0
Methylophilus	4	0	3	3	2	1	0	91	37	0	9	50	20	4
Mycobacterium	66	1	3	15	0	0	0	3	1	1	13	8	0	0
Nitrospira	0	78	5	34	2	0	5	6	0	1	1	6	16	33
Nocardioides	0	83	56	265	301	166	211	75	1	0	109	220	155	48

(continua)

(conclusão)

Gêneros	Amostras													
	BAI-09	BS01-04	BS03-04	BS05-04	BS07-04	BS09-04	BS11-04	BS14-04	BS01-09	BS02-09	BS04-09	BS06-09	BS10-09	BS12-09
Novosphingobium	0	13	61	19	21	11	13	47	16	0	35	65	9	23
Perlucidibaca	0	0	0	0	0	0	0	0	123	0	0	0	0	0
Polaromonas	4	48	8	3	4	0	7	32	78	0	11	18	16	129
Pseudomonas	24	2	4	34	7	6	1	30	150	28	119	41	78	345
Rhizobium	733	7	0	0	1	0	0	2	0	1	0	1	0	0
Rhodanobacter	0	76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Rhodococcus	0	23	0	12	0	3	14	58	0	0	0	0	9	8
Rhodoferax	0	0	4	2	5	0	1	26	202	1	5	10	70	10
Rhodopseudomonas	0	8	33	22	1	2	20	102	0	1	33	16	14	17
Saccharopolyspora	0	55	8	4	16	114	133	7	0	0	1	0	0	0
Solirubrobacter	0	1	0	43	13	2	5	3	2	5	9	3	2	0
Spartobacteria (g.i.s.)	0	73	26	82	26	50	215	23	4	14	74	24	129	87
Sphingomonas	8	106	82	257	100	104	71	240	18	7	71	86	11	55
Staphylococcus	59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Stenotrophomonas	150	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Subdivision3 (g.i.s.)	0	42	125	55	37	96	98	144	8	8	68	47	96	103
Syntrophococcus	89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thiobacillus	0	0	1	3	4	0	0	18	323	1	13	37	2	1
TM7 (g.i.s.)	0	20	7	31	6	12	13	15	1	6	6	45	35	62

Abreviações: (g.i.s.) = *genera incerta sedis*; (euc.) = organismos eucariontes

Figura 51 - Ranking dos 50 gêneros mais abundantes obtidos através do pirosequenciamento das amostras de gelo e solos de Baranowski coletados em 2004 e 2009. A classificação das sequências foi realizada através da ferramenta Classifier (RDP). Abreviações: (g.i.s.) – *genera incertae sedis*.

Quadro 3 - Gêneros de micro-organismos fixadores de nitrogênio encontrados no gelo e solos de Baranowski.

Gêneros	Amostras													
	BAI-09	BS01-04	BS03-04	BS05-04	BS07-04	BS09-04	BS11-04	BS14-04	BS01-09	BS02-09	BS04-09	BS06-09	BS10-09	BS12-09
Aquaspirillum	0	0	0	2	0	0	1	1	8	0	0	0	2	1
Azohydromonas	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Azospira	0	0	0	0	0	0	0	2	91	0	0	0	0	0
Bradyrhizobium	44	6	0	11	4	4	2	8	3	10	37	2	0	22
Clostridium	0	5	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	10	0
Cyanobacteria (n.c.)	14	31	1	1	19	1	5	2	0	0	4	6	3	0
GpXIII	0	10	0	0	27	5	6	0	0	0	0	1	0	0
Herbaspirillum	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
Methylobacterium	66	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	0	0	0
Rhizobium	733	7	0	0	1	0	0	2	0	1	0	1	0	0
Rhodobacter	0	4	9	4	0	1	1	5	26	0	9	22	8	10
Rhodopseudomonas	0	8	33	22	1	2	20	102	0	1	33	16	14	17
Total (vida livre)	14	48	44	30	20	5	27	111	34	1	46	44	37	28
Total (simbionte)	843	14	0	11	5	4	2	12	95	11	42	3	0	24

Abreviações: (n.c.) = sequências não classificadas até o nível gênero

4.2.8 Análise comparativa dos resultados da clonagem e pirosequenciamento

Além do pirosequenciamento, as amostras de gelo BAI-09 e de solos BAS01-04 e BAS14-04 também foram estudadas com o método de clonagem e sequenciamento de Sanger e, portanto, os resultados obtidos entre as duas técnicas podem ser comparados. Cabe ressaltar que as técnicas de clonagem e pirosequenciamento empregaram *primers* diferentes para amplificar o gene 16S rRNA e geram amplicons de tamanhos diferentes, portanto, a região de sobreposição entre as sequências não é suficiente para uma comparação direta dos resultados. Desta forma, os métodos podem ser comparados quanto ao resultado da classificação e estimativas de riqueza (alfa-diversidade).

Os Filos dominantes observados na clonagem das amostras de gelo e solo foram Proteobacteria e Actinobacteria, seguidos em menor proporção por Gemmatimonadetes, Firmicutes e outros grupos (Figura 25). O método do pirosequenciamento também revelou os Filos Proteobacteria e Actinobacteria como dominantes, além dos Filos Gemmatimonadetes, Verrucomicrobia e Acidobacteria em menores abundâncias (Quadro 1). O método do pirosequenciamento foi ainda capaz de detectar grupos que não apareceram nas análises por clonagem, como os Filos Chlamydiae, Fusobacteria, Deinococcus-Thermus, Planctomycetes, Tenericutes, Spirochaetes e Synergistetes, bem como os Filos candidatos BRC1, OD1, OP10, TM7 e WS3. Todos estes grupos foram observados como membros raros das comunidades do solo de Baranowski.

A amostra de gelo BAI-09 apresentou, no método de clonagem, apenas o Filo Proteobacteria como dominante (93% dos clones), seguido de Actinobacteria (5%) e Cyanobacteria (1%). Estes Filos também foram observados através do pirosequenciamento, mas em proporções diferentes: Proteobacteria (67%), Actinobacteria (10%), Cyanobacteria (8%), além de Firmicutes (10%).

A amostra de solo mais distante da geleira (BAS14-04) apresentou, no método de clonagem, os Filos Proteobacteria (72%) como dominante, seguido por Actinobacteria (10%), Bacteroidetes (5%), Gemmatimonadetes (3%) e Acidobacteria (3%). Através do método de pirosequenciamento, esta amostra apresentou, com menor proporção, o Filo Proteobacteria (46%) como dominante, seguido por Actinobacteria (17%), Verrucomicrobia (9%), Acidobacteria (8%) e Gemmatimonadetes (5%). Apesar dos dois métodos apresentarem o Filo Proteobacteria como mais abundante nesta amostra, a clonagem não foi capaz de detectar os Filos Verrucomicrobia, e o pirosequenciamento detectou os Filos Actinobacteria, Acidobacteria e Bacteroidetes (1%) em proporções diferentes.

As diferenças entre os métodos é mais clara ao comparar a amostra de solo próxima à geleira (BAS01-04). Para esta amostra, a clonagem detectou o Filo Actinobacteria (53%) como dominante, seguido por Proteobacteria (20%), Bacteroidetes (12%) e Gemmatimonadetes (7%). Por outro lado, o pirosequenciamento apresentou o Filo Proteobacteria (35%) como dominante, seguido por Actinobacteria (20%), Acidobacteria (12%) e Verrucomicrobia (6%). Os dois métodos apresentaram Proteobacteria e Actinobacteria como membros mais abundantes da comunidade de BAS01-04, porém em proporções diferentes. Além disso, os grupos de menor abundância também foram diferentes entre os dois métodos.

O resultado da identificação, classificação e abundância de sequências de 16S rRNA pode variar de acordo com o método utilizado no estudo da comunidade. As maiores diferenças ocorrem por *biases* durante as reações de PCR, sobretudo na escolha dos *primers*, concentrações dos reagentes de PCR, número de ciclos, e pureza e concentração do DNA ambiental (ACINAS et al., 2005; MARTIN-LAURENT et al., 2001). Além de *biases* no PCR, diferenças podem ocorrer em virtude do método de coleta das amostras, do armazenamento e transporte das amostras, do tempo entre a coleta e o processamento, e dos diferentes protocolos de extração do DNA total. O estudo da sucessão ecológica em solos expostos pela geleira Baranowski envolveu duas metodologias independentes de cultivo (clonagem e pirosequenciamento) em amostras de solo coletadas em duas épocas diferentes (2004 e 2009). A clonagem e o pirosequenciamento da amostra 2004, especificamente, apresentaram diferenças quanto à composição dos membros e quanto à estrutura da comunidade, apesar dos métodos terem sido aplicados sobre o mesmo DNA extraído. Portanto, as diferenças encontradas decorrem das particularidades de cada método. Por exemplo, a clonagem foi realizada com os *primers* 27F e 1401R, e sequenciado os primeiros 600-650 pb do gene 16S rRNA (regiões hipervariáveis V1-V4), enquanto no pirosequenciamento foram empregados os *primers* 520F e 802R, cuja região alvo é a hipervariável V4. As reações de PCR em cada método podem ter causado a amplificação preferencial de determinadas sequências da comunidade microbiana, resultando nas diferenças encontradas entre membros mais e menos abundantes. Além disso, mesmo empregando a mesma metodologia para identificação e classificação das sequências (método Bayesiano de busca – RDP-Classifer), as sequências da clonagem possuem mais informação genética que as do pirosequenciamento (650 pb e 200 pb, respectivamente). Uma maior quantidade de informação genética permite, em teoria, uma identificação mais precisa de uma sequência de DNA. O método de pirosequenciamento, por outro lado, permitiu maior amostragem de sequências da comunidade, o que aumenta a

sensibilidade da técnica em detectar diferenças mais sutis entre dois organismos da comunidade.

A classificação de sequências curtas de 16S rRNA foi avaliada por Wang et al. (2007). Os autores relataram que a ferramenta Classifier do RDP foi capaz de classificar 98% das 23.095 sequências obtidas por pirosequenciamento com alto grau de confiança (> 95%) e acurácia (98%) até o nível de Gênero. Além disso, os autores observaram que a classificação varia segundo a região do gene 16S rRNA que é analisada. As regiões hipervariáveis V2 e V4 apresentaram as menores taxas de erro de classificação (WANG et al., 2007). Em outro estudo, Hamp et al. (2009) testaram o uso de diferentes *primers* no pirosequenciamento para o estudo da estrutura de comunidade microbiana. Segundo estes autores, os *primers* que amplificam as regiões hipervariáveis V1-V2 apresentaram maior confiabilidade de classificação, quando comparados aos outros *primers* testados (V6 e V6-V7). Os autores também observaram que o uso de pares de *primers* diferentes gerou diferenças na obtenção de organismos raros da comunidade. Os autores concluíram que, em casos onde o objetivo do estudo são os elementos raros, as condições experimentais e métodos de análise têm profunda influência nos resultados observados (HAMP et al., 2009).

No contexto do solo exposto por recuo da geleira Baranowski, diferenças foram observadas nas riquezas e abundâncias relativas dos organismos raros, quando comparados os solos coletados em 2004 e 2009. No entanto, as amostras de solo foram submetidas ao mesmo procedimento de extração de DNA, reação de PCR (*primers*, quantidade de DNA, etc.) e método de classificação em banco de dados, sugerindo que as diferenças encontradas nos organismos raros sejam fruto de fenômenos biológicos entre as duas coletas.

As técnicas de pirosequenciamento e clonagem foram comparadas por Huse et al. (2008). Estes autores compararam a diversidade da microbiota intestinal humana (um ambiente com muitos organismos relatados no banco de dados) e a microbiota de ventarolas marinhas (com poucas sequências depositadas). As sequências completas de 16S rRNA foram comparadas às sequências curtas das regiões hipervariáveis V3 e V6. Os autores concluíram que as sequências completas (clonagem) e curtas (pirosequenciamento) permitiram medir a abundância dos organismos das duas comunidades com alto grau de precisão, mesmo para sequências com até 15% de divergência com a referência mais próxima do banco de dados. Entretanto, o método do pirosequenciamento, ao contrário da clonagem, revelou a maioria dos membros raros da comunidade (HUSE et al., 2008). Os resultados obtidos no estudo do recuo da geleira Baranowski corroboram com estes resultados: um maior número de grupos raros foi encontrado pelo método do pirosequenciamento.

4.2.9 Aspectos gerais da sucessão ecológica nos solos expostos pela geleira Baranowski

A sucessão ecológica microbiana no início do desenvolvimento do solo, como o caso das áreas expostas por recuo de geleiras, constitui um dos fatores decisivos no estabelecimento dos futuros colonizadores. Ainda que pouco estudado, solos expostos por recuo de geleira parecem seguir um determinado padrão de sucessão ecológica independente do tipo de geleira e de sua localização geográfica. Fato que adquire importância nesta hipótese é a presença de micro-organismos heterotróficos em todas as fases da sucessão, exercendo assim um papel ativo e constante na ciclagem de nutrientes do solo.

Em solos minerais pobres como os da geleira Baranowski e outras geleiras polares e alpinas, os níveis de carbono e nitrogênio aumentam ou permanecem constante ao longo dos primeiros 20 anos de exposição do solo (BARDGETT et al., 2007; NEMERGUT et al., 2007; SCHMIDT et al., 2008). Nesta etapa inicial, a comunidade microbiana recém exposta utiliza-se do *pool* de carbono armazenado no solo antes da cobertura de gelo (BARDGETT et al., 2007). Entretanto, a quantidade de carbono disponível nem sempre é suficiente e sugere-se que haja acréscimo de carbono por outras fontes, de forma que este elemento não apresente declínio com o tempo. Alguns trabalhos demonstram o *input* eólico de matéria orgânica em solos polares (HODKINSON et al., 2002) e alpinos (SWAN, 1992), bem como o papel de cianobactérias fixando carbono e nitrogênio no início da sucessão ecológica (HODKINSON et al., 2003). Schmidt et al. (2008) observaram um aumento na quantidade de nitrogênio e de compostos orgânicos complexos no solo após 4 anos de exposição por uma geleira da Cordilheira dos Andes. Além disto, o aumento destes compostos foi correlacionado ao aumento da biomassa de cianobactérias no solo, demonstrando, assim, a importância destes micro-organismos nas etapas iniciais da sucessão ecológica. No caso do solo exposto pela geleira Baranowski, as sequências classificadas como cianobactérias nos solos recém expostos não foram consideradas abundantes, em ambos os métodos de estudo. Ao mesmo tempo, cianobactérias e outros fixadores de nitrogênio foram observados ao longo de toda a cronosequência, sugerindo que a sucessão ecológica no solo da Antártica desenvolve-se de forma diferente da alpina. Mesmo assim, os micro-organismos diazotróficos constituem um grupo relevante no aporte biológico de C e N no solo recém exposto da geleira Baranowski.

