ANA CAROLINA VIEIRA ARAUJO

**DIVERSIDADE MOLECULAR DE ARQUEIAS EM SEDIMENTOS DE
RIOS DA AMAZÔNIA E CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES
METANOGÊNICAS CULTIVADAS**

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

São Paulo

2010

ANA CAROLINA VIEIRA ARAUJO

**DIVERSIDADE MOLECULAR DE ARQUEIAS EM SEDIMENTOS DE RIOS DA
AMAZÔNIA E CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES METANOGÊNICAS
CULTIVADAS**

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: 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

Araujo, Ana Carolina Vieira.

Diversidade molecular de arqueias em sedimentos de rios da
Amazônia e caracterização de espécies metanogênicas cultivadas /
Ana Carolina Vieira Araujo. -- 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: Molecular diversity of Archaea in
Amazonian river sediments and characterization of cultured
methanogenic species.

Descritores: 1. Domínio Arqueia 2. Arqueias metanogênicas 3.
Diversidade microbiana 4. Amazônia 5. Sedimento de rio 6. Rio
Madeira I. Pellizari, Vivian Helena II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB049/2010

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

Candidato(a): Ana Carolina Vieira Araujo.

Título da Tese: Diversidade molecular de arqueias em sedimentos de rios da Amazônia e caracterização de espécies metanogênicas cultivadas.

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:

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

João Guimarães Rosa

**A meus pais José Carlos e Mércia, a
minha avó Célia e a meu irmão
Fabrício (in memoriam) pelo apoio
constante, pela confiança e pelo amor
inestimável.**

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari, pela confiança de sempre, pelas oportunidades oferecidas e pela generosidade com que conduz seus projetos.
- À Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller, por ter me iniciado e acompanhado no maravilhoso mundo das arqueias. Pelo carinho e pela confiança.
- À Dra. Cristina Rossi Nakayama, a Ciiiiiiiiiiiis, por tudo! Amizade, companheirismo, disposição, generosidade. Pelos muitos bons momentos compartilhados, científicos ou não, pelas sábias sugestões para o trabalho e para a vida.
- À Msc. Rosa de Carvalho Gamba, a Rosinha, pela contagiante alegria de viver, pelo companheirismo, pela sabedoria compartilhada, pela disposição e por tornar tantos momentos tão agradáveis.
- A Ana Paula, pelo companheirismo, apoio, paciência e ainda pela revisão do texto.
- A todos os colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia Ambiental, aos que já passaram e aos que estão, todos ainda guardados na lembrança. O que enriquece nosso conhecimento e nossas vidas é o convívio com pessoas que, apesar de diferentes, compartilham uma trilha com um destino em comum. Ter a companhia de vocês nesses anos tornou o caminho bem mais feliz e frutífero.
- Aos amigos da graduação e da república, pelos muitos momentos felizes e inesquecíveis. Pelos ombros emprestados, pelas risadas compartilhadas, pelos almoços de domingo e por tornarem minha vida muito mais feliz nesses anos em São Paulo.
- Ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, pela infra-estrutura disponibilizada para realização desse trabalho e aos funcionários que colaboraram e me incentivaram na conclusão do mesmo.
- Ao Instituto de Ciências Biomédicas V, na pessoa do Prof. Dr. Marcelo Camargo Aranha, que possibilitou a realização das coletas do material empregado neste trabalho.

- Ao Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos, na pessoa da Profa. Maria Bernadete Varesche e da Profa. Beth Moraes pelo auxílio nas análises físico-químicas.
- Ao Dr. André Rosch Rodrigues e ao técnico Edílson de Oliveira Faria, do Instituto Oceanográfico, pelas análises de matéria orgânica e granulometria dos sedimentos.
- Ao Prof. Dr. Plínio Carlos Alvalá e ao Dr. Luciano Marani, do Laboratório de Ozônio do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, pelas técnicas para coleta de metano atmosférico e por analisar as amostras.
- Às instituições FAPESP e CNPq, pelo financiamento ao trabalho.

O meu muito obrigada!

“Gostaria de ser um crocodilo porque amo os grandes rios, pois são profundos como a alma de um homem. Na superfície são muito vivazes e claros, mas nas profundezas são tranquilos e escuros como o sofrimento dos homens”

João Guimarães Rosa

RESUMO

ARAÚJO, A. C. V. **Diversidade molecular de arqueias em sedimentos de rios da Amazônia e caracterização de espécies metanogênicas cultivadas**. 2010. 121 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Nos últimos anos muitos grupos de pesquisa têm se voltado a estudos da região amazônica, inclusive quanto à importância da região frente às mudanças climáticas. Grupos de pesquisa voltados ao estudo de gases de efeito estufa detectaram altos fluxos positivos de metano para a atmosfera. O gás metano é o segundo mais importante gás de efeito estufa e é produzido majoritariamente por micro-organismos pertencentes ao Domínio *Archaea*. Esses micro-organismos metanogênicos são responsáveis pela produção de aproximadamente 70% do metano emitido para a atmosfera anualmente. Ainda, os estudos de arqueias em ambientes naturais são relativamente recentes, e no Brasil ainda são esparsos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar pontualmente a diversidade de arqueias em sedimentos dos rios Floresta e Madeira através de técnicas moleculares e do cultivo de arqueias metanogênicas. A caracterização molecular foi feita através de biblioteca do gene rRNA 16S e os cultivos para enriquecimento de cepas metanogênicas foram realizados empregando-se técnicas clássicas de cultivo de anaeróbios estritos; as cepas cultivadas foram identificadas por técnicas baseadas no gene para o rRNA 16S. A maior parte das sequências obtidas nas duas bibliotecas pertence ao domínio *Crenarchaeota* – 76% das sequências do rio Floresta e 93% das sequências do rio Madeira; sendo que grande parte das sequências apresentou similaridade menor que 97% às sequências depositadas nos bancos de dados, revelando a existência de grupos ainda não descritos na literatura. Os cultivos para enriquecimento de arqueias metanogênicas em amostras do rio Madeira apresentaram alta taxa de produção de metano (33% em 16 dias) revelando que esse grupo ocorre ativamente no sedimento. Nesses enriquecimentos foi possível detectar células pertencentes às famílias *Methanosarcinaceae* e *Methanobacteriaceae* pelo emprego de sondas fluorescentes de RNA. Essas células foram subcultivadas e foi possível estabelecer culturas dos gêneros *Methanosarcina* e *Methanobacterium* em laboratório, sendo que na cultura de *Methanosarcina* foi possível identificar a ocorrência de um gênero bacteriano pertencente à família *Veillonellaceae*, da classe *Clostridiales*, mas com apenas 92% de similaridade às sequências depositadas nos bancos de dados. O fato de ter-se empregado meio de cultura e substratos nas concentrações

padronizadas para o estudo de amostras de ambientes muito mais ricos em matéria orgânica – como sistemas de tratamento de resíduos – pode explicar o crescimento preferencial de arqueias metanogênicas em detrimento de outros micro-organismos detectados pelas análises moleculares e ainda não cultivados. A grande diversidade de arqueias não cultivadas encontrada vem reforçar a necessidade de se abranger o estudo desse grupo, especialmente esforços para o cultivo e conhecimento da fisiologia e, conseqüentemente, do papel ecológico desses grupos nos diversos ambientes em que são encontrados. O trabalho vem ainda acrescer com dados de um ambiente tropical o conhecimento ainda insipiente sobre arqueias em ambientes naturais. No contexto amazônico, o trabalho revela a diversidade de um grupo ainda pouco explorado e conhecido na região, apesar da importância que o metabolismo de seus representantes possa ter na regulação desse ambiente, como é o caso, por exemplo, das arqueias metanogênicas, responsáveis pelas altas taxas de emissão de metano detectadas nesse ecossistema.

Palavras-chave: Domínio Archaea. Arqueias metanogênicas. Diversidade microbiana. Amazônia. Sedimento de rio. Rio Madeira.

ABSTRACT

ARAÚJO, A. C. V. **Molecular diversity of Archaea in Amazonian River Sediments and characterization of cultured methanogenic species.** 2010. 121 p. Thesis (Ph. D. in Biotechnology) – Biomedical Sciences Institut, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

In recent years, many research groups are devoted to study the Amazon region, including the relation of this area with climate change. In studies of greenhouse gas emissions, a high positive flux of methane from the Amazonian region to the atmosphere has been detected. Methane is the second most important greenhouse gas and is mainly produced by microorganisms belonging to the *Archaea* domain. These methanogenic archaea are responsible for approximately 70% of the total methane emitted to the atmosphere annually. Also, studies involving archaea in natural environments are relatively recent and still scarce in Brazil. The objective of this work was to characterize the *Archaea* diversity in two sites at Madeira and Floresta rivers sediments using molecular techniques and the culturing of methanogenic archaea. The molecular characterization was carried through 16S rRNA gene library and the enrichment of methanogenic archaea occurring in the sediments was done applying classical methods of culturing strict anaerobes; the cultured strains were identified through analysis of the 16S rRNA gene. Most sequences obtained in the libraries from both rivers belonged to the *Crenarchaeota* domain – 76% of the sequences from Floresta river and 93% of the sequences from Madeira river; and almost half of the sequences presented less than 97% of similarity when compared to sequences available in databases, revealing the existence of new archaea groups yet to be described in the literature. The enrichment cultures for methanogenic archaea in Madeira river sample exhibited a high production rate of methane (33% in 16 days) revealing this sediment harbor active methanogenic microorganisms. It was possible to detect cells belonging to the *Methanosarcinaceae* and *Methanobacteriaceae* families through the use of RNA fluorescent probes. These cells were cultured and identified as strains of *Methanosarcina* sp. and *Methanobacterium* sp., and are both being maintained alive under laboratory conditions, though not as pure cultures. Only one genera of bacteria was detected in the *Methanosarcina* culture; the bacteria belongs to the family *Veillonellaceae*, class *Clostridiales*, but has only 92% of similarity with other sequences in the databases. The use of culture media and substrates in concentrations standardized for the study of samples from organic rich environments – as wastewater

treatment plants – can explain the preferential growth of these organisms and not of the uncultured ones detected in the librafries. The great diversity of uncultured Archaea found emphasizes the necessity to broaden studies involving this group, focusing mainly in culturing and physiological assays that could help understand the ecological roles of these microorganisms in the diverse environments they occupy. This work contributes to this knowledge area with information from a tropical environment, where the studies of Archaea diversity are still deficient. In the Amazonian context, this work reveals the diversity of a group little studied in the area, though the metabolism of its members can have a great importance in the regulation of this environment, as is the case of methanogenic archaea, responsible for the huge amounts of methane emitted in this ecosystem.

Keywords: Archaea domain. Methanogenic archaea. Microbial diversity. Amazon. River sediment. Madeira river.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Árvore filogenética do domínio *Archaea* baseada em sequências rRNA 16S depositadas no banco de dados Greengenes (DE SANTIS et al., 2006) com grupos nomeados conforme apresentado por esse banco para árvore construída por máxima parcimônia através do programa ARB (LUDWIG et al., 2004). Destacam-se os grupos que apresentam representantes cultivados e a fisiologia daqueles que podem ser considerados indicadores dos diferentes ambientes: Fwc – coluna d’água doce; Mwc – coluna d’água marinha; Hdv – fonte hidrotermal; Fsed – sedimento de água doce; Msed – sedimento de água marinha; S – solo; Hsal – hipersalino. 36
- Figura 2-** Fluxo de carbono na degradação de matéria orgânica em ambientes anaeróbios. Os números ao lado das setas referem-se ao tipo de micro-organismo responsável pela realização do respectivo passo na degradação: 1- bactérias fermentadoras primárias, 2- fermentadoras acetogênicas, 3- homoacetogênicas, 4- arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, 5- arqueias metanogênicas acetoclásticas. 39
- Figura 3-** Resumo das três principais vias metanogênicas. CoM, coenzima M; H₄SPT, tetrahydrosarcinapterina; MF, metanofurano. 40
- Figura 4-** Mapa apresentando hidrografia do estado de Rondônia com destaque aos pontos de coleta no rio Madeira (seta azul) e no rio Floresta (seta vermelha). 44
- Figura 5-** Imagem de satélite mostrando em detalhe o ponto de coleta no rio Madeira, a montante da cidade de Porto Velho e do recebimento das águas do rio Jamari, principal tributário do rio Madeira. 45
- Figura 6-** Vista do Rio Madeira, próximo ao ponto de coleta. 45
- Figura 7-** Imagem de satélite mostrando em detalhe o ponto de coleta no rio Floresta, pequeno afluente do rio Jamari. O local foi escolhido pelo bom estado de preservação das margens desse rio e pela facilidade de acesso a partir da cidade de Monte Negro, onde está situado o campus avançado ICB V. 46
- Figura 8-** Vista do Rio Floresta, no ponto de coleta. 46
- Figura 9-** Sequência dos experimentos realizados com amostras de sedimento coletada no Rio Madeira. 50
- Figura 10-** Sequência dos experimentos realizados com amostras de sedimento coletada no Rio Floresta. 51
- Figura 11-** Sistema de distribuição simultânea de gases empregado para manipulação de micro-organismos anaeróbios estritos. 55

Figura 12- Análise filogenética baseada em fragmento de 450 pb do gene rRNA 16S em clones do reino <i>Euryarchaeota</i> obtidos a partir do sedimento do Rio Floresta (FLO). A árvore foi construída empregando-se o método de “Neighbor-Joining” com modelo de substituição de Jukes-Cantor. Números junto aos nós representam valores de “bootstrap” para 1000 réplicas (apenas os maiores que 70 são mostrados).	63
Figura 13- Análise filogenética baseada em fragmento de 450 pb do gene rRNA 16S em clones do reino <i>Crenarchaeota</i> obtidos a partir do sedimento do rio Floresta (FLO). A árvore foi construída empregando-se o método de “Neighbor-Joining” com modelo de substituição de Jukes-Cantor. Números junto aos nós representam valores de “bootstrap” para 1000 réplicas (apenas os maiores que 70 são mostrados).	66
Figura 14- Análise filogenética baseada em fragmento de 500 pb do gene rRNA 16S em clones do reino <i>Crenarchaeota</i> obtidos a partir do sedimento do rio Madeira (MAD). A árvore foi construída empregando-se o método de “Neighbor-Joining” com modelo de substituição de Jukes-Cantor. Números junto aos nós representam valores de “bootstrap” para 1000 réplicas (apenas os maiores que 70 são mostrados).	68
Figura 15- Análise filogenética baseada em fragmento de 500 pb do gene rRNA 16S em clones do reino <i>Euryarchaeota</i> obtidos a partir do sedimento do rio Madeira (MAD). A árvore foi construída empregando-se o método de “Neighbor-Joining” com modelo de substituição de Jukes-Cantor. Números junto aos nós representam valores de “bootstrap” para 1000 réplicas (apenas os maiores que 70 são mostrados).	70
Figura 16- Curvas de rarefação da biblioteca construída a partir do sedimento do Rio Floresta. Os valores de divergência tolerados em cada curva foram selecionados para representar diferentes níveis de agrupamentos filogenéticos, segundo Cohan, 2005 – 3% para gênero, 10% para família e 22% para classe.	73
Figura 17- Curvas de rarefação da biblioteca construída a partir do sedimento do Rio Madeira. Os valores de divergência tolerados em cada curva foram selecionados para representar diferentes níveis de agrupamentos filogenéticos, segundo Cohan, 2005 - 3% para gênero, 10% para família e 22% para classe.	73
Figura 18- Etapas de cultivo empregadas para enriquecimento e isolamento de arqueias metanogênicas a partir do sedimento do rio Madeira. Setas grossas representam repiques das culturas.	78
Figura 19- Observação de células encontradas no enriquecimento feito a partir do sedimento do Rio Madeira empregando-se fontes de carbono utilizadas por células metanogênicas. É possível observar sarcinas e bacilos autofluorescentes quando vistos à luz ultravioleta.	79
Figura 20- Aspecto geral de colônias crescidas nos frascos de “roll-tube”. A coloração variou entre bege (A) e branca (B), e muitas apresentavam bordas irregulares. Foram repicadas colônias variando entres os tamanhos de 0,2 e 0,7 cm de diâmetro.	82