A composição e diversidade microbiana nos solos expostos por recuo de geleira parece não apresentar uma tendência tão evidente. Como exemplo, a diversidade microbiana no solo exposto por duas geleiras dos Alpes Suíços (Damma e Rotfirn) foram avaliadas através da

técnica de DGGE (SIGLER e ZEYER, 2004). Apesar de ambas as cronossequências apresentarem características físico-químicas semelhantes, a estrutura de comunidade envolvida na sucessão ecológica dos solos foi diferente entre as duas. Os autores ainda observaram que as comunidades em cada etapa do transecto da geleira Damma foram gradualmente diferentes entre si, enquanto as comunidades no solo da geleira Rotfirm apresentaram poucas diferenças.

Nemergut et al. (2007) estudaram a sucessão ecológica em uma cronossequência da Cordilheira Vilcanota (Andes peruanos), em uma escala de 0, 4 e 20 anos de exposição do solo. Esta escala é muito similar à área da geleira Baranowski, o que permite comparar o desenvolvimento da comunidade microbiana nos dois estudos. Estes autores concluíram que a riqueza e a diversidade encontrada nos solos da Cordilheira Vilcanota aumentaram ao longo do tempo, e o mesmo resultado foi observado nos solos de Baranowski. Ambos os resultados foram obtidos pelo método da clonagem. No entanto, o método de pirosequenciamento revelou uma flutuação na riqueza e diversidade ao longo do transecto de Baranowski. Estas diferenças podem ser explicadas pelo fato das análises baseadas em clonagem terem considerado apenas 3 (Vilcanota) ou 2 (Baranowski) amostras da cronossequência.

Quanto à composição dos membros de comunidade, os micro-organismos envolvidos na sucessão ecológica do solo de Vilcanota e Baranowski foram diferentes. No trabalho de Nemergut et al. (2007), o início da sucessão apresentou como dominantes os grupos *Beta-proteobacteria* (~66%) e *Cyanobacteria* (~5 - 15%). Estes dois grupos apresentaram os gêneros *Polaromonas*, *Variovorax* e *Rhodoferrax* (*Beta-proteobacteria*) e os gêneros *Chamaesiphon* e *Leptolyngbya* (*Cyanobacteria*) como mais frequentes. No solo recém exposto pela geleira Baranowski, o pirosequenciamento também detectou o Filo *Beta-proteobacteria* (48% para BAS01-09) e os gêneros *Polaromonas* e *Rhodoferrax*, além de *Thiobacillus*, como dominantes. Entretanto, o Filo *Cyanobacteria* (0,6%) não foi predominante nesta amostra através do pirosequenciamento. O método de clonagem para a amostra recém exposta (BAS01-04) apresentou o Filo *Actinobacteria* (53%) como dominante, os quais foram encontrados em baixas quantidades durante toda a sucessão ecológica da Cordilheira Vilcanota.

Nas amostras de solo mais distantes da geleira andina, Nemergut et al. (2007) encontraram *Cyanobacteria* (~25-30%) como dominante, seguido por *Acidobacteria* (~15%). As espécies de *Beta-proteobacteria* (<5%) praticamente desapareceram neste estágio da sucessão ecológica. Através do método da clonagem, o solo mais distante da geleira Baranowski (BAS14-04) não apresentou clones associados à *Cyanobacteria* no final da

cronosseguencia, e os membros dominantes nesta etapa foram *Sphingomonas* (Alpha-proteobacteria). Este último grupo foi pouco frequente (~10%) durante toda a sucessão nos solos andinos. O método do pirosequenciamento apresentou, para a amostra BAS12-09, os grupos Gamma-proteobacteria (32%), Actinobacteria (17%) e Beta-proteobacteria (12%) como mais abundantes, contrapondo os resultados dos solos expostos a mais tempo na Cordilheira Vilcanota.

As diferenças entre os grupos envolvidos na sucessão ecológica dos solos alpinos e polares podem estar associadas a diferentes fatores, como propriedades físico-químicas, disponibilidade nutricional no solo, *input* de matéria orgânica, ou eventos ambientais particulares de cada ambiente (intensidade luminosa, variações sazonais, entre outros). A exemplo disso, os solos polares estão sujeitos a variações de temperatura e luminosidade sazonais. Por outro lado, os solos alpinos tem pouca variação sazonal, mas muitas mudanças de temperatura ao longo do dia (CUATRECASAS, 1968; HEDBERG e HEDBERG, 1979).

No entanto, as características comuns entre os solos expostos por recuo de geleira impõem pressões seletivas semelhantes nas comunidades, direcionando o curso da sucessão ecológica. Neste contexto, torna-se importante elucidar como a comunidade microbiana se comporta frente a estes diferentes fatores, sobretudo em caso de aquecimento local ou global.

4.3 Diversidade funcional de genes *alk* em solos *permafrost*

4.3.1 Extração do DNA total das amostras de *permafrost*

O DNA total dos *permafrosts* foi extraído a partir de 10 g de cada amostra, ressuspensos em um volume final de 3 mL de água MilliQ e checado quanto à concentração de DNA por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Após a eletroforese, nenhum DNA foi detectado nas amostras de *permafrost*. Uma exceção foi observada para a amostra P04, a qual apresentou DNA visível em gel, porém degradado. O mesmo resultado foi observado quando maiores volumes da extração (10 - 20 µL) foram aplicados na eletroforese.

A ausência de DNA nos géis de eletroforese pode significar que nenhum material genético foi extraído, ou a pouca quantidade de DNA no final da extração estava em concentrações abaixo da resolução do gel de agarose (assumindo um limite de detecção de 20 ng por canaleta).

De fato, as amostras de *permafrost* utilizadas neste trabalho apresentam diferenças de origem geológica (sedimentos marinhos, solos ou material vulcânico), localização geográfica, temperatura, características físico-químicas, tempo desde o congelamento (de milhares a milhões de anos) e concentração de células (VOROBYOVA et al., 1997; Dr. David Gilichinsky, comunicação pessoal)¹². Tais características podem refletir em pouca quantidade de DNA extraído, mesmo em 10 g de amostra.

A amostra P04 foi coletada nas camadas superficiais do solo congelado (5-20 cm) da tundra da baixada Kolyma (Sibéria) e, por este motivo, apresentavam pequenas raízes de plantas e muito material orgânico. A degradação do DNA desta amostra pode ser explicado pela ação de nucleases presentes neste solo.

4.3.2 Amplificação de 16S rRNA nas amostras de *permafrost*

A amplificação do gene 16S rRNA por PCR pode ser utilizada como um indicador da presença de bactérias em amostras ambientais. Desta forma, aplicou-se a técnica de PCR com *primers* universais para o gene 16S rRNA de Bacteria de forma a avaliar o sucesso da extração de DNA e determinar a presença ou não de inibidores na reação.

¹² Comunicado em reunião científica do laboratório, Pushchino, Rússia.

Figura 52 - Produto de amplificação do gene 16S rRNA em gel de agarose 1%. Canaletas: M = 470 ng do marcador Low DNA Mass[™] Ladder (Invitrogen); P01 a P17 – amostras de *permafrost*. (+) controle positivo *E. coli*; (-) controle negativo. A seta indica a banda de aproximadamente 1400 pb, que corresponde ao produto de PCR esperado.

O gene 16S rRNA foi amplificado com sucesso em todas as amostras de *permafrost* (Figura 52). Este gene está presente em todas as bactérias da comunidade e, por este motivo, sua amplificação é uma evidência indireta da presença de DNA nas amostras de *permafrost*, ainda que em baixas concentrações. Por outro lado, os genes funcionais *alk* encontram-se apenas em grupos específicos da comunidade microbiana, o que pode dificultar a amplificação por PCR em amostras com baixas concentrações de DNA. Desta forma optou-se por amplificar o DNA total das amostras através do kit TempliPhi[™].

Após a reação *overnight* com TempliPhi[™], as amostras foram quantificadas em NanoDrop[™] e o produto foi diluído em água MilliQ esterilizada para uma concentração final de 30 ng.μL⁻¹.

4.3.3 Caracterização da estrutura de comunidade do *permafrost* através da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

O experimento de DGGE foi realizado com o objetivo de comparar a estrutura de comunidade das amostras de *permafrost* (Figura 53). Os perfis de bandas de DGGE foram comparados no *software* BioNumerics e dendrogramas de similaridade foram gerados.

Figura 53 - Gel de eletroforese em gradiente desnaturante (40%-70%) das amostras de *permafrost*, com *primers* que amplificam a região V3 do gene 16S rRNA. As amostras sinalizadas com as letras "a", "b" e "c" indicam réplicas de extração de DNA. Canaletas: C- Controle positivo de reação (*Exiguobacterium* sp.); P01 a P17 - amostras de *permafrost*.

As amostras de *permafrost* P02, P03, P04, P05, P06b, P08, P10, P11 e P12a não apresentaram bandas visíveis no gel gradiente. A amostra P04, especificamente, apresentou um rastro de ácidos nucleicos distribuída ao longo da canaleta e isto é, muito provavelmente, reflexo da degradação do DNA da amostra no procedimento de extração do DNA total. As demais amostras apresentaram bandas muito fracas (P05 e P10) ou nenhuma banda visível (P02, P03, P06b, P08, P11, P12a). Uma provável explicação para tal resultado é a baixa quantidade de produto de PCR aplicada nas canaletas (10 µL de um volume de reação de 25 µL), ou ainda que o DNA destas amostras foi perdido durante a purificação do produto de PCR. Essas amostras foram desconsideradas para as análises dos perfis de bandas.

O experimento de DGGE demonstrou que as amostras de *permafrost* são diferentes entre si quanto à estrutura de comunidade. Para testar esta hipótese, os perfis de bandas foram comparados utilizando os métodos de Neighbor Joining e UPGMA, com os coeficientes de Jaccard e Dice.

Os testes iniciais, onde todas as amostras com bandas no DGGE foram comparadas, demonstraram um agrupamento entre as amostras de *permafrost* da Antártica (P13, P14, P15, P16, P17) coletadas no mesmo ponto, em profundidades diferentes (Figura 54). Nos testes subsequentes, optou-se por excluir as amostras P14, P15 e P16 (pontos intermediários), e manter apenas as amostras P13 e P17 (que representam os limites superior e inferior do ponto de coleta) e as outras amostras de *permafrost* da Sibéria (Figuras 55-56).

Figura 54 - Dendrograma de similaridade de perfis de bandas para todas as amostras de *permafrost*. Método: UPGMA, coeficiente de Dice.

Figura 55 - Dendrograma de similaridade dos perfis de bandas de *permafrost*. Método: UPGMA, coeficiente de Dice.

Figura 56 - Dendrograma de similaridade dos perfis de bandas de *permafrost*. Método: UPGMA, coeficiente de Jaccard.

O agrupamento de perfis de DGGE revelou alta variabilidade entre as amostras de *permafrost*. Os valores de distância entre as amostras variaram de 50 a 76% sob o coeficiente de Dice, e de 34 a 63% para o coeficiente de Jaccard. Este resultado sugere que as amostras de *permafrost* possuem estruturas de comunidade diferentes, independentemente da origem (solo ou sedimento marinho), posição geográfica (Ártico ou Antártica) e idade de congelamento. As amostras P09 e P12b formaram o grupo menos distante entre os demais, com aproximadamente 76% de similaridade. Estas duas amostras foram coletadas em ambientes diferentes, sendo P09 no Ártico e P12b na Antártica. Embora tenham os dois perfis mais similares, um valor de 76% ainda pode refletir duas comunidades diferentes. Cabe ressaltar que a repetição de extração de DNA da amostra P12 (P12b, P12c) gerou perfis de bandas diferentes. Após o agrupamento no dendrograma, estas repetições de extração também permaneceram em grupos diferentes. Cabe ressaltar que P12b e P12c foram extraídas com o mesmo método (10g de amostra, kit DNA PowerMax Soil, MoBio) mas o material submetido à extração provém de seções diferentes do *permafrost*, isto é, o material extraído em P12b foi retirado da superfície superior da amostra, enquanto P12c foi retirada da superfície inferior (aproximadamente 5 cm). Por se tratar de um testemunho de solo congelado, a diferença de 5

cm entre as superfícies da amostra pode representar centenas ou milhares de anos de sedimentação. Esta variação pode resultar em comunidades microbianas diferentes quando analisadas em DGGE.

O conjunto de amostras P13-17 foram comparados isoladamente em outra série de experimentos. Estas amostras consistem de um perfil temporal de sedimentos marinhos no *permafrost* da Ilha Rei George, Península Antártica. Os dendrogramas construídos com estas amostras indicaram uma correlação entre a profundidade e a similaridade da estrutura de comunidades (Figuras 57-58).

Figura 57 - Dendrograma de similaridade dos perfis de bandas gerado a partir do testemunho de *permafrost* da Ilha Rei George, Antártica. Método: UPGMA, coeficiente de Dice.

Figura 58 - Dendrograma de similaridade dos perfis de bandas gerado a partir do testemunho de *permafrost* da Ilha Rei George, Antártica. Método: Neighbor Joining, coeficiente de Dice. As setas azuis apontam as bandas comuns a todas as amostras. Enquanto as setas vermelhas indicam bandas comuns às amostras mais profundas do testemunho (P15, P16 e P17).

Os dois métodos e os dois coeficientes empregados não demonstraram variações significativas na estrutura do dendrograma. Há pelo menos duas populações (bandas indicadas por uma seta azul na Figura 58) que estão presente em todas as amostras. Assumindo que este *permafrost* tem entre 5.000 (P13) e 30.000 anos (P17), estas populações podem representar espécies bacterianas presentes no ambiente antártico durante milhares de anos. Algumas

bandas (setas vermelhas na Figura 58) estão presentes apenas nas amostras P15, P16 e P17, indicando que algumas populações habitavam o sedimento marinho antártico durante alguns milhares de anos e desapareceram após algum evento ambiental ou biológico. A composição dos membros da comunidade destas amostras de *permafrost* está sendo avaliada pela equipe do Dr. Gilichinsky, bem como os parâmetros físico-químicos que serão utilizados para correlacionar com o perfil de bandas do DGGE.

4.3.4 Detecção de genes *alk* por PCR nas amostras de *permafrost*

A presença ou ausência de micro-organismos degradadores de alcanos nas amostras de *permafrost* foi detectada através da amplificação de genes *alk* (Tabela 26). As reações de PCR foram realizadas com o DNA amplificado por TempliPhitm. Adicionalmente, a amostra de solo recém exposto por recuo da Geleira Baranowski (BAS01-04) foi inserida nas análises.

Tabela 25 - Resultado da amplificação dos genes *alk* e 16S rRNA.

Amostra	Ambiente	Alk	16S rRNA
P01	Ártico	+	+
P02	Ártico	-	+
P03	Ártico	-	+
P04	Ártico	-	-
P05	Antártica	-	+
P06	Ártico	-	+
P07	Ártico	+	+
P08	Antártica	-	+
P09	Ártico	-	+
P10	Ártico	+	+
P11	Ártico	-	+
P12	Antártica	-	+
P13	Antártica	-	+
P14	Antártica	-	+
P15	Antártica	-	+
P16	Antártica	-	+
P17	Antártica	-	+
BAS01-04	Antártica (solo)	+	+

(+) Presença de banda do tamanho esperado em gel de eletroforese 1%;

(-) Ausência de produto de amplificação.

O gene *alk* foi detectado em amostras de *permafrost* do Ártico, mas não foi observado nas amostras de *permafrost* da Antártica. Entretanto, a amostra de solo exposta por recuo de geleira na Antártica (BAS01-04), que pode ser considerado um solo moderno, apresentou produto de amplificação do gene *alk*.

No Ártico, o gene *alk* foi amplificado em amostras de solo que congelaram no meio do Plioceno (3,0 milhões de anos), bem como em *permafrost* de sedimentos marinhos congelados durante o Pleistoceno (120.000 anos). O Plioceno corresponde à última época do Período Terciário da Era Cenozóica (de 5 a 2 milhões de anos). Nesta época, os continentes se localizavam a no máximo 70 km das posições atuais. A aproximadamente 3 milhões de anos ocorreu o cessamento da troca de correntes oceânicas entre o Atlântico e o Pacífico (formação do Istmo do Panamá), um dos fenômenos mais importantes na determinação do clima do Planeta. Isto resultou em um esfriamento das águas do Atlântico, o que contribuiu para o aumento das calotas polares, tanto do Ártico como da Antártica (BARTOLI et al., 2005). O Pleistoceno é a época que sucede o Plioceno na escala geológica e abrange de 1,8 milhões de anos a 11.500 anos atrás. Nesta época o esfriamento global estendeu-se das águas oceânicas para os continentes, em eventos conhecidos como glaciações ou "Eras Glaciais". A extensão do gelo glacial chegou a cobrir cerca de 30% da superfície da Terra. No círculo polar Ártico, a tundra estendeu-se para o sul da Eurásia e grande parte deste solo tornou-se *permafrost* (GIBBARD e VAN KOLFSCHOTEN, 2004).

A amostra mais antiga analisada neste projeto foi P12, coletada a 14 m de profundidade nos Beacon Valleys, Antártica. Segundo a datação por radionuclídeos, estima-se que esta amostra foi congelada há 8,0 milhões de anos e corresponde a uma das amostras ambientais mais antigas do mundo já analisadas por microbiologistas (JOHNSON et al. 2007). Nesta amostra foram amplificados apenas fragmentos do gene 16S rRNA, mas não dos genes funcionais *alk*, apesar de terem sido analisadas pontualmente devido a dificuldade de acesso. Isto sugere que, se os genes funcionais não estiverem presentes nesta amostra, o DNA dos micro-organismos pode ser preservado por longos períodos de tempo e pode ser amplificado por PCR.

4.3.5 Análise dos clones de gene *alk* das amostras de *permafrost* e solo

Bibliotecas de genes *alk* foram construídas para as amostras de *permafrost* e solo que apresentaram produto de amplificação por PCR. Após a clonagem, foi realizada uma segunda PCR, com os *primers* M13f-M13r, a fim de amplificar a região do vetor que contém o inserto (542 pb), e a presença deste foi checado em gel de eletroforese 1,5%. O inserto específico foi confirmado em um total de 58 clones das bibliotecas de três amostras do Ártico (P01, P07 e P10) e de uma amostra da Antártica (solo BAS01-04), os quais foram selecionados para sequenciamento.

Cada sequência do gene *alk* foi analisada quanto à qualidade do sequenciamento no *software* Phred através do site da EMBRAPA. Todas as 58 sequências analisadas apresentaram *score* > 31 e, portanto, foram consideradas com boa qualidade de sequenciamento.

Inicialmente, as 58 sequências de genes *alk* foram identificadas no banco de dados GenBank (NCBI) através das ferramentas BLASTN e TBLASTX. As sequências com maior valores de similaridade do banco de dados foram selecionadas como sequências de referência (Tabela 27).

Tabela 26 - Identificação das sequências de alceno monooxigenases clonadas a partir de amostras de solo e *permafrost*, com suas respectivas sequências referência mais próximas.

Clone ¹	Sequência referência	Similaridade (%)	e-value
BAS01-001	Uncultured clone alkB9 (GU184298)	73.17	1.00E-78
BAS01-011	Uncultured clone alkB W1-174 (DQ288067)	81.3	2.00E-139
BAS01-013	Uncultured clone alkB9 (GU184298)	72.97	7.00E-76
BAS01-027	Uncultured clone alkB W1-174 (DQ288067)	85.74	4.00E-167
P01-06	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.42	1.00E-54
P01-07	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.6	1.00E-54
P01-09	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.42	1.00E-54
P01-11	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.6	1.00E-54
P01-13	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	98.48	1.00E-54
P01-14	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.6	1.00E-54
P01-17	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.91	1.00E-54
P01-18	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	98.72	1.00E-54
P01-19	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.6	1.00E-54
P01-20	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.05	1.00E-54
P01-21	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.6	1.00E-54
P01-22	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	98.15	1.00E-54
P01-23	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.6	1.00E-54
P01-24	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.42	1.00E-54
P01-27	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	98.29	1.00E-54
P01-28	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.79	1.00E-54
P01-29	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	98.48	1.00E-54
P01-30	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.78	1.00E-54
P01-31	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.6	1.00E-54
P01-32	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.42	1.00E-54
P01-33	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.79	1.00E-54
P01-34	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.23	1.00E-54
P01-35	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.23	1.00E-54
P01-37	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.6	1.00E-54
P01-40	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.6	1.00E-54
P01-41	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.6	1.00E-54

(continua)

(conclusão)

Clone ¹	Sequência referência	Similaridade (%)	e-value
P01-42	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.42	1.00E-54
P01-43	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.79	1.00E-54
P01-46	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	98.48	1.00E-54
P01-50	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.23	1.00E-54
P01-54	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.97	1.00E-54
P01-55	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.79	1.00E-54
P01-56	Acinetobacter sp. alkM (CR543861)	97.6	1.00E-54
P01-EXT3	n.d.		
P07-03b	Uncultured clone alkB 13 (EU853391)	79.65	4.00E-123
P07-04b	Uncultured clone alkB 13 (EU853391)	79.65	4.00E-123
P07-07b	Uncultured clone alkB 13 (EU853391)	79.65	4.00E-123
P07-08b	Uncultured clone alkB 13 (EU853391)	79.65	4.00E-123
P07-03	Uncultured clone alkB9 (GU184298)	79.89	2.00E-133
P07-04	Uncultured clone alkB 13 (EU853391)	75.86	3.00E-100
P07-05	Uncultured clone alkB 13 (EU853391)	75.86	3.00E-100
P07-21	Uncultured clone BP38E2 alkM (EF467068)	70.98	5.00E-59
P07-36	Uncultured clone alkB9 (GU184298)	79.71	8.00E-132
P07-37	Uncultured clone alkB 13 (EU853391)	76.38	2.00E-108
P07-46	Uncultured clone alkB9 (GU184298)	77.89	1.00E-78
P07-50	Uncultured clone alkB9 (GU184298)	77.89	1.00E-78
P07-62	Uncultured clone alkB 13 (EU853391)	76.52	3.00E-106
P07-64cr	Uncultured clone alkB 13 (EU853391)	76.2	8.00E-107
P07-65	Uncultured clone alkB 13 (EU853391)	75.86	3.00E-100
P07-EXT3	Uncultured clone alkB9 (GU184298)	78.79	3.00E-125
P10-005	Psychrobacter sp. PRwf-1 alkB (CP000713)	70.31	4.00E-53
P10-023cr	Psychrobacter sp. PRwf-1 alkB (CP000713)	70.51	1.00E-54
P10-024cr	Psychrobacter sp. PRwf-1 alkB (CP000713)	70.51	1.00E-54
P10-035	Psychrobacter sp. PRwf-1 alkB (CP000713)	70.31	4.00E-53

¹ BAS01: solo moderno da Antártica; P01: *permafrost* do Ártico de 3 milhões de anos; P07: *permafrost* do Ártico de 15.000 anos; P10: *permafrost* do Ártico de 120.000 anos

As sequências de alceno monooxigenase das amostras de *permafrost* polares e do solo antártico apresentaram diferentes valores de similaridade com as sequências de referência, segundo o tipo de amostra. O solo antártico BAS01 apresentou 4 clones com média de 78,3% de similaridade com as sequências de referência mais próximas do banco de dados. O *permafrost* do Ártico P01 apresentou 34 clones (média de similaridade de 97,7%), o *permafrost* P07 apresentou 15 clones (média de 77,5%) e o *permafrost* P10 apresentou 4 clones (média de 70,4%).

Um clone da amostra P01 (P01-ext3) não apresentou similaridade acima de 50% com sequências do GenBank. Embora este clone tenha apresentado boa qualidade de sequenciamento (*score* > 31), nenhuma sequência do banco de dados foi selecionada como referência. De fato, o clone P01-ext3 apresentou uma sequência de DNA menor que o

esperado, ou seja, apresentou 319 pb ao invés de 542 pb. Ao contrário dos outros clones, quando a sequência do clone P01-ext3 foi traduzida para aminoácidos, ela não apresentou os *motifs* específicos e conservados da enzima alcanos monooxigenase. Esta sequência curta, sem regiões conservadas e com baixos valores de similaridade pode ser resultado de amplificação inespecífica no PCR, ou algum problema ocorrido durante a clonagem. Desta forma, este clone foi eliminado das análises seguintes.

4.3.5.1 Determinação das Famílias Protéicas Operacionais (OPF) para o gene *alk*

As Famílias Protéicas Operacionais (OPF, *Operational Protein Families*) são sequências de proteínas agrupadas conforme um grau de similaridade entre suas sequências de aminoácidos, de forma análoga ao termo Unidade Taxonômica Operacional (OTU) utilizado para sequências de DNA do gene 16S rRNA. A determinação do *cutoff* mínimo para a separação de OPF do gene *alk* foi realizada através de duas estratégias, conforme descrito por Kuhn et al. (2009) com algumas modificações.

A primeira estratégia baseou-se na construção de uma árvore de similaridade a partir do alinhamento das sequências dos clones (Figura 59). Em seguida, a árvore foi analisada e agrupamentos de clones foram identificados. Após a análise da árvore, 10 clados foram identificados segundo uma distância de aproximadamente 0,1, ou seja, um *cutoff* de 0,1 foi suficiente para separar as sequências dos clones de *alk* em 10 grupos. Este valor de *cutoff* foi comparado com o resultado obtido no segundo método, descrito abaixo.

A segunda estratégia baseou-se na construção de uma matriz de distância, seguindo um modelo de substituição de nucleotídeos de Kimura. A matriz de distância foi construída no *software* Mothur v1.9.0 e, a partir desta matriz, *rankings* de abundância de sequências foram determinados para cada intervalo de 1% de dissimilaridade. Os resultados do *ranking* de abundância foram expressos na Tabela 28.

Ao comparar as duas estratégias, observa-se que o número de OPF observados na árvore (10 grupos) foi encontrado em um *cutoff* de 0,08 na segunda estratégia (linha em negrito na Tabela 28). Para este valor de *cutoff* foram observados um total de 10 OPF, e a distribuição de sequências em cada OPF seguiu o mesmo padrão observado na árvore de similaridade. Desta forma, o *cutoff* de 0,08 (ou 92% de similaridade) foi determinado como limiar para separar duas sequências de genes *alk* nas bibliotecas analisadas.

Figura 59 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos de alcano monoxigenase das amostras de *permafrost* do Ártico (P01, P07 e P10) e do solo da Antártica (BAS01). Árvore gerada pelo método Neighbor Joining, com modelo de substituição Matriz PAM (Dayhoff). A escala representa a distância entre as sequências.

Tabela 27 - *Ranking* de abundância de sequências para cada intervalo de *cutoff* de distância. O *cutoff* escolhido para determinar OPF nos clones de *alk* está destacado em negrito.

<i>Cutoff</i> ¹	N	Número de sequências em cada OPF																											
Único	39	4	4	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	25	6	6	4	4	4	4	4	3	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0,01	14	33	4	4	4	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1														
0,02	13	33	4	4	4	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1														
0,04	12	33	4	4	4	3	2	2	1	1	1	1	1	1															
0,05	11	33	5	4	4	3	2	2	1	1	1	1	1																
0,08	10	33	6	4	4	3	2	2	1	1	1	1	1																
0,09	9	33	6	5	4	3	2	2	1	1																			
0,25	8	33	6	5	4	4	2	2	1																				
0,27	7	33	10	5	4	2	2	1																					
0,41	6	33	10	7	4	2	1																						
0,46	5	34	10	7	4	2																							
0,49	4	34	12	7	4																								
0,58	3	34	19	4																									
0,74	2	38	19																										
1,00	1	57																											

¹ Os valores de *cutoff* que não apresentaram diferenças no número total de OPF foram omitidos.