Figura 21- Microscopia de fluorescência de células hibridizadas com sondas marcadas com rodamina (vermelho). Em B é possível observar sarcinas hibridizadas com a sonda MSMX860, específica para a família *Methanosarcinaceae*. Em D aparecem bacilos hibridizados com a sonda MB310, específica para a família *Methanobacteriaceae*. As imagens A e C referem-se à visualização das células coradas com DAPI, vistas no mesmo campo que B e D, respectivamente. 83

Figura 22- Gel de agarose para observação dos fragmentos gerados pela digestão enzimática dos produtos da amplificação de parte do gene rRNA 16S de colônias crescidas em “roll-tube”. As setas azuis indicam as amplificações que foram sequenciadas. A seta vermelha indica um padrão apresentado pela amplificação do gene para o rRNA 16S de mais de um micro-organismo. 85

Figura 23- Árvore filogenética construída pelo método “Neighbor-Joining” a partir das sequências com aproximadamente 1000 pb, recuperadas das colônias 16 e 29 (●). Sequências de culturas tipo obtidas do banco de dados do RDP e sequências de clones obtidas do banco NCBI (Δ). Números junto aos nós representam valores de “bootstrap” para o teste com 1000 réplicas. 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Quantidades de metano emitido a partir de fontes abiogênicas e biogênicas, naturais e antropogênicas.	22
Tabela 2- Equivalência entre as nomenclaturas adotadas por Pace (1997) e Hugenholtz (2002) para os principais clados de arqueias não cultivadas. A tabela se baseia na anotação fornecida pelo servidor “Greengenes”.....	35
Tabela 3- Principais grupos metanogênicos e os substratos energéticos que utilizam.	39
Tabela 4- Energia livre dos principais metabolismos metanogênicos.	40
Tabela 5- Informações sobre a coleta das amostras de sedimento empregadas no presente trabalho.	47
Tabela 6- Soluções adicionadas ao meio de cultura para enriquecimento e isolamento de arqueias metanogênicas.	56
Tabela 7- Parâmetros físico-químicos da coluna d’água dos rios Floresta e Madeira.	60
Tabela 8- Parâmetros físico-químicos dos sedimentos dos rios Floresta e Madeira.	61
Tabela 9- Índices de riqueza (Ace e Chao) e diversidade (Simpson e Shannon) obtidos para as bibliotecas dos rios Floresta e Madeira, considerando-se as divergências de 3% (nível de gênero) e 10% (nível de família).	74
Tabela 10- Porcentagem de metano acumulado na atmosfera dos frascos de repique das colônias selecionadas para continuidade do trabalho de isolamento. As colônias foram repicadas em meio contendo todas as fontes de carbono citadas e em meio contendo cada uma das fontes separadamente.	80
Tabela 11- Porcentagem de metano acumulada na atmosfera dos frascos de enriquecimento após 186 dias de incubação a 30 °C.	89

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3 ANÁLISE DE LITERATURA.....	25
3.1 Microbiologia ambiental na Amazônia	25
3.2 Domínio <i>Archaea</i>	27
3.2.1 Filogenia	27
3.2.2 Arqueias não cultivadas.....	29
3.2.3 Arqueias metanogênicas	37
3.3 Emissão de metano no ambiente amazônico	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Descrição da área de estudo.....	43
4.1.1 Descrição do rio Madeira	43
4.1.2 Descrição do rio Floresta.....	45
4.2 Amostragem.....	47
4.2.1 Coleta no rio Madeira	47
4.2.2 Coleta no rio Floresta	48
4.3 Determinações físico-químicas.....	48
4.3.1 Concentração de matéria orgânica e carbonato de cálcio.....	49
4.3.2 Concentração de carbono orgânico.....	49
4.4 Fluxogramas de trabalho	50
4.5 Extração de DNA total a partir dos sedimentos	51
4.6 Amplificação do gene rRNA 16S de arqueias a partir do DNA extraído do sedimento	52
4.7 Purificação dos produtos da amplificação	52
4.8 Construção de bibliotecas do gene rRNA 16S a partir do DNA total extraído dos sedimentos	53
4.9 Análise computacional das sequências.....	54
4.10 Cultivos para enriquecimento e isolamento de arqueias metanogênicas.....	54
4.12 Detecção de arqueias metanogênicas por hibridização fluorescente <i>in situ</i>	56
4.13 Identificação molecular de arqueias cultivadas	57

4.13.1 Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA)	58
4.13.2 Sequenciamento dos fragmentos de interesse	59
5.1 Caracterização físico-química	60
5.2 Biblioteca do gene rRNA 16S a partir do sedimento do rio Floresta	61
5.2.1 Clones obtidos do sedimento do rio Floresta afiliados ao reino <i>Euryarchaeota</i>	62
5.2.2 Clones obtidos do sedimento do rio Floresta afiliados ao reino <i>Crenarchaeota</i>	64
5.3 Biblioteca do gene rRNA 16S a partir do sedimento do rio Madeira	67
5.3.1 Clones obtidos do sedimento do rio Madeira afiliados ao reino <i>Crenarchaeota</i>	67
5.3.2 Clones obtidos do sedimento do rio Madeira afiliados ao reino <i>Euryarchaeota</i>	69
5.4 Índices de α e β diversidade	72
5.5 Considerações sobre a diversidade de arqueias encontrada nos sedimentos estudados	74
5.6 Enriquecimento de arqueias metanogênicas a partir do sedimento do rio Madeira	76
5.6.1 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> dos enriquecimentos	82
5.6.2 Identificação molecular das arqueias cultivadas	83
5.6.3 Identificação de bactérias associadas aos cultivos	88
5.7 Enriquecimento de arqueias metanogênicas a partir do sedimento do rio Floresta	89
6 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	92
ANEXOS	107
ANEXO A – Preparo de meio de cultura e soluções para o cultivo de micro-organismos anaeróbios estritos	108
ANEXO B – Hibridização Fluorescente <i>in situ</i> e coloração de DAPI	116
ANEXO C – Iniciadores e sondas empregados	120
ANEXO D – Medidas de emissão de metano <i>in situ</i>	122

1 INTRODUÇÃO

A divisão filogenética dos seres vivos em três domínios – *Archaea*, *Bacteria* e *Eucarya* – foi proposta em 1977 por Carl Woese e George Fox (WOESE e FOX, 1977). Seu trabalho de classificação dos micro-organismos com base no gene para o rRNA 16S revelou a existência de um grupo cujas sequências não apresentavam os nucleotídeos ordenados da mesma forma que o anteriormente encontrado em todos os procariontes; o grupo também não apresentava partes de sequências que poderiam aproximá-los dos eucariontes, mas possuía sequências de nucleotídeos compartilhados tanto por eucariontes e quanto por procariontes. Essas sequências, pertencentes a micro-organismos metanogênicos, indicavam a existência de um possível novo grupo filogenético, superior à divisão de reino, que teria se divergido antes da separação entre as bactérias e eucariontes. Mas, para confirmá-lo, era preciso buscar outros micro-organismos não metanogênicos com a mesma distribuição de nucleotídeos, uma vez que se espera que um grupo que se divergiu basalmente na evolução tenha se diversificado tanto quanto os outros ramos – *Bacteria* e *Eucarya*. Outros dois organismos então, já previamente listados para compor a filogenia dos procariontes, apresentaram sequências de rRNA 16S semelhantes à do grupo metanogênico: um micro-organismo atualmente classificado como *Thermoplasma*, mas que anteriormente acreditava-se tratar de uma espécie de micoplasma de vida livre, e um micro-organismo halofílico extremo. Além da similaridade entre as sequências de rRNA 16S desses micro-organismos, descobriu-se posteriormente que eles compartilham de características celulares, como a ausência de peptídeo-glicano na parede celular e ocorrência, na membrana celular, de lipídeos ramificados e com ligações éter em lugar das ligações éster frequentemente encontradas entre os demais procariontes. Somando essas informações, Woese e Fox (1977) puderam propor uma nova divisão filogenética para os seres vivos, a divisão em três reinos- *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*.