N: número total de OPF

No estudo da diversidade de genes *alk* em sedimentos marinhos da Antártica foi determinado um valor de *cutoff* de 0,18 (ou 82%) (KUHN et al., 2009). A diferença entre os valores descritos para o sedimento marinho antártico e o presente estudo podem ser explicados pela diferença no número de clones analisados. O *cutoff* descrito para as amostras de sedimento antártico foi determinado a partir de 177 sequências de genes *alk*, enquanto para o *permafrost* foram 57 sequências. Apesar dos métodos utilizados serem semelhantes, cada análise é restrita ao conjunto de sequências de cada trabalho. Desta forma, um valor de *cutoff* que represente a real diversidade de genes *alk* deveria ser calculado a partir do maior número de sequências conhecidas. Entretanto, o número de sequências de *alk* existentes nos bancos de dados é escasso, sendo necessário mais estudos sobre a diversidade funcional destes genes.

Um representante de cada OPF dos clones de *permafrost* e do solo antártico foi submetido novamente à comparação com as sequências do GenBank. Neste etapa, sequências de referência adicionais foram escolhidas, dando prioridade a sequências descritas em isolados ou a partir de genomas. A este conjunto de sequências de referência foram incluídas, ainda, 33 sequências de clones ambientais da Antártica descritas no trabalho de Kuhn et al. (2009). Portanto, o número total de sequências de genes *alk* escolhidas como referência foi de 74 sequências.

Todas as sequências dos clones de P01, P07, P10 e BAS01, e as sequências de referência, foram traduzidas para aminoácidos. As sequências de aminoácidos foram alinhadas e os sítios catalíticos da enzima alceno monooxigenase foram identificados. Uma árvore de similaridade foi construída no *software* Mega 4, contendo as 57 sequências dos clones e as 74 sequências de referência (Figuras 60-62). A mesma árvore está representada na forma de cladograma na Figura 63.

Figura 60 - Árvore de similaridade construída a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos dos clones de *permafrost* (P01, P07 e P10), clones do solo antártico (BAS01) e as sequências de referência da enzima alcano monoxigenase. Árvore gerada com o método Neighbor Joining e modelo de substituição de aminoácidos Matriz PAM (Dayhoff). A escala indica a porcentagem de divergência entre as sequências de aminoácidos. Clado aberto em detalhe: genes *alkB* de Alfa, Beta e Gamma-proteobacteria.

Figura 61 - Árvore de similaridade construída a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos dos clones de *permafrost* (P01, P07 e P10), clones do solo antártico (BAS01) e as sequências de referência da enzima alceno monooxigenase. Árvore gerada com o método Neighbor Joining e modelo de substituição de aminoácidos Matriz PAM (Dayhoff). A escala indica a porcentagem de divergência entre as sequências de aminoácidos. Clado aberto em detalhe: genes *alkM* de Gamma-proteobacteria.

Figura 62 - Árvore de similaridade construída a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos dos clones de *permafrost* (P01, P07 e P10), clones do solo antártico (BAS01) e as sequências de referência da enzima alceno monoxigenase. Árvore gerada com o método Neighbor Joining e modelo de substituição de aminoácidos Matriz PAM (Dayhoff). A escala indica a porcentagem de divergência entre as sequências de aminoácidos. Clado aberto em detalhe: genes *alkB* de Actinobacteria.

Figura 63 - Cladograma circular de agrupamento das sequências de gene *alk* dos clones de *permafrost* (P01, P07 e P10), dos clones do solo antártico (BAS01) e das sequências de referência da enzima alceno monooxigenase. Árvore gerada com o método Neighbor Joining e modelo de substituição de aminoácidos Matriz PAM (Dayhoff). A árvore foi enraizada no ramo entre os clados do gene *alkM* e *alkB*. Ramos em vermelho representam linhagens da família *alkM* (Gamma-proteobacteria); ramos em azul mostram as sequências de *alkB* (Actinobacteria); e ramos em preto correspondem às sequências de *alkB* (Alfa, Beta e Gamma-proteobacteria).

As sequências dos clones agruparam-se com genes *alk* de organismos de diferentes linhagens taxonômicas. Dentre esses, 33 sequências do *permafrost* P01 (Ártico, 3 milhões de anos) e 1 sequência do *permafrost* P07 (Ártico, 15.000 anos) foram mais similares ao gene *alkM* de *Acinetobacter* sp. (Alfa-proteobacteria). As outras 15 sequências do *permafrost* P07 foram similares ao gene *alkB* de diversos organismos do filo Proteobacteria (classes Alfa-, Beta- e Gamma-proteobacteria). As 4 sequências do *permafrost* P10 (Ártico, 120.000 anos) e

as 4 sequências da amostra de solo BAS01 (Antártica, solo recém exposto por recuo de geleira) também foram agrupadas à sequências do gene *alkB* do filo Proteobacteria.

O *permafrost* P01 apresentou sequências do gene *alkM* mais similares ao isolado ADP1 de *Acinetobacter* sp. (CR543861). Ainda neste clado, encontram-se sequências de *alkM* de outros isolados de *Acinetobacter*. Esta bactéria é uma Gram-negativa, que normalmente habita o solo e pertence à classe Gamma-proteobacteria. O gene *alkM* foi originalmente descrito no isolado ADP1 de *Acinetobacter* sp., o qual apresentou um *cluster* de genes diferente do encontrado em outros organismos (RATAJCZAK et al., 1998). Os autores deste trabalho observaram ainda que o gene *alkM* possui um regulador específico (denominado *alkR*), também diferente do sistema de regulação do gene *alkB*, e portanto estes genes representam uma nova família de alceno monoxigenases.

Os genes *alkM* já foram relatados em diferentes amostras do Ártico e da Antártica. Whyte et al. (2002) isolaram micro-organismos psicrotróficos de amostras de solo do Canadá e da Ilha Rei George (Antártica) e detectaram o gene *alkM* nestes isolados através de hibridização de colônias e amplificação por PCR com *primers* específicos para *alkB* e *alkM*. Entretanto, os autores relataram que a maioria dos isolados destas amostras apresentaram o gene *alkB*, demonstrando a prevalência de um genótipo sobre o outro. Em um trabalho similar, Luz et al. (2004) utilizaram a mesma estratégia para estudar a diversidade funcional de amostras de solo da Antártica contaminados e não contaminados com hidrocarbonetos. Neste estudo, os autores não encontraram *alkM* em nenhuma das amostras de solo, inclusive nos solos contaminados em torno da EACF na Ilha Rei George, mas observaram a presença de *alkB* e outros genes funcionais. Mais recentemente, Kuhn et al. (2009) estudaram a diversidade funcional de genes *alk* em amostras de sedimento marinho da Ilha Rei George, Antártica. Neste trabalho, os autores encontraram *alkM* em apenas 15,8% das sequências da biblioteca de genes. Estas sequências apresentaram similaridade com o gene *alkM* dos isolados ADP1 e NCIB 8250 de *Acinetobacter* sp. Cabe ressaltar que os estudos anteriores utilizaram *primers* específicos para amplificar o gene *alkM* (desenhado sobre a sequência do isolado ADP1) (WHYTE et al., 2002; LUZ et al., 2004), enquanto no trabalho de Kuhn foi empregado um par de *primers* degenerados, desenhados para amplificar alceno monoxigenases em geral (BELLICANTA, 2004). Isto sugere que, na Antártica, o gene *alkM* ocorre com mais frequência em amostras de sedimento marinho do que em solos. Por outro lado, as amostras de *permafrost* da Antártica, coletadas na mesma região (Ilha Rei George) e identificadas como sedimento marinho de 10.000 anos ou mais (P05, P13-17), não apresentaram produto de amplificação do gene *alk*. Este resultado sugere que a comunidade

microbiana com potencial para degradar alcanos alifáticos surgiu na região da Ilha Rei George em algum momento dos últimos 10.000 anos.

No Ártico, por outro lado, o gene *alkM* foi encontrado na amostra de 3 milhões de anos (P01) e na amostra de 15.000 anos (P07). Apesar de estarem preservados há 3 milhões de anos, os genes detectados apresentaram, em média, altos valores de identidade de nucleotídeos (97%) e aminoácidos (98%) com o gene *alkM* de *Acinetobacter* sp. ADP1. O clone P07-21, encontrado no *permafrost* siberiano datado em 15.000 anos, apresentou a sequência do clone BP38E2 como mais similar do banco de dados. Este último foi encontrado em sedimentos marinhos da Antártica não impactados (KUHN et al., 2009). A identidade entre P07-21 e BP38E2 foi de apenas 71% em nucleotídeos, e de 80% na sequência de aminoácidos. Este resultado indica que o clone P07-21 pode representar uma nova linhagem de genes *alkM*.

A amostra de *permafrost* P07 apresentou 93,75% dos clones (15 sequências) similares ao gene *alkB*. Na árvore filogenética construída, estes clones foram divididos em dois clados distintos, e ambos os clados contém sequências de *alkB* encontradas em diferentes organismos do Filo Actinobacteria (Figura 63). O primeiro clado, composto por 10 clones desta amostra, apresentou maior similaridade com uma sequência obtida de micro-organismos de águas superficiais do Atlântico (EU853391, dados não publicados)¹³. O segundo clado, formado por 5 clones de P07, também apresentou maior similaridade a sequências ambientais de solos contaminados com alcanos alifáticos (SCHULZ et al., 2010).

O solo recém exposto pela geleira Baranowski (BAS01) também apresentou clones similares a *alkB*. Destes, 2 clones (BAS01-011 e BAS01-027) foram mais similares a clones de *alkB* obtidos em solos de plantações de cevada da Alemanha sem histórico de contaminação por hidrocarbonetos (DQ288067, KLOSS et al., 2006), 1 clone (BAS01-001) foi mais similar ao gene *alkB* de *Conexibacter woesei* (283945692). O último clone desta amostra (BAS01-013) apresentou pouca similaridade à sequências do banco de dados. A sequência mais similar ao clone BAS01-013 foi um clone ambiental obtido em solos contaminados (SCHULZ et al., 2010). O valor de identidade entre estas duas sequências foi de 72% para nucleotídeos e 65% para aminoácidos. Este resultado indica que o clone BAS01-013 pode representar um novo gene *alkB*, presente em amostras de solo moderno da Antártica.

¹³ Informações obtidas no GenBank.

O *permafrost* P10 (Ártico, 120.000 anos) apresentou 4 clones similares ao gene *alkB* de *Psychrobacter* sp. (CP000713, dados não publicados)¹⁴. Esta bactéria é um coco-bacilo Gram-negativo da classe Gamma-proteobacteria. Essa espécie é normalmente encontrada habitando regiões frias como gelo, solos polares, sedimentos de mar profundo e *permafrost* (BAKERMANS et al., 2006). O metabolismo de *Psychrobacter* sp. está adaptado a temperaturas abaixo de 15 °C e, por este motivo, é considerado um micro-organismo psicrófilico (de onde origina o nome da espécie) (BOZAL et al., 2003).

Em ambientes polares, o gene *alkB* tem sido observado com mais frequência que *alkM* (KUHN et al., 2009; LUZ et al., 2004; WHYTE et al., 2002). Em solos naturais e contaminados por hidrocarboneto no Canadá e na Antártica, foram isoladas bactérias do gênero *Rhodococcus* sp. contendo o gene *alkB*, e estas foram consideradas os degradadores de alcanos mais abundantes do solo (WHYTE et al., 2002). O gene *alkB* também foi observado, através de técnicas independentes de cultivo, em amostras de sedimento marinho da Ilha Rei George, Antártica (KUHN et al., 2009). Neste trabalho, os autores relataram 13 OPF distintas de *alkB* em sedimentos marinhos não impactados e impactados, totalizando 84,2% dos clones analisados. No presente trabalho, o gene *alkB* foi observado em amostras polares que variam do *permafrost* de 120.000 anos ao solo moderno. Nas amostras mais recentes (P07 e BAS01) as sequências de *alkB* foram similares às alcano monoxigenases encontradas em diferentes Actinomicetos, enquanto na amostra mais antiga (P10) as sequências foram mais similares ao gene de *Psychrobacter*. Apesar do baixo número de clones analisados, estes resultados sugerem que o gene *alkB* esteve presente na comunidade microbiana de, pelo menos, 120.000 anos até o presente. Além disso, alguns genes (clones BAS01-013 e P07-21) encontrados podem representar alcano monoxigenases nunca antes descritas, tornando estas amostras de *permafrost* uma potencial fonte de estudo da evolução e biogeografia destes genes.

¹⁴ Informações obtidas no GenBank.

5 CONCLUSÕES

5.1 Diversidade microbiana em amostras de gelo da Antártica:

- A diferença geográfica entre as geleiras da Península Antártica e do Pólo Sul Geográfico não parece influenciar na quantidade de células imersas no gelo, mas influencia em termos de composição de membros da comunidade.
- O sucesso do método de extração de DNA de amostras de gelo depende do volume de amostra filtrada, sendo necessário um mínimo de 670 mL de amostra com 3×10^4 células.mL⁻¹.
- A localização da geleira dentro da Baía do Almirantado, na Ilha Rei George, Antártica, parece influenciar na composição dos membros da comunidade do gelo, mas é necessário avaliar mais clones para validar esta hipótese.
- Micro-organismos encontrados em outros ambientes frios também parecem habitam o gelo da península antártica.
- Micro-organismos psicrófilos, psicrotróficos, mesofílicos e patogênicos de diferentes taxa parecem ser capazes de sobreviver às condições extremas do gelo glacial.

5.2 Sucessão ecológica em solos expostos por recuo de geleira na Antártica:

- A comunidade microbiana do solo de frente de geleiras aumenta a concentração de K, Mg⁺², NH₄⁺ e NO₃⁻ em cerca de 20 anos de exposição do solo.
- A exposição de áreas de solo cobertas por gelo aumenta o fluxo de CO₂ da região por conta da atividade metabólica microbiana, elevando os níveis de CO₂ na atmosfera.

- A comunidade microbiana do solo exposto por recuo da geleira Baranowski passa por eventos de sucessão ecológica, segundo os resultados do DGGE, clonagem e pirosequenciamento.
- A sucessão ecológica ocorre em 3 etapas: a) comunidade estabelecida abaixo da geleira é exposta à atmosfera, b) nos primeiros anos de exposição, a comunidade é substituída por outros micro-organismos, que sofrem mudanças lentas e graduais na estrutura de comunidade nos próximos 15-20 anos, c) a comunidade sofre outra rápida mudança após completar 20-25 anos de exposição, provavelmente devido ao acúmulo de potássio, magnésio ou nitrogênio (NH_4^+ e NO_3^-) ao longo deste tempo. Esta hipótese é fundamentada pelos resultados do DGGE, clonagem e pirosequenciamento (variação nos índices de riqueza e diversidade, mapas de cor, diagramas de Venn, teste de Parcimônia, e composição dos membros de comunidade).
- Os testes de hipótese Libshuff, Parcimônia e UniFrac não apresentaram resultados consistentes entre si, como já relatado na literatura através de estudos estatísticos simulados.
- O metabolismo de Carbono e Nitrogênio não segue o mesmo padrão durante o desenvolvimento do solo. O metabolismo heterotrófico ocorre ao longo de todo o solo exposto, enquanto no metabolismo do ciclo do nitrogênio predominam cianobactérias no solo recém exposto, torna-se quase ausente nos primeiros anos, e nos próximos 15-20 anos passa a ser executado por outros fixadores de nitrogênio como *Rhodopseudomonas*.
- Os micro-organismos da geleira Baranowski parece não influenciar a comunidade do solo logo à frente da geleira.
- A sucessão ecológica no solo exposto por recuo de geleira na Antártica envolve micro-organismos diferentes daqueles presentes em solos de geleira alpina.
- A diversidade de membros e estrutura de comunidade microbiana é estimada de formas diferentes pelos métodos de clonagem e pirosequenciamento.

5.3 Diversidade funcional de alcano monoxigenase em amostras de *permafrost* e solos do Ártico e Antártica:

- O DNA microbiano é preservado em amostras de *permafrost* de até 8 milhões de anos, e é passível de amplificação por PCR.
- A diversidade microbiana do *permafrost* varia conforme a origem geográfica e geológica das amostras.
- Mudanças na comunidade microbiana do *permafrost* são detectadas na escala de alguns milhares de anos, segundo os resultados do DGGE para as amostras P13-P17 e assumindo que estas amostras tem entre 5.000 e 15.000 anos.
- O gene *alk* ocorre em amostras de *permafrost* de até 3 milhões de anos, no Ártico.
- A diversidade funcional de alcano monoxigenases parece ser específica para cada amostra de *permafrost*
- Os primers degenerados para as famílias de alcano monoxigenases detectam *alkM* com eficiência em amostras ambientais
- As amostras de *permafrost* do Ártico e Antártica testadas não possui os genes *alkB* normalmente encontrados em sedimentos antárticos por outros pesquisadores.
- Novos genes *alk* podem existir em amostras de *permafrost* P07 (15.000 anos) e o solo moderno da Antártica BAS01, mas estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

REFERÊNCIAS¹⁵

- ABYZOV, S. S. Microorganisms in the Antarctic ice. In: FRIEDMANN, E. I. (Ed.). **Antarctic Microbiology**. New York: Wiley-Liss. 1993. p. 265–295.
- ABYZOV, S. S.; LIPENKOV, V. Y.; BOBIN, N. E.; KUDRYASHOV, B. B. Microflora of central Antarctic glacier and methods for sterile ice-core sampling for microbiological analyses. **Biology Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR**, v. 9, p. 304–349, 1982.
- ABYZOV, S. S.; MITSKEVICH, I. N.; POGLAZOVA, M. N. Microflora of the deep glacier horizons of central Antarctica. **Microbiologiya**, v. 67, p. 547–555, 1998.
- ABYZOV, S. S.; MITSKEVICH, I. N.; POGLAZOVA, M. N.; BARKOV, N. I.; LIPENKOV, V. Y.; BOBIN, N. E.; KOUdryashov, B. B.; PASHKEVICH, V. M.; IVANOV, M. V. Microflora in the basal strata at Antarctic ice core above the Vostok lake. **Advances in Space Research**, v. 28, p. 701–706, 2001.
- ABYZOV, S. S.; POGLAZOVA, M. N. MITSKEVICH, I. N.; IVANOV, M. V. Common features of microorganisms in ancient layers of the Antarctic ice sheet. In: CASTELLO, J. D.; ROGERS, S. O. (Eds.). **Life in Ancient Ice**. Princeton: Princeton University Press. 2005. p. 241–250.
- ACINAS, S. G.; SARMA-RUPAVTARM, R.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M. F. PCR-Induced Sequence Artifacts and Bias: Insights from Comparison of Two 16S rRNA Clone Libraries Constructed from the Same Sample. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8966–8969, 2005.
- ALFREIDER, A.; PERNTHALER, J.; AMANN, R.; SATTler, B.; GLOCKNER, F.; WILLE, A.; PSENNER, R. Community Analysis of the Bacterial Assemblages in the Winter Cover and Pelagic Layers of a High Mountain Lake by *In Situ* Hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2138–2144, 1996.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- AISLABIE, J. M.; BROADY, P. A.; SAUL, D. J. Culturable aerobic heterotrophic bacteria from high altitude, high latitude soil of La Gorce Mountains (86°30'S, 147°W), Antarctica. **Antarctic Science**, v. 18, p. 313–321, 2006.
- AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 59, p. 143–169, 1995.
- AMATO, P.; MÉNAGER, M.; SANCELME, M.; LAJ, P.; MAILHOT, G.; DELORT, A-M. Microbial community in cloud water at the Puy de Dôme: implication for the chemistry of clouds. **Atmospheric Environment**, v. 39, p. 4143–4153, 2005.

¹⁵ De acordo com a Agência Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023**: Informação e documentação: Referências: Elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AMPE, F.; OMAR, N.B.; MOIZAN, C.; WACHER, C.; GUYOT, J.-P. Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maize Dough, demonstrates the Need for Cultivation-Independent Methods To Investigate Traditional Fermentations. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5464-5473, 1999.

ANISIMOV, O. A.; VAUGHAN, D. G.; CALLAGHAN, T. V.; FURGAL, C.; MARCHANT, H.; PROWSE, T. D.; VILHJÁLMSSON, H.; WALSH, J. E. Polar regions (Arctic and Antarctic). Climate Change. In: PARRY, M. L.; CANZIANI, O. F.; PALUTIKOF, J. P.; VAN DER LINDEN, P. J.; HANSON, C. E. (Eds.). **Climate Change 2001: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge: Cambridge University Press. 2007. p. 653-685.

ARIGONY-NETO, J.; SIMÕES, J. C.; BREMER, U. F. Implementation of the Admiralty Bay GIS, King George Island (Antarctica). **Pesquisa Antártica Brasileira**, v. 4, p. 187-190, 2004.

BABALOLA, O. O.; KIRBY, B. M.; Le ROES-HILL, M.; COOK, A. E.; CARY, S. C.; BURTON, S. G.; COWAN, D. A. Phylogenetic analysis of actinobacterial populations associated with Antarctic Dry Valley mineral soils. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 566-576, 2008.

BAKERMANS, C. TSAPIN, A. I., SOUZA-EGIPSY, V., GILICHINSKY, D. A., NEALSON, K. H. Reproduction and metabolism at -10 degrees C of bacteria isolated from Siberian permafrost. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 321-326, 2003.

BAKERMANS, C.; AYALA-DEL-RÍO, H. L.; PONDER, M. A.; VISHNIVETSKAYA, T.; GILICHINSKY, D.; THOMASHOW, M. F.; TIEDJE, J. M. *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1285-1291, 2006.

BALKWILL, D. L.; FREDRICKSON, J. K.; ROMINE, M. F. Sphingomonas and Related Genera. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRANDT, E. (Eds.). **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria**. 3. ed. New York: Springer. 2006. 1039 p.

BALKWILL, D. L.; REEVES, R. H.; DRAKE, G. R.; REEVES, J. Y.; CROKER, F. H.; KING, M. B.; BOONE, D. R. Phylogentic characterization of bacteria in the subsurface microbial culture collection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, p. 201-216, 1997.

BALL, B. A.; VIRGINIA, R. A.; BARRETT, J. E.; PARSONS, A. N.; WALL, D. H. Interactions between physical and biotic factors influence CO₂ flux in Antarctic Dry Valley soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, p. 1510-1517, 2009.

BAMFORTH, S. S.; WALL, D. H.; VIRGINIA, R. A. Distribution and diversity of soil protozoa in the McMurdo Dry Valleys of Antarctica. **Journal Polar Biology**, v. 28, p. 756-762, 2005.

BARANIECKI, C. A.; AISLABIE, J.; FOGHT, J. M. Characterization of *Sphingomonas* sp. Ant 17, an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Antarctic soil. **Microbial ecology**, v. 43, p. 44-54. 2002.

BARDGETT, R. D.; WALKER, L. R. Impact of coloniser plant species on the development of decomposer microbial communities following deglaciation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 555-559, 2004.

BARDGETT, R. D.; BOWMAN, W. D.; KAUFMANN, R.; SCHMIDT, S. K. A temporal approach to linking aboveground and belowground ecology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, p. 634-641, 2005.

BARDGETT, R. D.; RICHTER, A.; BOL, R.; GARNETT, M. H.; BÄUMLER, R.; XU, X.; LOPEZ-CAPEL, E.; MANNING, D. A. C.; HOBBS, P. J.; HARTLEY, I. R.; WANEK, W. Heterotrophic microbial communities use ancient carbon following glacial retreat. **Biology Letters**, v. 3, p. 487-490, 2007.

BARTOLI, G.; SARNTHEIN, M.; WEINELT, M.; ERLLENKEUSER, H.; GARBE-SCHÖNBERG, D.; LEA, D. W. Final closure of Panama and the onset of northern hemisphere glaciation. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 237, p. 33-44, 2005.

BASTIDA, R.; LOUREIRO, J.; OUSE, V.; BERNARDELLI, A.; RODRIGUEZ, D.; COSTA, E. Tuberculosis in a wild subantarctic fur Seal from Argentina. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, p. 796-798, 1999.

BATIE, C.; BALLOU, D. P.; CORELL, C. C. Phythalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases, In: MÜLLER, F. (Ed.). **Chemistry and biochemistry of flavoenzymes**. Boca Raton: CRC Press. 1991. v. 3, p. 543-556.

BEKKU, Y. S.; NAKATSUBO, T.; KUME, A.; KOIZUMI, H. Soil microbial biomass, respiration rate, and temperature dependence on a successional glacier foreland in Ny-Alesund, Svalbard. **Arctic, Antarctic, and Alpine Research**, v. 36, p. 395-399, 2004.

BELLICANTA, G. S. **Diversidade de Genes Catabólicos em Amostras de Sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, SP**. 112 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

BENÍTEZ, L. M. **Receding glacier**. Wikimedia. 2005. Disponível em: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Receding_glacier-en.svg. Acesso em: 01 jun. 2010.

BERTHELET, M.; WHYTE, L. G.; GREER, C. W. Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpolypyrrolidone spin columns. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138, p. 17-22, 1996.

BIASI, C.; RUSALIMOVA, O.; MEYER, H.; KAISER, C.; WANEK, W.; BARSUKOV, P.; JUNGER, H.; RICHTER, A. Temperature-dependent shift from labile to recalcitrant carbon sources of arctic heterotrophs. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 19, 1401-1408, 2005.

BIDLE, K. D.; SANGHOON, L.; MARCHANT, D. R.; FALKOWSKI, P. G. Fossil genes and microbes in the oldest ice on Earth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 104, p. 13455-13460, 2007.

BINLADEN, J.; GILBERT, T.; BOLLBACK, J.; PANITZ, F.; BENDIXEN, C.; NIELSEN, R.; WILLERSLEV, E. The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing. **Plos One**, v. 2, p. e197, 2007.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2647–2653, 1997.

BOUCK, A.; VISION, T. The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 907-924, 2007.

BOURGEOIS, J. C. Seasonal and interannual pollen variability in snow layers of arctic ice caps. **Review of Paleobotany and Palynology**, v. 108, p. 17-36, 2000.

BOZAL, N.; MONTES, J.; TUDELA, E.; GUINEA, J. Characterization of several *Psychrobacter* strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. and *Psychrobacter fozii* sp. nov. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1093–1100, 2003.

BRAAK, C. J. F.; ŠMILAUER, P. **CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide**: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Ithaca: Microcomputer Power. 2002. 500 p.

BRAMBILLA, E.; HIPPE, H.; HAGELSTEIN, A.; TINDALL, B. J.; STACKEBRANDT, E. 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. **Extremophiles**, v. 5, p. 23-33, 2001.

BROEKE, M. R. van den. On the role of Antarctica as heat sink for the global atmosphere. **Journal de Physique IV**, v. 121, p. 115-124, 2004.

BRINKMEYER, R.; KNITTEL, K.; JÜRGENS, J.; WEYLAND, H.; AMANN, R.; HELMKE, E. Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6610-6619, 2003.

BROWN, T. J.; CURSONS, R. T. M.; KEYS, E. A. Amoebae from Antarctic soil and water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 491-493, 1982.

BUSSE, H. J.; KAMPFER, P.; MOORE, E. R.; NUUTINEN, J.; TSITKO, I. V.; DENNER, E. B. M.; VAUTERIN, L.; VALENS, M.; ROSSELLO-MORA, R.; SALKINOJA-SALONEN, M. S. *Thermomonas haemolytica* gen. nov., sp. nov., a gamma-proteobacterium from kaolin slurry. **International Journal of Systematics and Bacteriology**, v. 52, p. 473-483, 2002.

CARPENTER, E. J.; LIN, S.; CAPONE, D. G. Bacterial activity in South Pole snow. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4514-4517, 2000.