Apesar de morfologicamente semelhantes a bactérias, as arqueias são evolutivamente bastante diferenciadas e compartilham de características só encontradas em organismos eucariontes. Seu aparato genético e celular como, por exemplo, as polimerases e seu mecanismo de replicação do DNA, assemelham-se mais aos dos organismos eucariontes que às bactérias e supõe-se que haja um ancestral comum entre os domínios *Archaea* e *Eucarya*.

Por terem sido inicialmente encontradas em ambientes extremos, os estudos e a busca por arqueias se deram essencialmente em ambientes com características peculiares, como lagos hipertermais ou hipersalinos, além de ambientes estritamente anaeróbios. Com o avanço

das técnicas moleculares, especialmente de metagenômica, verificou-se a ampla ocorrência de arqueias nos mais diversos ambientes, especialmente no plâncton marinho (DE LONG, 1992), mas também em solos (BINTRIM et al., 1997), ambientes de água doce (MACGREGOR et al., 1997) e polares (DE LONG et al., 1994).

Atualmente, o conhecimento em ecologia molecular de arqueias tem avançado, mas a grande maioria das arqueias encontradas são organismos ainda não cultivados. Devido à escassez de espécies cultivadas que representem os grupos filogenéticos encontrados através das análises de sequências do rRNA 16S, pouco se pode inferir acerca do papel desses micro-organismos nos ambientes que ocupam. O acesso a informações sobre o metabolismo e fisiologia desses grupos vem sendo feito a partir de informações genômicas e através da relação de características físico-químicas dos ambientes aos possíveis nichos que poderiam ser ocupados por micro-organismos.

Dentre as arqueias cultivadas, destacam-se as metanogênicas, que têm um histórico de estudo anterior à proposição de Woese e servem como modelo para estudos genéticos, fisiológicos e metabólicos do domínio *Archaea*. Notadamente seu estudo desenvolveu-se na área do saneamento ambiental, onde esse grupo desempenha papel fundamental na mineralização de matéria orgânica e no equilíbrio de sistemas anaeróbios de tratamento de resíduos.

O principal produto do metabolismo metanogênico é o gás metano e, por essa razão, o grupo teve sua importância revista com o aumento da preocupação com o aquecimento global. O gás metano é o segundo mais importante gás de efeito estufa. Apesar de sua concentração na atmosfera ser de aproximadamente 1,7 ppbv¹, seu potencial de acumular e reemitir calor é 21 vezes maior que o do CO₂, fazendo com que o metano seja responsável por 15% do efeito estufa observado atualmente. Nos últimos 300 anos, suas emissões aumentaram em aproximadamente 1% ao ano (HOLMES, 1999). Atualmente, cerca de 500 Tg² de metano são emitidos ao ano para a atmosfera e aproximadamente 70% dessa quantidade é produzida de forma biogênica (Tabela 1), majoritariamente por arqueias metanogênicas. A atual preocupação com o aquecimento global, a importância do metano como gás de efeito estufa e a produção biogênica desse próprio gás levaram a um grande aumento do estudo de arqueias metanogênicas em ambientes naturais, especialmente naqueles com grande contribuição de

¹ ppbv: partes por bilhão em volume, medida adimensional de concentração correspondente a 1 partícula em 10⁹ partículas.

² Tg: Teragrama, equivalente a 10¹² gramas.

metano para a atmosfera, como arrozais (CONRAD, 2007), trato digestivo de ruminantes (JANSSEN e KIRS, 2008) e sedimentos alagados (KEMNITZ et al., 2004).

Tabela 1- Quantidades de metano emitido a partir de fontes abiogênicas e biogênicas.

<i>Fonte</i>	<i>Emissão (TgCH₄ ano⁻¹)</i>	<i>Varição da estimativa</i>
Abiogênicas		
Queimadas naturais	2	
Fontes geológicas	14	12 – 36
Gás natural	30	25 – 50
Mineração de carvão mineral	46	15 – 64
Queima de biomassa	50	27 – 80
Combustíveis fósseis	30	
<i>Total</i>	<i>172</i>	
Biogênicas		
Aterros sanitários	61	40 – 100
Solos alagados	100	92 – 232
Cupins	20	2 – 22
Oceanos	4	0,2 – 2,0
Sedimentos marinhos	5	0,4 – 12,2
Ruminantes	81	65 – 100
Cultivos de arroz	60	25 – 90
<i>Total</i>	<i>331</i>	
Total emitido	503	

FONTE: Adaptado de Wuebbles e Hayhoe, 2002.

Como pode ser observado na Tabela 1, os solos alagados são a principal fonte natural de emissão de metano para a atmosfera. A planície amazônica é um das maiores superfícies alagadas do planeta e estudos de emissão de metano na região verificaram que esta é responsável por até 20% do total de metano emitido por terrenos alagados globalmente. Apesar de alguns estudos já terem caracterizado a emissão de metano no local, principalmente empregando-se amostragens por satélite e não medindo a emissão *in situ*, são escassos os trabalhos publicados caracterizando a comunidade metanogênica em solos e sedimentos da região amazônica.

Nesse sentido, o trabalho apresentado buscou contribuir para o conhecimento da diversidade microbiana na Região Amazônica, dedicando-se ao estudo do domínio *Archaea*. A caracterização da diversidade em pontos específicos nos sedimentos dos rios foi realizada empregando-se técnicas de biologia molecular concomitantemente ao cultivo em meios

específicos para o enriquecimento e isolamento de arqueias metanogênicas, uma vez que não se conhecem trabalhos acerca desse grupo nos rios amazônicos.

O trabalho apresentado foi realizado no âmbito do projeto “Pesquisa Pura e Aplicada à Rondônia”, financiado pelas instituições FAPESP e CNPq, dentro do Programa de Apoio a Núcleos de Excelência – PRONEX. O projeto interdisciplinar supracitado envolveu o estudo de doenças endêmicas e também a transferência de conhecimento e tecnologia em áreas de vanguarda para o estado de Rondônia. As atividades realizadas pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental focaram, além do estudo de arqueias metanogênicas, o estudo de bactérias metanotróficas e também estudos de genômica funcional do gene ARHD, codificador de dioxigenases que hidrolizam hidrocarbonetos aromáticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a diversidade de arqueias e a produção de metano a partir de sedimentos de rios amazônicos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a estrutura da comunidade de arqueias.
- Avaliar a atividade metanogênica de amostras de sedimentos sob condições controladas.
- Identificar culturas de arqueias metanogênicas.

3 ANÁLISE DE LITERATURA

3.1 Microbiologia ambiental na Amazônia

A vasta extensão da Amazônia e sua posição no Trópico Úmido conferem à região um potencial para influenciar os balanços globais de energia, água e carbono e tal influência não pode ser desconsiderada quando se busca entender de que modo o clima poderá se alterar no futuro. As trocas de energia, água, carbono e outros gases-traço e nutrientes, através dos sistemas atmosférico, ecológico e fluvial da Amazônia, e o modo como são alteradas devido às mudanças na cobertura vegetal, necessitam ser quantificados e compreendidos, localmente, mas também abrangendo todo o ecossistema (BRASIL, 2008).