CASAMATTA, D. A.; JOHANSEN, J. R.; VIS, M. L.; BROADWATER, S. T. Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the oscillatoriales (Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, v. 41, p. 421-438, 2005.

CASE, R. J.; BOUCHER, Y.; DAHLLÖF, I.; HOLMSTRÖM, C.; DOOLITTLE, W. F.; KJELLEBERG, S. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 278-288, 2007.

CASTELLO, J. D.; ROGERS, S. O.; SMITH, J. E.; STARMER, W. T.; ZHAO, Y. Plant and Bacterial Viruses in the Greenland Ice Sheet. In: CASTELLO, J. D.; ROGERS, S. O. (Eds.). **Life in Ancient Ice**. Princeton: Princeton University Press. 2005. p. 197-207.

CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, v. 3, p. 351-368, 1992.

CHEN, M.; XIAO, X.; WANG, P.; ZENG, X.; FENGPING WANG. *Arthrobacter ardleyensis* sp. nov., isolated from Antarctic lake sediment and deep-sea sediment. **Archives of Microbiology**, v. 183, p. 301-305, 2005.

CHENEY, 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.

CHRISTNER, B. C.; MOSLEY-THOMPSON, E.; THOMPSON, L. G.; ZAGORODNOV, V.; SANDMAN, K.; REEVE, J. N. Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice. **Icarus**, v. 144, p. 479-485, 2000.

CHRISTNER, B. C.; MOSLEY-THOMPSON, E.; THOMPSON, L. G.; REEVE, J. N. Isolation of bacteria and 16S rDNAs from the Lake Vostok accretion ice. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 570-577, 2001.

CHRISTNER, B. C. **Detection, recovery, isolation and characterization of bacteria in glacial ice and lake Vostok**. 194 f. PhD Thesis, The Ohio State University, USA, 2002.

CHRISTNER, B. C.; MOSLEY-THOMPSON, E.; THOMPSON, L. G.; REEVE, J. N. Classification of Bacteria from Polar and Nonpolar Glacial Ice. In: CASTELLO, J. D.; ROGERS, S. O. (Eds.). **Life in Ancient Ice**. Princeton: Princeton University Press. 2005. p. 227-239.

CLARKE, A. Evolution, adaptation and diversity: global ecology in an Antarctic context. In: HUISKES, A. H. L.; GIESKES, W. W. C.; ROZEMA, J.; SCHORNO, R. M. L.; VAN DER VIES, S. M.; WOLFF, W. J. (Ed.). **Antarctic Biology in a Global Context**, Leiden: Backhuys Publishers. 2003. p. 3-17.

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

COOK, A. J.; FOX, A. J.; VAUGHAN, D. G.; FERRIGNO, J. G. Retreating glacier fronts on the Antarctic Peninsula over the past half-century. **Science**, v. 308, p. 541–544, 2005.

COTTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5116–5122, 2000.

COWAN, D. A.; TOW, L. A. Endangered Antarctic Environments. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 58, p. 649–690, 2004.

CUATRECASAS, J. Paramo vegetation and its life forms: geocology of the mountainous regions of the tropical Americas. **Geocology of Mountainous Regions of Tropical America** v. 9, p. 163–186, 1968.

CUNLIFFE, M.; KERTESZ, M. A. Autecological properties of soil sphingomonads involved in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 1083–1089, 2006.

DECONTO, R. M.; POLLARD, D. Rapid Cenozoic glaciation of Antarctica induced by declining atmospheric CO₂. **Nature**, v. 421, p. 245–249, 2003.

DIXON, W. J. Analysis of extreme values. **The Annals of Mathematical Statistics**, v. 21, p. 448–506. 1950.

DUC, L.; NOLL, M.; MEIER, B. E.; BURGMANN, H.; ZEYER, J. High diversity of diazotrophs in the forefield of a receding alpine glacier. **Microbial Ecology**, v. 57, p. 179–190, 2009.

DUNNETT, C. W. A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. **Journal of the American Statistical Association**, v. 50, p. 1096–1121, 1955.

DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRANDT, E. (Eds.) **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria**. 3. ed., vol. 3,. Springer Science, New York, EUA, 2006. 1143 p.

DYSZYNSKI, G.; SHELDON, W. M. **RDPquery**: A Java program from the Sapelo Program Microbial Observatory for automatic classification of bacterial 16S rRNA sequences based on Ribosomal Database Project taxonomy and Smith-Waterman alignment. Versão 2.7. 2006. Disponível em: http://simo.marisci.uga.edu/public_db/rdp_query.htm. Acesso em: 01 de jun. de 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA. **Electropherogram quality analysis**. Disponível em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. Acesso em: 01 de jun. de 2010.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175–185, 1998.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP** (Phylogeny Inference Package). Versão 3.5c. Seattle: University of Washington, Department of Genetics, 1993. 51 p.

FELSKE, A.; ENGELN, B.; NÜBEL, U.; BACKHAUS, H. Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4162-4167, 1996.

FERNANDEZ-VALIDENTE, E.; QUESADA, A.; HOWARD-WILLIAMS, C.; HAWES, I. N₂-Fixation in Cyanobacterial Mats from Ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. **Microbial Ecology**, v. 42, p. 338-349, 2001.

FIGORE, M. F.; RIGONATO, J.; GENUÁRIO, D. B.; ALVARENGA, D. O. Cianobactérias Antárticas. In: Ministério da Ciência e Tecnologia. (Org.). **Ciência Brasileira no IV Ano Polar Internacional**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia. 2009. p. 46-47.

FREDRICKSON, J. K.; BALKWILL, D. L.; DRAKE, G. R.; ROMINE, M. F.; RINGELBERG, D. B.; WHITE, D. C. Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1917-1922, 1995.

FRONTIER, S. Diversity and structure in aquatic ecosystems. **Oceanography and Marine Biology: an Annual Review**, v. 23, p. 253-312, 1985.

FUZZI, G.; MANDRIOLI, P.; PERFETTO, A. Fog droplets – an atmospheric source of secondary biological aerosol particles. **Atmospheric Environment**, v. 31, p. 287-290, 1997.

GIBBARD, P.; VAN KOLFSCHOTEN, T. The Pleistocene and Holocene Epochs. In: GRADSTEIN, F. M.; OGG, J. G.; SMITH, A. G. (Ed.). **A Geologic Time Scale**, Cambridge: Cambridge University Press. 2004. 589 p.

GIBSON, D. T.; PARALES, R. E. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 236-243, 2000.

GILICHINSKY, D. Permafrost model of extraterrestrial habitat. In: HORNECK, G.; BAUMSTARK-KHAN, C. **Astrobiology: The Quest for the Conditions of Life**. New York: Springer. 2002. p. 125-142.

GILICHINSKY, D.; VOROBYOVA, E. A.; EROKHINA, L. G.; FEDOROV-DAVYDOV, D. G.; CHAIKOVSKAYA, N. R. Long-term preservation of microbial ecosystems in permafrost. **Advances in Space Research**, v. 12, p. 255-263, 1992.

GILICHINSKY, D.A.; WILSON, G. S.; FRIEDMANN, E. I.; MCKAY, C. P.; SLETTEN, R. S.; RIVKINA, E. M.; VISHNIVETSKAYA, T. A.; EROKHINA, L. G.; IVANUSHKINA, N. E.; KOCHKINA, G. A.; SHCHERBAKOVA, V. A.; SOINA, V. S.; SPIRINA, E. V.; VOROBYOVA, E. A.; FYODOROV-DAVYDOV, D. G.; HALLET, B.; OZERSKAYA S. M.; SOROKOVIKOV, V. A.; LAURINAVICHYUS, K. S.; SHATILOVICH, A. V.; CHANTON, J. P.; OSTROUMOV, V. E.; TIEDJE, J. M. Microbial populations in Antarctic permafrost: biodiversity, state, age, and implication for astrobiology. **Astrobiology**, v. 7, p. 275-311, 2007.

GIORGIO, C. D.; KREMPFF, A.; GUIRAUD, H.; BINDER, P.; TIRET, C.; DUMENIL G. Atmospheric pollution by airborne microorganisms in the city of Marseilles. **Atmospheric Environment**, v. 30, p. 155-160, 1996.

GONZALES-TORIL, E.; AMILS, R.; DELMAS, R. J.; PETIT, J.-R.; KOMAREK, J.; ELSTER, J. Diversity of bacteria producing pigmented colonies in aerosol, snow and soil samples from remote glacial áreas (Antarctica, Alps and Andes). **Biogeosciences Discussions**, v. 5, p. 1607–1630, 2008.

GREGORICH, E. G.; HOPKINS, D. W.; ELBERLING, B.; SPARROW, A. D.; NOVIS, P.; GREENFIELD, L. G.; ROCHETTE, P. Emission of CO₂, CH₄ and N₂O from lakeshore soils in na Antarctic dry valley. **Soil Biology e Biochemistry**, v. 38, p. 3120-3129, 2006.

GUPTA, R. K. Morpho-taxonomical survey of diatoms in Schirmacher Oasis, East Antarctica. Eighteenth Indian Expedition to Antarctica. **Scientific report, the Department of Ocean Development**, n. 16, p. 213-226, 2002.

GUPTA, P.; REDDY, G. S. N.; DELILLE, D.; SHIVAJI, S. *Arthrobacter gangotriensis* sp. nov. and *Arthrobacter kerguelensis* sp. nov. from Antarctica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2375-2378, 2004.

HAEBERLI, W.; BENISTON, M. Climate change and its impacts on glaciers and permafrost in the Alps. **Ambio**, v. 27, p. 258-265, 1998.

HALL, N. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 1518-1525, 2007.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HANSEN, J.; RUEDY, R.; GLASCOE, J.; SATO, M.. GISS analysis of surface temperature change. **Journal of Geophysics Research**, v. 104, p. 30997-31022, 1999:

HARAYAMA, S.; KOK, M. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 46, p. 565-601, 1992.

HEDBERG, I.; HEDBERG, O. Tropical-alpine life-forms of vascular plants. **Oikos**, v. 33, p. 297–307, 1979.

HODKINSON, I. D.; WEBB, N. R.; COULSON, S. J. Primary community assembly on land – the missing stages: why are the heterotrophic organisms always there first?. **Journal of Ecology**, v. 90, p. 569-577, 2002.

HODKINSON, I. D.; COULSON, S. J.; WEBB, N. R. Community assembly along proglacial chronosequences in the high Arctic: vegetation and soil development in north-west Svalbard. **Journal of Ecology**, v. 91, p. 651–663, 2003.

HUBER, T.; FAULKNER, G.; HUGENHOLTZ, P. Bellerophon; a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. **Bioinformatics**, v. 20, p. 2317-2319, 2004.

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**, v. 417, p. 63-67, 2002.

HUGHES, K. A.; MCCARTNEY, H. A.; LACHLAN-COPE, T. A.; PEARCE, D. A. A preliminary study of airborne microbial biodiversity over peninsular Antarctica. **Cellular and Molecular Biology**, v. 50, p. 537-542, 2004.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 4765-4774, 1998. (Erratum: v. 180, p. 6793)

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

HUI, L.; YING, Z.; DONG-SHENG, L.; HUI, X.; GUAN-XIONG, C.; CHENG-GANG, Z. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for fingerprinting of microbial communities in paddy soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 954-968, 2009.

HUSE, S.; HUBER, J.; MORRISON, H.; SOGIN, M.; WELCH, D. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. **Genome Biology**, v. 8, p. R143, 2007.

HUSE, S. M.; DETHLEFSEN, L.; HUBER, J. A.; WELCH, D. M.; RELMAN, D. A.; SOGIN, M. L. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. **Plos Genetics**, v. 4, p. e1000255 (1-10), 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. Projeto de Meteorologia Antártica. 2008. Disponível em: <http://antartica.cptec.inpe.br/~rantar/data/resumos/climatolbaia.xls>. Acesso em: 01 jun. 2010.

JOHNSON, S., HEBSGAARD, M., CHRISTENSEN, T., MASTEPANOV, M., NIELSEN, R., MUNCH, K., BRAND, T., GILBERT, M., ZUBER, M., BUNCE, M., RONN, R., GILICHINSKY, D., FROESE, D., WILLERSLEV, E. Ancient bacteria show evidence of DNA repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 104, p. 14401-14405, 2007.

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.

JONES, D.; KEDDIE, R. M. The Genus *Arthrobacter*. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.; Stackebrandt, E. (Ed.). **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria**, 3. ed, v. 3. New York: Springer. 2006. p. 945-960.

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

JUNGE, K.; EICKEN, H.; DEMING, J. W. Bacterial activity at -2 to -20 °C in Arctic wintertime sea ice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 550-557, 2004a.

JUNGE, K.; DEMING, J. W.; EICKEN, H. A microscopic approach to investigate bacteria under *in situ* conditions in Arctic lake ice: initial comparisons to sea ice. In: BIOASTRONOMY 2002: LIFE AMONG THE STARS. **Abstracts of the International Astronomy Union Symposium**. Australia: Astronomical Society of the Pacific. 2004b. v. 213. p. 381-388.

KAMPFER, P.; RAINEY, F. A.; ANDERSSON, M.A.; NURMIAHO LASSILA, L. E.; ULRYCH, U.; BUSSE, HJ.; WEISS, N.; MIKKOLA, R.; SALKINOJA-SALONEN, M. *Frigoribacterium faeni* gen. nov., sp. nov., a novel psychrophilic genus of the family Microbacteriaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, 355-363, 2000.

KAPPEN, L.; STRAKA, H. Pollen and spores transpor into the Antarctic. **Polar Biology**, v. 8, p. 173-180, 1988.

KASTOVSKA, K.; ELSTER, J.; STIBAL, M.; SANTRUCKOVA, H. Microbial assemblages in soil microbial succession after glacial retreat in Svalbard (high Arctic). **Microbial Ecology**, v. 50, p. 396–407, 2005.

KATAYAMA, T.; KATO, T.; TANAKA, M.; DOUGLAS, T. A.; BROUCHKOV, A.; FUKUDA, M.; TOMITA, F.; ASANO, K. *Glaciibacter superstes* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Microbacteriaceae isolated from a permafrost ice wedge. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.59, p. 482-486, 2009.

KELLERMANN,C.; GRIEBLER, C. *Thiobacillus thiophilus* sp. nov., a chemolithoautotrophic, thiosulfate-oxidizing bacterium isolated from contaminated aquifer sediments. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 583-588, 2009.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KING, J. C.; TURNER, J.; MARSHALL, G. J.; CONNOLLEY, W. M.; LACHLAN-COPE, T. A. Antarctic Peninsula climate variability and its causes as revealed by analysis of instrumental records. In: DOMACK E, LEVENTER A, BURNETT A, BINDSCHADLER R, CONVEY P, KIRBY M. (Ed.). **Antarctic Peninsula climate variability: historical and paleoenvironmental perspectives**. Washington: American Geophysical Union. 2003. v. 79, p. 17–30.

KOHSHIMA, S.; TAKEUCHI, N.; UETAKE, J.; SHIRAIWA, T.; UEMURA, R.; YOSHIDA, N.; MATOBA, S.; GODOI, M. A. Estimation of net accumulation rate at a Patagonian glacier by ice core analyses using snow algae. **Global and Planetary Change**, v. 59, p. 236-244, 2007.

KUHN, E.; BELLICANTA, G. S.; PELLIZARI, V. H. New *alk* genes detected in Antarctic marine sediments. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 669-673, 2009.

LA DUC, M. T.; DEKAS, A.; OSMAN, S.; MOISSE, C.; NEWCOMBE, D.; VENKATESWARAN, K. Isolation and Characterization of Bacteria Capable of Tolerating

the Extreme Conditions of Clean Room Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2600-2611, 2007.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.) **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: Wiley. 1991. p. 115–175.

LAWLEY, B.; RIPLEY, S.; BRIDGE, P.; CONVEY, P. Molecular analysis of geographic patterns of Eucaryotic diversity in Antarctic soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5963-5972, 2004.

LI, Y.; KAWAMURA, Y.; FUJIWARA, N.; NAKA, T.; LIU, H.; HUANG, X.; KOBAYASHI, K.; EZAKI, T. *Sphingomonas yabuuchiae* sp. nov. and *Brevundimonas nasdae* sp. nov., isolated from the Russian space laboratory Mir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 819-825, 2004.

LIGHTHART, B.; SHAFFER, B. T. Airborne bacteria in the atmospheric surface layer: temporal distribution above a grass seed field. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1492-1496, 1995.

LIU, W.; MARSH, T.; CHENG, H.; FORNEY, L. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4516-4522, 1997.

LIU, Y.; YAO, T.; JIAO, N.; KANG, S.; XU, B.; ZENG, Y.; HUANG, S.; LIU, X. Bacterial diversity in the snow over Tibetan Plateau Glaciers. **Extremophiles**, v. 13, p. 411-423, 2009.

LIZARDI, P. M.; HUANG, X.; ZHU, Z.; BRAY-WARD, P.; THOMAS, D. C.; WARD, D. C. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. **Nature Genetics**, v. 19, p. 225-232, 1998.

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

LUZ, A. P.; PELLIZARI, V. H.; WHYTE, L. G.; GREER, C. W. A survey of indigenous microbial hydrocarbon degradation genes in soils from Antarctica and Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 323-333, 2004.

LUZ, A. P.; CIAPINA, E. M. P.; GAMBA, R. C.; LAURETTO, M. S.; FARIAS, E. W. C.; BICEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; MONTONE, R. C.; PELLIZARI, V. H. Potencial for biorremediation of hydrocarbon polluted soils in maritime Antarctic. **Antarctic Science**, v. 18, p. 335-343, 2006.

MA, L.; CATRANIS, C. M.; STARMER, W. T.; ROGERS, S. O. The significance and implications of the discovery of filamentous fungi in glacial ice. In: CASTELLO, J. D.;

ROGERS, S. O. (Eds.) **Life in Ancient Ice**. Princeton: Princeton University Press. 2005. p. 159-180.

MADER, H.; PETTITT, M. E.; WADHAM, J. L.; WOLFF, E.; PARKES, R. J. Subsurface ice as a microbial habitat. **Geology**, v. 34, p. 169–172, 2006.

MAGURRAN, A. E. **Measuring Biological Diversity**. Malden: Blackwell Publishing, Malden, 2004. 256 p.

MARGESIN, R. (Ed.) **Permafrost Soils**, Berlin: Springer-Verlag. 2009. 348 p.

MARSHALL, W. A. Biological particles over Antarctica. **Nature**, v. 383, p. 680, 1996.

MARSHALL, W. A.; CHALMERS, M. O. Airborne dispersal of Antarctic algae and cyanobacteria. **Ecography**, v. 20, p. 585-594, 1997.

MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L.; HALLET, S.; CHAUSSOD, R.; GERMON, J. C.; SOULAS, G.; CATROUX, G. DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2354-2359, 2001.

MARTÍNEZ-MURCIA, A.; ACINAS, S.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Evaluation of prokaryotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 17, p. 247-255, 1995.

MAYEWSKI, P. A.; FREZZOTTI, M.; BERTLER, N.; VAN OMMEN, T.; HAMILTON, G.; JACKA, T. H.; WELCH, B.; FREY, M.; QIN, D.; JIAWEN, R.; SIMÕES, J.; FILY, M.; OERTER, H.; NISHIO, F.; ISAKSSON, E.; MULVANEY, R.; HOLMUND, P.; LIPENKOV, V.; GOODWIN, I. The International Trans-Antarctic Scientific Expedition (ITASE): an overview. **Annals of Glaciology**, Cambridge, v. 41, p. 180-185, 2005.

MCDOWELL, A.; PERRY, A. L.; LAMBERT, P. A.; PATRICK, S. A new phylogenetic group of *Propionibacterium acnes*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 218-224, 2008.

MITEVA, V. I.; SHERIDAN, P. P.; BRENCHELEY, J. E. Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 202-213, 2004.

MOSIER, A. C.; MURRAY, A. E.; FRITSEN, C. H. Microbiota within the perennial ice cover of Lake Vida, Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, p. 274-288, 2007.

MURRAY, A. E.; WU, K. Y.; MOYER, C. L.; KARL, D. M.; DELONG, E. F. Evidence for circumpolar distribution of planktonic Archaea in the Southern Ocean. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 18, p. 263-273, 1999.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient 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.

MYERS, R. M.; FISCHER, S. G.; MANIATIS, T.; LERMAN, L. S. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v. 13, p. 3111-3130, 1985a.

MYERS, 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, 1985b.

NAM, J. W.; NOJIRI, H.; YOSHIDA, T.; HABE, H.; YAMANE, H.; OMORI, T. New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, p. 254-263, 2001.

NEMERGUT, D. R.; ANDERSON, S. P.; CLEVELAND, C. C.; MARTIN, A. P.; MILLER, A. E.; SEIMON, A.; SCHMIDT, S. K. Microbial community succession in an unvegetated, recently deglaciated soil. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 110-122, 2007.

NEIDLE, E. L.; HARTNETT, C.; ORNSTON, N. L.; BAIROCH, A.; REKIK, M.; HARAYAMA, S. Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus* benABC genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multicomponent oxygenases. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 5385-5395, 1991.

NELLEN, J. **Diversity and resistance of microorganisms in a European spacecraft testing clean room**. 116 f. PhD Thesis, University of Duisburg-Essen, Duisburg, Alemanha, 2007.

OERLEMANS, J. Extracting a climate signal from 169 glacier records. **Science**, v. 308, p. 675-677, 2005.

OHTONEN, R.; FRITZE, H.; PENNANEN, T.; JUMPPONEN, A.; TRAPPE, J. Ecosystem properties and microbial community changes in primary succession on a glacier forefront. **Oecologia**, v. 119, p. 239-246, 1999.

OLIVEIRA, E. C.; ABSHER, T. M.; Pellizzari, F. M.; Oliveira, M. C. The seaweed flora of Admiralty Bay, King George Island, Antarctic. **Polar Biology**, v. 32, p. 1639-1647, 2009.

PANIKOV, N. S., SIZOVA, M. V. Growth kinetics of microorganisms isolated from Alaskan soil and permafrost in solid media frozen down to -35 degrees C. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, p. 500-12, 2007.

PARALES, J. V.; PARALES, R. E.; RESNICK, S. M.; GIBSON, D. T. Enzyme specificity of 2-nitrotoluene 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain JS42 is determined by the C-terminal region of the alpha subunit of the oxygenase component. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 1194-1199, 1998.

PARAMESWARAN, P.; JALILI, R.; TAO, L.; SHOKRALLA, S.; GHARIZADEH, B.; RONAGHI, M.; FIRE, A. Z.. A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils

opportunities for large-scale sample multiplexing. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. e130, 2007.

PARSONS, A. N.; BARRETT, J. E.; WALL, D. H.; VIRGINIA, R. A. Soil Carbon Dioxide Flux in Antarctic Dry Valley Ecosystems. **Ecosystems**, v. 7, p. 286-295, 2004.

PEARCE, D. A. Bacterioplankton community structure in a maritime antarctic oligotrophic lake during a period of holomixis, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Microbial Ecology**, v. 46, p. 92-105, 2003.

PETIT, J. R.; JOUZEL, J.; RAYNAUD, D.; BARKOV, N. I.; BARNOLA, J. M.; BASILE, I., et al. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. **Nature**, v. 399, p. 429-436, 1999.

PIELOU, E. C. **The interpretation of ecological data**. 1 ed. New York: Wiley InterScience, 1984. 288 p.

POGLAZOVA, M. N.; MITSKEVICH, I. N.; ABYZOV, S. S.; IVANOV, M. V. Microbiological Characterization of the Accreted Ice of Subglacial Lake Vostok, Antarctica. **Microbiology**, v. 70, p. 723-730, 2001.

PRICE, B. P. A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97, p. 1247-1251, 2000.

PRICE, B. P. Life in solid ice? In: WORKSHOP ON LIFE IN ANCIENT ICE. **Life in Ancient Ice Workshop (Resumo)**. Gleneden Beach, Oregon. 2001

PRISCU, J. C.; ADAMS, E. E.; LYONS, W. B.; VOYTEK, M. A.; MOGK, D. W.; BROWN, R. L.; MCKAY, C. P.; TAKACS, C. D.; WELCH, K. A.; WOLF, C. F.; KIRSCHTEIN, J. D.; AVCI, R. Geomicrobiology of subglacial ice above Lake Vostok, Antarctica. **Science**, v. 286, p. 2141-2144, 1999.

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

PUDELKO, R. **Site of Special Scientific Interest No. 8 (SSSI-8), King George Island**. IUNG, Pulawy, Poland, 2002.

PUDELKO, R. **Western shore of Admiralty Bay, King George Island**: orthophoto map. Department of Antarctic Biology, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland, 2007.

RATAJCZAK, A.; GEIßDOERFER, W.; HILLEN, W. Alkane Hydroxylase from *Acinetobacter* sp. Strain ADP1 Is Encoded by *alkM* and Belongs to a New Family of Bacterial Integral-Membrane Hydrocarbon Hydroxylases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 1175-1179, 1998.

RAUTENBERGER, R.; BISCHOF, K. Impact of temperature on UV-susceptibility of two *Ulva* (Chlorophyta) species from Antarctic and Subantarctic regions. **Polar Biology**, v. 29, p. 988-996, 2006.

REDDY, G. S. N.; PRAKASH, J. S. S.; SRINIVAS, R.; MATSUMOTO, G. I.; SHIVAJI, S. *Leifsonia rubra* sp. nov. and *Leifsonia aurea* sp. nov., psychrophiles from a pond in Antarctica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 997-984, 2003.

RHEIMS, H.; RAINEY, F. A.; STACKEBRANDT, E. A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 159–169, 1996.

RIBOSOMAL DATABASE PROJECT. **SeqMatch**. Disponível em: <http://rdp.cme.msu.edu>. Acesso em 01 de jun. de 2010.

RIBOSOMAL DATABASE PROJECT. **Classifier**. Disponível em: <http://rdp.cme.msu.edu>. Acesso em 01 de jun. de 2010.

RIVKINA, E.; FRIEDMANN, E.; MCKAY, C.; GILICHINSKY, D. Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3230-3233, 2000.

RIVKINA, E.; LAURINAVICHIOUS, K.; MCGRATH, J.; TIEDJE, J.; SHCHERBAKOVA, V.; GILICHINSKY, D. Microbial life in permafrost. **Advances in Space Research**, v. 33, p. 1215-1221, 2004.

RIVKINA, E.; LAURINAVICHIOUS, K.; GILICHINSKY, D. Microbial life below freezing point within permafrost. In: CASTELLO, J. D.; ROGERS, S. O. (Ed.). **Life in Ancient Ice**. Princeton: Princeton University Press. 2005. p. 5-21.

ROCHA-CAMPOS, A. C.; SANTOS, P. Ação Geológica do gelo. In: TEIXEIRA, W.; TOLEDO, M. C. M.; FARCHILD, T. R.; TAIOLI, F. (Ed.). **Decifrando a Terra**. São Paulo: Oficina de Textos. 2000. 624 p.

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.; TRIPLET, E. W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, v. 1, p. 283-290, 2007.

RONHAGUI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome Research**, v. 11, p. 3-11, 2001.

ROGERS, S. O.; THERAISNATHAN, V.; MA, L. J.; ZHAO, Y.; ZHANG, G.; SHIN, G.; CASTELLO, J. D.; STARMER, W. T. Comparisons of Protocols for Decontamination of Environmental Ice Samples for Biological and Molecular Examinations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 2540-2544, 2004.

ROGERS, S. O.; MA, L.; ZHAO, Y.; THERAISNATHAN, V.; SHIN, S.; ZHANG, G.; CATRANIS, C. M.; STARMER, W. T.; CASTELLO, J. D. Recommendations for elimination

of contaminants and authentication of isolates in ancient ice cores. In: CASTELLO, J. D.; ROGERS, S. O. (Ed.). **Life in Ancient Ice**. Princeton: Princeton University Press. 2005. p. 5-21.

ROSSI, F.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F. Genus- and Species-Specific PCR-Based Detection of Dairy Propionibacteria in Environmental Samples by Using Primers Targeted to the Genes Encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4241-4244, 1999.