No sentido de estudar um dos aspectos complexos desse ecossistema, foi elaborado o projeto LBA, posteriormente transformado em um programa governamental – Programa de Grande Escala da Biosfera-Atmosfera na Amazônia – que, em linhas gerais, estuda as interações entre os compartimentos biológico e atmosférico, explorando também os efeitos de mudanças climáticas no ecossistema amazônico (BRASIL, 2008). Muito do que se conhece hoje para a região amazônica em termos de emissão de gases de efeito estufa, especialmente o metano, advém de trabalhos realizados no âmbito desse projeto. No entanto, nenhuma das frentes de trabalho envolveu o estudo de microbiologia do ambiente amazônico, apesar da participação de micro-organismos nos ciclos biogeoquímicos ser crucial para a regulação da atmosfera-biosfera (SCHLEPER, 2007).

Embora nas últimas décadas tenha crescido o número de trabalhos realizados para estudo da biodiversidade na Amazônia, ainda muito precisa ser feito para se entender a enorme complexidade genética da região, especialmente no que tange à diversidade microbiana (BORNEMAN e TRIPLET, 1997). Assim como outros ambientes tropicais geralmente tidos como ricos em biodiversidade macroscópica, a diversidade microbiana encontra-se sub-representada em comparação à quantidade de procariontes descritos a partir de ambientes temperados, especialmente dos países mais desenvolvidos como EUA, Alemanha e Japão (FLOYD et al., 2005). Os estudos sobre micro-organismos são escassos e, em geral, destinados aos tipos encontrados em solos, fungos e bactérias endofíticas de árvores e plantas medicinais (AZEVEDO et al., 2004) e mais recentemente estudos envolvendo o impacto de mudanças de uso do solo em comunidades microbianas (JESUS et al., 2009; TAKETANI e TSAI, 2010). Há também alguns trabalhos envolvendo eucariontes, bactérias e

vírus patogênicos afetando comunidades humanas, animais e plantações na região amazônica, mas poucos buscaram estudar a ecologia microbiana nesse ecossistema.

Borneman e Triplett (1997) realizaram o primeiro trabalho de caracterização da diversidade microbiana da Bacia Amazônica empregando métodos moleculares. Trabalhando com amostras de solo de pastagem e de floresta, os autores sequenciaram 100 fragmentos do gene rRNA 16S e encontraram 78 deles relacionados aos filos *Planctomyces*, *Clostridium*, ao grupo com alto conteúdo G+C, ao grupo formado por *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, a *Fibrobacterium* e ao grupo *Proteobacteria*, enquanto 2 pertenciam ao domínio *Archaea* e os demais não puderam ser relacionados a grupos contendo representantes cultivados. Duas sequências obtidas apareceram próximas à base da árvore filogenética, sendo possivelmente intermediárias entre a maioria das bactérias e aquelas mais antigas, predominantemente termofílicas. Nenhuma das sequências apareceu mais de uma vez na análise e a maior similaridade encontrada entre um clone e uma espécie já cultivada foi de 85%, revelando a alta diversidade desses solos. Nenhum dos clones apresentou 97% ou mais de similaridade com sequências depositadas nos bancos de dados, indicando que as sequências obtidas pertencem a novos gêneros (STACKENBRANDT e GOEBEL, 1994).

Fierer e Jackson (2006) encontraram menor diversidade e riqueza microbiana em solo da Amazônia Peruana em comparação a outros solos das Américas do Norte e do Sul. Os autores atribuem essa menor diversidade ao pH ácido dos solos amazônicos, uma vez que foi encontrada boa correlação entre esse fator e parâmetros ecológicos, sendo mais ricos e diversos os solos com pH próximo ao neutro. Jesus et al. (2009) também encontraram forte relação entre a composição da comunidade microbiana de solos amazônicos e fatores edáficos como pH e concentração de Al^{+3} e puderam verificar que solos empregados para agricultura e pastagem apresentaram maior diversidade microbiana que os solos cobertos por floresta primária ou por floresta em recuperação.

No caso de um solo afetado pela presença de uma mina desativada, verificou-se que houve um aumento da diversidade e da redundância funcional quanto melhor o estado de recuperação do solo, sendo maior a redundância na porção do solo com vegetação original preservada (YIN et al., 2000). Esses dados indicam a importância da manutenção e da recuperação da diversidade de micro-organismos no solo, considerando suas diferentes funções no ecossistema.

Achá et al. (2005) estudaram a diversidade de bactérias redutoras de sulfato (BRS) associadas à rizosfera de plantas aquáticas em um lago na Bacia do Rio Madeira e a relação

dessas bactérias com a metilação do mercúrio, um importante contaminante da região. Os autores encontraram representantes da família *Desulfovibrionaceae* na rizosfera de todas as plantas estudadas, esse grupo é o mais estudado dentre as BRS e sua sobrevivência em ambientes aeróbios já é conhecida. É também considerado como um importante grupo responsável pela metilação de mercúrio. Foram também detectados os grupos *Desulfotomaculum*, *Desulfosarcina* e *Desulfobulbus*, sendo que esse último foi isolado de ambiente aeróbio e, sabidamente, o oxigênio favorece o crescimento desse grupo. Os autores ainda verificaram que a inibição do metabolismo do sulfato levou a uma diminuição nas taxas de metilação de mercúrio.

Pazzinato (2007), empregando bibliotecas do gene rRNA 16S e cultivos para obtenção de culturas metanogênicas verificou a produção de metano em solos de terra preta e sedimentos de várzea coletados próximos à cidade de Santarém – Pará. A autora encontrou baixa diversidade de arqueias nas amostras de várzea e a maior parte das sequências obtidas pode ser relacionada a sequências oriundas de solos ou sedimentos alagados. As sequências pertencentes ao domínio *Crenarchaeota* relacionaram-se a outras obtidas de ambientes como fontes termais, enquanto que aproximadamente 75% daquelas afiliadas ao domínio *Euryarchaeota* pertenciam à família *Methanosarcinaceae*. Nos cultivos realizados, a autora chegou a 2 culturas do gênero *Methanosarcina* e a 8 culturas do gênero *Methanobacterium*. Trabalhos como esse, envolvendo a avaliação de comunidades metanogênicas em campos abertos, como em sedimentos alagados, rios, lagoas e represas são ainda escassos, apesar da grande importância desses locais como fontes de emissão de metano (KEMNITZ et al., 2004).

3.2 Domínio *Archaea*

3.2.1 Filogenia

A criação do domínio *Archaea* baseou-se em 20 sequências de rRNA 16S obtidas de organismos cultivados (ROBERTSON et al., 2005) e este domínio apresentou-se dividido em dois grandes reinos: *Euryarchaeota* (do grego *euryos*, abrangência, diversidade) que inclui metanogênicas, halófilas extremas e termoacidófilas, e *Crenarchaeota* (do grego *crenos*, fonte, origem, baseando-se na teoria do surgimento da vida em uma Terra quente) que inclui apenas espécies hipertemófilas. Estudos filogenéticos subsequentes empregando outros

conjuntos de genes além do rRNA 16S deram suporte a essa divisão (BROCHIER-ARMANET et al., 2008).

No entanto, o surgimento e a expansão dos estudos em ecologia molecular, principalmente baseada em sequências de rRNA 16S, levaram à descoberta de muitas linhagens ainda não cultivadas. Propôs-se então a criação do reino *Korarchaeota* (BARNES et al., 1996), para agrupar sequências distintas daquelas pertencentes aos dois reinos iniciais, mesmo sem a obtenção de algum organismo cultivado representante desse reino. Porém, com o aumento de sequências de rRNA 16S disponíveis nos bancos de dados, as sequências do reino *Korarchaeota* puderam ser agrupadas dentro do reino *Crenarchaeota* (ROBERTSON et al., 2005), sendo essa última classificação posteriormente confirmada por filogenias baseadas em sequências genômicas (GRIBALDO e BROCHIER, 2009).

O reino *Nanoarchaeota*, proposto com base em sequência de 16S de uma arqueia – *Nanoarchaeum equitans* – encontrada em relação parasítica com outra arqueia, *Ignococcus*, (HUBER et al., 2002), também teve sua filogenia revista quando genes codificadores de proteínas ribossomais foram empregados para análise filogenética do domínio *Archaea* (BROCHIER; FORTERRE; GRIBALDO, 2005). A espécie *Nanoarchaeum equitans* apresenta características típicas relacionadas a seu hábito de vida – parasitismo em ambiente hipertermal – e é possível que uma dessas características seja sua rápida taxa evolutiva, que levou a um distanciamento dessa cepa em relação às demais arqueias, quando são comparadas as sequências do gene para o rRNA 16S (BROCHIER; FORTERRE; GRIBALDO, 2005). No entanto, a análise das proteínas ribossomais de arqueias (BROCHIER; FORTERRE; GRIBALDO, 2005; BROCHIER-ARMANET et al., 2008) revelou que esse grupo está relacionado a espécies da classe *Thermococcales*.

Apenas sequências de rRNA 16S não foram suficientes para resolver claramente a filogenia do domínio *Archaea* mesmo empregando-se cerca de 700 sequências completas desse gene (ROBERTSON et al., 2005), com as quais foi possível confirmar a existência dos dois reinos propostos inicialmente com a criação do domínio *Archaea*.

Com o emprego de sequências de proteínas ribossomais para estudos filogenéticos de arqueias revelou-se que um grupo de micro-organismos mesofílicos anteriormente agrupado dentro do reino *Crenarchaeota* é, na verdade, evolutivamente distante o suficiente para que sejam agrupados em um novo reino – *Thaumarchaeota* (do grego *thaumas*, espantoso) (BROCHIER-ARMANET et al., 2008) cujo primeiro representante cultivado é a espécie *Cenarchaeum symbiosum*, isolada inicialmente como simbiote de uma esponja do mar

(PRESTON et al., 1996). Os estudos envolvendo sequências genômicas derivam principalmente de organismos cultivados e isolados em laboratório, permitindo que se resolva a filogenia desses grupos e também a do domínio *Archaea*, mas apenas em pontos próximos à base dessa árvore, uma vez que grande parte dos grupos de arqueias ainda não possui representantes cultivados.

A grande maioria dos trabalhos em ecologia molecular envolvendo o domínio *Archaea* revela a existência de novos grupos de organismos dos quais ainda não se conhece um representante cultivado. Cerca de 80% das sequências de arqueias depositadas no banco de dados do NCBI correspondem a clones ambientais (ROBERTSON et al., 2005), e para muitas faltam informações filogenéticas e ecológicas, apesar da importância e diversidade do grupo verificada em muitos dos ambientes em que já foi estudado.

3.2.2 Arqueias não cultivadas

Arqueias normalmente correspondem a cerca de 10% dos filotipos procariontes encontrados em diversos ambientes através de análises de rRNA 16S (ROBERTSON et al., 2005), mas também já foram descritas como dominantes em alguns ambientes, como em águas profundas na Antártica (DE LONG et al., 1994) e também em ambientes de pH extremamente ácido (FUTTERER et al., 2004). Dada sua distribuição, sua grande representação numérica e a diversidade metabólica encontrada no grupo, pode-se concluir que a importância do domínio *Archaea* na regulação dos ecossistemas tem sido subestimada e merece maiores estudos (ROBERTSON et al., 2005; SCHLEPER; JURGENS; JONUSCHEIT, 2005; CHABAN; NG; JARRELL, 2006). Há uma grande discrepância entre a quantidade de sequências depositadas nos bancos de dados (mais de 40 mil sequências de rRNA 16S) e a quantidade de organismos isolados (445 depositadas na coleção de cultura alemã), dos quais mais da metade (52%) são metanogênicas e o restante se divide entre organismos termófilos (23%), halófilos (23%) e acidófilos (2%) (PLASENCIA et al., 2010).

Por cerca de 15 anos, desde a sua descoberta, as arqueias foram consideradas como exclusivas de ambientes extremos, até que a popularização das técnicas moleculares permitiu a detecção desse grupo em praticamente todos os ambientes em que ele foi buscado, como por exemplo na coluna d'água de lagos (KEOUGH; SCHMIDT; HICKS, 2003) e oceanos (DE LONG, 2005), em sedimentos de água salgada (KIM et al., 2005) e doce (RASTOGI et al.,

2009), em solos (OCHSENREITER et al., 2003), turfa (GALAND et al., 2005) e também no trato digestivo de humanos (LEPP et al., 2004).

As primeiras evidências da ocorrência de arqueias em ambientes não extremos, competindo por nichos ocupados por bactérias, foram encontradas por De Long (1992) em águas no hemisfério Norte dos Oceanos Atlântico e Pacífico, onde o autor detectou que as arqueias compunham até 2% do rRNA total extraído do bacterioplâncton. As arqueias encontradas nesse trabalho formaram dois clados – um em *Euryarchaeota*, outro em *Crenarchaeota* – distantemente relacionados aos organismos já cultivados desses reinos (DE LONG, 1992). Posteriormente a esse trabalho, foram publicadas diversas pesquisas divulgando a descoberta de novos grupos de arqueias não cultivadas em ambientes mesotérmicos marinhos (FUHRMAN et al., 1992, 1993; DE LONG et al., 1994) e terrestres (UEDA; SUGA; MATSUGUCHI, 1995; HERSHBERGER et al., 1996; BINTRIM et al., 1997; MACGREGOR et al., 1997, SCHLEPER; HOLBEN; KLENK, 1997). As sequências de rRNA 16S encontradas nesses trabalhos em geral tinham menos de 80% de similaridade com sequências de *Crenarchaeota* e valores ainda menores em relação a outros grupos e, dessa forma, desconstruiu-se a idéia de que o reino *Crenarchaeota* fosse exclusivamente composto por arqueias termofílicas dependentes de enxofre (HERSHBERGER et al., 1996; SCHLEPER; HOLBEN; KLENK, 1997). Os trabalhos com amostras de água e sedimentos marinhos revelaram também que a diversidade dentro do grupo *Euryarchaeota* vai além das metanogênicas e halofílicas extremas (DE LONG, 1992; FUHRMAN e DAVIS, 1997, MACGREGOR et al., 1997). Ainda, em ambientes termais também foram descobertos novos grupos filogenéticos além dos organismos já cultivados conhecidos (BARNS et al., 1994; TAKAI e HORIKOSHI, 1999), revelando que ainda havia muito a se descobrir acerca do domínio *Archaea* e de sua importância nos mais variados ecossistemas.

Com o barateamento e popularização dos estudos baseados no gene para o rRNA 16S, muitas novas sequências de arqueias não cultivadas foram descobertas e novos agrupamentos foram definidos, cada um nomeado independentemente, ou não nomeado. O que pode ser definido dentro de *Crenarchaeota*, no entanto, foram dois clados, um composto por sequências de ambiente marinho, e outro formado por sequências obtidas de diversos ambientes terrestres (BUCKLEY; GRABER; SCHMIDT, 1998; ABREU et al., 2001). O grupo de sequências oriundas de ambiente marinho e pertencentes ao domínio *Crenarchaeota* passou a ser designado como “Marine Group I” ou MG I, enquanto o grupo afiliado ao domínio *Euryarchaeota* passou a ser designado como “Marine Group II” ou MG II

(VETRIANI et al., 1999; TAKAI e HORIKOSHI, 1999). A inexistência de um organismo cultivado e identificado que permita nomear a maioria dos grupos filogenéticos de arqueias levou a uma nomenclatura bastante confusa entre as arqueias não cultivadas encontradas em diferentes ambientes (DE SANTIS et al., 2006; TESKE e SØRENSEN, 2008; AUGUET; BARBERAN; CASAMAYOR, 2010).