SAKAMOTO, I. K. **Comparação da Estrutura de Comunidades Microbianas Presente em Sistemas de Lodos ativados modificados para remoção biológica do fósforo em excesso, utilizando a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)**. 159 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3 ed., v. 1, Cap. 1, p. 116-118. New York, 2001.

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

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. G. Rapid Silver Staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 17, p. 914 – 920, 1994.

SANGWAN, P.; KOVAC, S.; DAVIS, K. E.; SAIT, M.; JANSSEN, P. H. Detection and cultivation of soil verrucomicrobia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 12, p. 8402-8410, 2005.

SAPELO ISLAND MICROBIAL OBSERVATORY. **RPDQuery**. Disponível em: http://simo.marsci.uga.edu/public_db/rdp_query.htm. Acesso em 01 de jun. de 2010.

SAUL, D. J.; AISLABIE, J. M.; BROWN, C. E.; HARRIS, L.; FOGHT, J. M. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 141–155, 2005.

SCHLICHTING, H. M.; SPEZIALE, B. J.; ZINK, R. M. Dispersal of algae and protozoa by Antarctic flying birds. **Antarctic Journal**, v. 13, p. 147-149, 1978.

SCHLOSS, P. D. Evaluating different approaches that test whether microbial communities have the same structure. **The ISME Journal**, v. 2, p. 265-275, 2008.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: Open source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

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.

SCHULZ, S.; PERÉZ-DE-MORA, A.; ENGEL, M.; MUNCH, J. C.; SCHLOTTER, M. A comparative study of most probable number (MPN)-PCR vs. real-time-PCR for the measurement of abundance and assessment of diversity of *alkB* homologous genes in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, p. 295-298, 2010.

SCHMIDT, S. K.; REED, S. C.; NEMERGUT, D. R.; GRANDY, A. S.; CLEVELAND, C. C.; WEINTRAUB, M. N.; HILL, A. W.; COSTELLO, E. K.; MEYER, A. F.; NEFF, J. C.; MARTIN, A. M. The earliest stages of ecosystem succession in high-elevation (5000 metres above sea level), recently deglaciated soils. **Proceedings of the Royal Society**, v. 275, p. 2793-2802, 2008.

SEABURG, K. G.; PARKER, B. C.; WHARTON JR, R. A.; SIMMONS JR., G. M. Temperature-growth responses of algal isolates from antarctic oases. **Journal of Phycology**, v. 17, p. 353–360, 1981.

SHRAVAGE, B. V.; DAYANANDA, K. M.; PATOLE, M. S.; SHOUCHE, Y. S. Molecular microbial diversity of a soil sample and detection of ammonia oxidizers from Cape Evans, Mcmurdo Dry Valley, Antarctica. **Microbiology Research**, v. 162, p. 15–25, 2007.

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.

SHERIDAN, P. P.; MITEVA, V. I.; BRENCHELEY, J. E. Phylogenetic analysis of anaerobic psychrophilic enrichment cultures obtained from a greenland glacier ice core. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2153-2160, 2003.

SHI, T.; REEVES, R. H.; GILICHINSKY, D. A.; FRIEDMANN, E. I. Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. **Microbial Ecology**, v. 33, p.169-79, 1997.

SHIVAJI, S.; SHYAMALA RAO N.; SAISREE, L.; REDDY, G. S. N.; SESHU KUMAR, G.; BHARGAVA, P. M. Isolates of Arthrobacter from the soils of Schirmacher Oasis, Antarctica. **Polar Biology**, v. 10, p. 225-229, 1989.

SIGLER, W. V.; ZEYER, J. Colony-forming analysis of bacterial community succession in deglaciated soils indicates pioneer stress-tolerant opportunists. **Microbial Ecology**, v. 48, p. 316-323, 2004.

SIMAS, F. N. B. **Solos da Baía do Almirantado, Antártica Marítima: mineralogia, gênese, classificação e biogeoquímica**. 153 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2006.

SIMÕES, J. C.; ARIGONY-NETO, J.; BREMER, U. F. O uso de mapas antárticos em publicações. **Pesquisa Antártica Brasileira**, v. 4, p. 191-197, 2004.

SKIDMORE, M. L.; FOGHT, J. M.; SHARP, M. J. Microbial life beneath a high Arctic glacier. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3214-3220, 2000.

SKIDMORE, M.; ANDERSON, S. P.; SHARP, M.; FOGHT, J.; LANOIL, B. D. Comparison of Microbial Community Compositions of Two Subglacial Environments Reveals a Possible Role for Microbes in Chemical Weathering Processes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 6986-6997, 2005.

SMITH, H. G. The protozoa of Signy Island fellfields. **British Antarctic Survey Bulletin**, v. 64, p. 55-61, 1984.

SMITH, H. D.; MCKAY, C. P. Drilling in ancient permafrost on Mars for evidence of a second genesis of life. **Planetary and Space Science**, v. 53, p. 1302-1308, 2005.

SMITH, J. J.; TOW, L. A.; STAFFORD, W.; CARY, C.; COWAN, D. A. Bacterial diversity in three different Antarctic cold desert mineral soils. **Microbial Ecology**, v. 51, p. 413-421, 2006.

STACKEBRANDT, E; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 846-849, 1994.

STALEY, J. T.; GOSINK, J. J. Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 53, p. 189-215, 1999.

STALEY, J. T.; KONOPKA, A. Measurements of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 39, p. 321-346, 1985.

STIBAL, M.; SABACKA, M.; KASTOVSKA, K. Microbial Communities on Glacier Surfaces in Svalbard: Impact of Physical and Chemical Properties on Abundance and Structure of Cyanobacteria and Algae. **Microbial Ecology**, v. 52, p. 644-654, 2006.

SOGIN, M. L.; MORRISON, H. G.; HUBER, J. A.; WELCH, D. M.; HUSE, S. M.; NEAL, P. R.; ARRIETA, J. M.; HERNDL, G. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 12115-12120, 2006.

SUZUKI, K.; SASAKI, J.; URAMOTO, M.; NAKASE, T.; KOMAGATA, K. *Cryobacterium psychrophilum* gen. nov., sp. nov., nom. rev., comb. nov., an Obligately Psychrophilic Actinomycete To Accommodate "*Curtobacterium psychrophilum*" Inoue and Komagata 1976. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, p. 474-478, 1997.

SWAN, L. W. The Aeolian Biome. **BioScience**, v. 42, p. 262-270, 1992.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TATON, A.; GRUBISIC, S.; BRAMBILLA, E.; DE WIT, R.; WILMOTTE, A. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5157-5169, 2003.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 782-787, 1990.

TSCHERKO, D., RUSTEMEIER, J., RICHTER, A., WANEK, W.; KANDELER, E. Functional diversity of the soil microflora in primary succession across two glacier forelands. **European Journal of Soil Sciences**, v. 54, p. 685-696, 2003.

VAUGHAN, D.G. Recent trends in melting conditions on the Antarctic Peninsula and their implications for ice-sheet mass balance and sea level. **Arctic Alpine Research**, v. 38, p.147-152, 2006.

VAUGHAN, D. G.; DOAKE, C. S. M. Recent atmospheric warming and retreat of ice shelves on the Antarctic Peninsula. **Nature**, v. 379, p. 328-331, 1996.

VAUGHAN, D. G.; GARETH J. MARSHALL, G. J.; CONNOLLEY, W. M.; PARKINSON, C.; MULVANEY, R.; HODGSON, D. A.; KING, J. C.; PUDSEY, C. J.; TURNER, J. Recent Rapid Regional Climate Warming on the Antarctic Peninsula. **Climatic Change**, v. 60, p. 243-274, 2003.

VINCENT, W. F. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. **Antarctic Science**, v. 12, p. 374-385, 2000.

VISHNIVETSKAYA, T., KATHARIOU, S., MCGRATH, J., GILICHINSKY, D., TIEDJE, J. Low-temperature recovery strategies for the isolation of bacteria from ancient permafrost sediments. **Extremophiles**, v. 3, p. 165-173, 2000.

VISHNIVETSKAYA, T. A. Viable Cyanobacteria and Green Algae from the Permafrost Darkness. In: MARGESIN, R. (Ed.) **Permafrost Soils**: Berlin: Springer-Verlag. 2009. 348 p.

VOROBYOVA, E. A.; SOINA, V. S.; MULUKIN, A. L. Microorganisms and enzyme activity in permafrost after removal of long-term cold stress. **Advances in Space Research**, v. 18, p. 103-108, 1996.

VOROBYOVA, E.; SOINA, V.; GORLENKO, M.; MINKOVSKAYA, N.; ZALINOVA, N.; MAMUKELASHVILI, A.; GILICHINSKY, D.; RIVKINA, E.; VISHNIVETSKAYA, T. The deep cold biosphere: facts and hypothesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, p. 277-290, 1997.

WACKETT, L.P. Evolution of enzymes for the metabolism of new chemical inputs into the environment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 41259-41262, 2004.

WALKER, L. R.; DEL MORAL, R. **Primary succession and ecosystem rehabilitation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003, 456 p.

WALTER, K. M.; ZIMOV, S. A.; CHANTON, J. P.; VERBYLA, D.; CHAPIN III, F. S. Methane bubbling from Siberian thaw lakes as a positive feedback to climate warming. **Nature**, v. 443, p. 71-75, 2006.

WANG, F.; GAI, Y.; CHEN, M.; XIAO, X. *Arthrobacter psychrochitiniphilus* sp. nov., a psychrotrophic bacterium isolated from Antarctica. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2759-2762, 2009.

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

WARD, N. L.; CHALLACOMBE, J. F.; JANSSEN, P. H.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; WU, M.; XIE, G.; HAFT, D. H.; SAIT, M.; BADGER, J.; BARABOTE, R. D.; BRADLEY, B.; BRETTIN, T. S.; BRINKAC, L. M.; BRUCE, D.; CREASY, T.; DAUGHERTY, S. C.; DAVIDSEN, T. M.; DEBOY, R. T.; DETTER, J. C.; DODSON, R. J.; DURKIN, A. S.; GANAPATHY, A.; GWINN-GIGLIO, M.; HAN, C. S.; KHOURI, H.; KISS, H.; KOTHARI, S. P.; MADUPU, R.; NELSON, K. E.; NELSON, W. C.; PAULSEN, I.; PENN, K.; REN, Q.; ROSOVITZ, M. J.; SELENGUT, J. D.; SHRIVASTAVA, S.; SULLIVAN, S. A.; TAPIA, R.; THOMPSON, L. S.; WATKINS, K. L.; YANG, Q.; YU, C.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; KUSKE, C. R. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 2046-2056, 2009.

WERLEN, C.; KOHLER, H. P.; VAN DER MEER, J. R. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and cis-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271: p. 4009-4016, 1996.

WHYTE, L. G.; SCHULTZ, A.; VAN BEILEN, J. B.; LUZ, A. P.; PELLIZARI, V. H.; LABBÉ, D.; GREER, C. W. Prevalence of alkane monooxygenase genes in arctic and antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 41, p. 141-150, 2002.

WILLERSLEV, E.; HANSEN, A. J.; CHRISTENSEN, B.; STEFFENSEN, J. P.; ARCTANDER, P. Diversity of Holocene life forms in fossil glacier ice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 96, p. 8017-8021, 1999.

WILLERSLEV, E.; HANSEN, A. J.; RONN, R.; BRAND, T. B.; BARNES, I.; WIUF, C.; GILICHINSKY, D.; MITCHELL, D.; COOPER, A. Long-term persistence of bacterial DNA. **Current Biology**, v. 14, p. 9-10, 2004.

WOLFF, E. W.; PAREN, J. G. A two-phase model of electrical conduction in polar ice sheets. **Journal of Geophysical Research**, v. 89, p. 9433-9438, 1984.

WOLFGANG, L.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; YADHUKUMAR, H.; BUCHNER, A.; LAI, T.; STEPPI, S.; JOBB, G.; FÖRSTER, W.; BRETTSCHE, I.; GERBER, S.; GINHART, A.; GROSS, O.; GRUMANN, S.; HERMANN, S.; JOST, R.; KÖNIG, A.; LISS, T.; LÜßMANN, R.; MAY, M.; NONHOFF, B.; REICHEL, B.; STREHLOW, R.; STAMATAKIS, A.; STUCKMANN, N.; VILBIG, A.; LENKE, M.; LUDWIG, T.; BODE A.;

SCHLEIFER, K. ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1363-1371, 2004.

WYNN-WILLIAMS, D. D. Antarctic microbial diversity: the basis of polar ecosystem processes. **Biodiversity and Conservation**, v. 5, p. 1271-1293, 1996.

YERGEAU, E.; NEWSHAM, K. K.; PEARCE, D. A.; KOWALCHUV, G. A. Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 2670-2682, 2007.

YOON, J-H.; SO-JUNG KANG, S-J.; SCHUMANN, P.; OH, T-K. *Yonghaparkia alkaliphila* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Microbacteriaceae isolated from an alkaline soil. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2415-2420, 2006.

YOUNG, J. M.; KUYKENDALL, L. D.; MARTÍNEZ –ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 89-103, 2001.

YUHANA, M. **Microbial Diversity and Community Changes in High Mountain Habitats**. 125 f. PhD Thesis. Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Zürich, Zürich, Suíça, 2005.

ZACHOS, J.; PAGANI, M.; SLOAN, L.; THOMAS, E.; BILLUPS, K. Trends, Rhythms, and Aberrations in Global Climate 65 Ma to Present. **Science**, v. 292, p. 686-693, 2001.

ZHANG, X. J.; YAO, T. D.; MA, X. J.; WANG, N. L. Microorganisms in a high altitude glacier ice in Tibet. **Folia Microbiologica**, v. 47, p. 241-245, 2002.

ZHANG, G.; NIU, F.; MA, X.; LIU, W.; DONG, M.; FENG, H.; AN, L.; CHENG, G. Phylogenetic diversity of bacteria isolates from the Qinghai-Tibet Plateau permafrost region. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 1000-1010, 2007.

ZIELINSKI, M.; BACKHAUS, S.; HOFER, B. The principal determinants for the structure of the substrate-binding pocket are located within a central core of a biphenyl dioxygenase a subunit. **Microbiology**, v. 148, p. 2439–2448, 2002.