Trabalhando com amostras de fontes hidrotermais, Takai e Horikoshi (1999) encontraram uma grande diversidade de arqueias não cultivadas e propuseram diversos nomes para os grupos formados por suas sequências: “Deep-sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotic group” – DHVE – 1 a 7; “Deep-sea Hydrothermal Vent Crenarchaeotic group” – DHVC; “Ancient Archaeal Group” – AAG; além de formalizar nomes para sequências oriundas de outros trabalhos, como “Terrestrial Hot Spring Crenarchaeotic group” – THSC e “Soil group”. Vetriani et al. (1999), trabalhando com sedimento de mar profundo, além de encontrar sequências relacionadas aos grupos MG I e II, encontrou outras para as quais propôs os grupos “Marine Benthic group” – MB – A, B e C, dentro do reino *Crenarchaeota* e MB D e E, dentro de *Euryarchaeota*.

Os primeiros clones de *Archaea* em ambiente terrestre ocorreram em amostras de solo de uma plantação de soja (UEDA; SUGA; MATSUGUCHI, 1995), mas sequências filogeneticamente distintas das sequências de arqueias obtidas em ambientes marinhos foram encontradas em solos de floresta boreal (JURGENS; LINDSTROM; SAANO, 1997) e levaram a proposição de um novo clado de arqueias não cultivadas: FFSB – “Finnish Forest Soil B”. Sequências de arqueias obtidas a partir de solos agriculturáveis nos Estados Unidos também apresentaram maior similaridade entre si do que com qualquer outra sequência no banco de dados e foi proposta a criação de um clado para essas sequências, SCA – “Soil Crenarchaeota”, grupo-irmão de “MG I” (BINTRIM et al., 1997). Em sedimentos de água doce foram encontradas sequências que formaram um grupo irmão às sequências encontradas em solo (SCHLEPER; HOLBEN; KLENK et al., 1997), mas formando um clado bastante distinto em relação às sequências disponíveis até aquele momento. Trabalhos subsequentes, adicionando mais sequências às árvores, confirmaram a proximidade filogenética entre muitas arqueias de solo e de sedimentos de água doce (DE LONG, 1998; JURGENS et al., 2000).

Pace (1997) e De Long (1998), em revisões dos trabalhos com sequências de rRNA 16S utilizam as seguintes subdivisões em *Euryarchaeota*: “Group 2”, formado por sequências encontradas em plâncton marinho e biodigestores; e “Group 3”, formado por sequências oriundas de plâncton e sedimento marinho; ambos grupos afiliados a *Thermoplasmatales*,

sendo “Group 3” mais próximo à base da árvore filogenética. Quanto à *Crenarchaeota*, foram propostas as seguintes divisões: “Group 1.1a”, com sequências de plâncton marinho; 1.1b, com arqueias encontradas em solo, sedimento lacustre, e na neve marinha (material particulado em suspensão no ambiente marinho); 1.1c, formado por sequências advindas de solo de floresta – incluindo as sequências de FFSB. Ainda, “Group 1.2”, com sequências de sedimentos lacustres e marinhos; e, “Group 1.3”, com sequências de sedimentos lacustres, solos e digestores anaeróbios. Essa divisão vem sendo usada em diversos trabalhos (JURGENS et al., 2000; PESARO e WIDMER, 2002; OCHSENREITER et al., 2003; SCHLEPER; JURGENS; JONUSCHEIT., 2005; KEMNITZ; KOLB; CONRAD, 2007; AUGUET; BARBERAN; CASAMAYOR, 2010), mas muitas vezes substituída ou combinada com subdivisões de arqueias não cultivadas nomeadas de acordo com o ambiente de onde se originaram as sequências.

Outra subdivisão bastante consolidada na filogenia das arqueias não cultivadas refere-se a sequências inicialmente encontradas em plantações de arroz e daí definidas como “Rice Cluster” (GROSSKOPF; STUBNER; LIESACK, 1998). Cinco subdivisões foram estabelecidas, sendo que o RC IV pertence ao reino *Crenarchaeota* e atualmente possui também sequências advindas de sedimentos marinhos, bem como de sedimentos de água doce e solos. Os demais RC pertencem a *Euryarchaeota*, sendo RC I irmão da classe *Methanosarcinales* e RC II irmão do clado formado por RC I e *Methanosarcinales*. O RC III aparece dentro do cluster *Thermoplasmatales*, como irmão de *Marine Group II*.

Ainda é necessário citar o grupo de arqueias não cultivadas responsável pela oxidação anaeróbia do metano (BOETIUS et al., 2000), que ocorre em sedimentos marinhos através de uma relação sintrófica entre as arqueias desse grupo e bactérias redutoras de sulfato. Ainda não se obteve um isolado desse grupo em laboratório, mas análises filogenéticas baseadas em sequências de rRNA 16S revelaram a existência de 2 grupos (ANME-1 e ANME-2) relacionados à família *Methanosarcinales* (HINRICHS et al., 1999).

Na filogenia proposta por Takai et al. (2001) para afiliar suas sequências obtidas em amostras de subsuperfície de uma mina de ouro, as sequências disponíveis no banco de dados foram agrupadas e os diversos grupos foram nomeados de acordo com o ambiente de origem da amostra. Como grupos-irmãos mais próximos ao clado que reúne representantes cultivados de *Crenarchaeota*, estão os grupos THSCG – “Terrestrial Hot Spring Crenarchaeotic Group” e TMCg – “Terrestrial Miscellaneous Crenarchaeotic Group”, esse último reunindo sequências obtidas em sedimentos de água doce. Como grupos mais recentes da filogenia de

Crenarchaeota foram definidos FSCG – “Forest Soil Crenarchaeotic Group” – incluindo as sequências de FFSB e algumas de SCA; SCG – “Soil Crenarchaeotic Group” e SAGMCG – “South Africa Gold Mine Crenarchaeotic Group”, formado exclusivamente por sequências encontradas em subsuperfície, na mina de ouro estudada. Todos esses grupos são evolutivamente menos recentes que o clado MG I – “Marine Group I”. Dentre o reino *Euryarchaeota* foram determinados (TAKAI et al., 2001) os novos grupos: SAGMEG – “South Africa Gold Mine Euryarchaeotic Group”, formado por sequências obtidas em subsuperfície da mina de ouro e posicionado basalmente em relação ao clado formado pela classe *Thermoplasmatales*; TMEG – “Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotic Group”, grupo-irmão do MG II – “Marine Group II” e do MBG-D – “Marine Benthic Group D”; DSEG – “Deep Sea Euryarchaeotic Group” e MEG – “Miscellaneous Euryarchaeotic Group”; os dois últimos formando o ramo mais recente dentro da filogenia do reino.

Os grupos acima mencionados, bem como outros grupos sinônimos oriundos de sedimentos marinhos profundos foram revistos (TESKE e SØRENSEN, 2008) com o objetivo de entender a ecologia dos diferentes grupos de arqueias não cultivadas e na tentativa de resolver a nomenclatura conflitante adotada em diferentes trabalhos. Revelou-se, por exemplo, que as sequências de DHVE-6 (TAKAI e HORIKOSHI, 1999) foram renomeadas como MEG (TAKAI et al., 2001). O grupo TMEG passou a ser designado MCG – “Miscellaneous Crenarchaeotic Group” – e inclui o grupo MBGC – “Marine Benthic Group C” – bem como sequências de ambientes terrestres (INAGAKI et al., 2003) e lacustres (STEIN et al., 2002). A descoberta de sequências relacionadas a clones obtidos em ambientes completamente diferentes revela a deficiência gerada ao se nomear os grupos de acordo com a amostra, mas justifica-se dada a falta de informações acerca dos micro-organismos encontrados. Essa nomenclatura, algumas vezes nomeando de forma diferente grupos formados por sequências relacionadas, mascara alguns padrões ecológicos que podem permitir a inferência do nicho ocupado por essas arqueias nos ambientes em que são encontradas (AUGUET; BARBERAN; CASAMAYOR, 2010).

Em muitos outros trabalhos que também exploraram a diversidade de arqueias em ambientes naturais empregando técnicas moleculares, a maior parte das sequências obtidas teve baixa similaridade com arqueias cultivadas (BANNING et al., 2005; KIM et al., 2005; LEHOURS et al., 2007; SCHWARZ; ECKERT; CONRAD, 2007; entre outros), impedindo a inferência do papel das arqueias nesses ambientes. Clementino et al. (2006) estudaram a diversidade de arqueias em amostras de ambientes naturais, impactados e em biodigestores no

estado do Rio de Janeiro. Os autores verificaram, por análise de rarefação, que a diversidade encontrada cobria a diversidade real no biodigestor, enquanto um maior esforço amostral seria necessário para cobrir a diversidade da Baía de Guanabara, do sedimento marinho preservado, do chorume de aterro sanitário e do solo de agricultura analisado. As amostras da Baía de Guanabara e do chorume apresentaram uma distribuição equivalente entre *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota*, enquanto que na amostra de sedimento marinho grande proporção dos clones relacionou-se à ordem *Halobacteriales*. Na amostra do solo cultivado a maioria dos clones pertenceu ao domínio *Crenarchaeota*. A amostra de biodigestor apresentou apenas 2 OTUs, sendo uma, predominante, pertencente à ordem *Methanomicrobiales* e a outra, relacionada ao gênero *Methanosaeta*. Em todas as amostras, os clones estiveram mais proximamente relacionados a organismos ainda não cultivados, sugerindo a ocorrência de novas linhagens de arqueias nos ambientes estudados. Na Baía de Guanabara foi ainda detectado que a poluição é o principal determinante da diversidade de arqueias no local, uma vez que grande parte dos clones detectados estão relacionados a clones de amostras de esgoto, resíduos industriais e de petróleo (VIEIRA et al., 2007).

O banco de dados “Greengenes” (DE SANTIS et al., 2006) disponibiliza sequências de micro-organismos analisadas e alinhadas, além de fornecer uma notação onde consta a classificação da sequência em sete sistemas de nomenclatura diferentes já adotados. No caso da filogenia de arqueias não cultivadas, as classificações mais comumente adotadas são a de Pace (1997) e a de Hugenholtz (2002) (Tabela 2).

Com base em sequências disponíveis no banco de dados “Greengenes”, tentou-se (AUGUET; BARBERAN; CASAMAYOR, 2010) encontrar padrões ambientais para a distribuição dos grupos em diferentes amostras e detectar possíveis espécies ou clados indicadores de determinados ambientes, uma vez que alguns grupos são povoados por sequências de diferentes origens ambientais. Com base na abundância de sequências de determinado clado em diferentes ambientes, classificados como apresentado na Figura 1, os autores conseguiram detectar que o clado 1.1a é tipicamente encontrado na coluna d’água de ambientes marinhos, enquanto os clados 1.1b e 1.1c são mais frequentes em amostras de solo que nos demais ambientes estudados.

Tabela 2: Equivalência entre as nomenclaturas adotadas por Pace (1997) e Hugenholtz (2002) para os principais clados de arqueias não cultivadas.
A tabela se baseia na anotação fornecida pelo servidor "Greengenes".

Pace (1997)	Hugenholtz (2002)	Ambientes onde já foram encontradas
Crenarchaeota		
LP	MG1 --- "Marine Group I"	Sedimentos e plâncton marinhos, mar profundo, fontes hidrotermais, águas subterrâneas, sub-superfície (SAGMEX).
LIb	SCG --- "Soil Crenarchaeotic Group"	Solos agrícolas e de floresta, simulação, sedimentos de água doce, sub-superfície.
LIc	pSL12	Fontes termais terrestres.
LId	pUWA2	TISSO --- "Terrestrial Hot Spring Crenarchaeotic Group" --- fonte termal, sub-superfície.
II	MCG --- "Miscellaneous Crenarchaeotic Group"	Fontes termais, água subterrânea, sedimentos de água doce e marinha, solos. Aparece também como YH97HA.
OPA 3	TMCG --- "Terrestrial Miscellaneous Crenarchaeotic Group"	Fontes termais terrestres, inclui <i>Thermoplasma</i> não cultivadas.
Euryarchaeota		
FCG I	MBG-B* --- "Marine Benthic Group B"	Sedimentos de mar profundo e fontes hidrotermais.
WSA1	RC-1 --- "Rice Cluster 1"	Solos, arrozais
Thermoplasmata E2 --- "Aquatic gp."	DHVEG-1 e 2 --- "Deep Hydrothermal Vent Euryarchaeotic Group" 1 e 2	Fontes hidrotermais, Solos
Thermoplasmata E2 --- "Terrestrial gp."	TMBG --- "Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotic Group"	Sub-superfície, fontes termais terrestres, solos, agrícolas, bio-digestores.
Thermoplasmata E3	MIG III --- "Marine Group III"	Sedimentos de mar profundo
Thermoplasmata E3 --- "Marine gp. II"	MIG II --- "Marine Group II"	Fontes hidrotermais
"Unclassified"	MEG --- "Miscellaneous Euryarchaeotic Group"	Fontes hidrotermais, sedimentos marinhos, solos. Inclui DHVEG-6 --- "Deep Hydrothermal Vent Euryarchaeotic Group B"
.	pMCI	MBGE --- "Marine Benthic Group E" Mar profundo e fontes hidrotermais
.	pMC2	DSBG --- "Deep Sea Euryarchaeotic Group". Fontes hidrotermais, solos. Inclui DHVEG-3 --- "Deep Hydrothermal Vent Euryarchaeotic Group 3"

* O grupo MBG-B aparece anotado com o pertencente a Crenarchaeota mas, no entanto, foi proposto e é citado com o pertencente ao filo Euryarchaeota.

Figura 1- Árvore filogenética do domínio *Archaea* baseada em sequências rRNA 16S depositadas no banco de dados Greengenes (DESANTIS et al., 2006) com grupos nomeados conforme apresentado por esse banco para árvore construída por máxima parcimônia através do programa ARB (LUDWIG et al., 2004). Destacam-se os grupos que apresentam representantes cultivados e a fisiologia daqueles que podem ser considerados indicadores dos diferentes ambientes: Fwc – coluna d’água doce; Mwc – coluna d’água marinha; Hdv – fonte hidrotermal; Fsed – sedimento de água doce; Msed – sedimento de água marinha; S – solo; Hsal – hipersalino.

FONTE: Adaptado de Auguet; Barberan; Casamayor, 2010.

Quanto a ambientes de água doce, verificou-se que o clado nomeado pISA1 (inicialmente encontrado em fontes hidrotermais, pertencente ao clado DHVEG – “Deep Hydrothermal Vent Euryarchaeotic Group”) serve como indicador para a coluna d’água, não sendo tão frequente em amostras de fontes hidrotermais. Não foram encontradas espécies indicadoras para os sedimentos de água doce, mas os grupos I.1a I.1b, além de grupos metanogênicos, são os que aparecerem em maior abundância. O fato de não se ter encontrado uma espécie indicadora, ou seja, especialista, nos sedimentos de água doce pode indicar que a colonização desse ambiente por arqueias seja mais recente que nos demais ambientes (AUGUET; BARBERAN; CASAMAYOR, 2010), mas também pode advir do fato de relativamente poucos estudos terem focado esses sedimentos e pelo estudo das arqueias ser ainda enviesado, pois baseou-se em ambientes extremos e posteriormente em ambientes

marinhos, sendo que são comparativamente poucos os trabalhos realizados em sedimentos de água doce. Grande parte dos estudos ainda é realizada em ambientes extremos embora, devido à preocupação com o aquecimento global, o estudo de arqueias metanogênicas tenha recebido bastante atenção principalmente em arrozais (CONRAD, 2007), no trato digestivo de ruminantes (JANSSEN e KIRS, 2008) e em biodigestores (DEMIRREL e SCHRER, 2008).

3.2.3 Arqueias metanogênicas

Os primeiros trabalhos sobre os micro-organismos responsáveis pela produção do metano datam de 1936 com o isolamento da espécie *Methanobacillus omelianskii* (BARKER, 1936), posteriormente descrita como uma associação simbiótica entre dois micro-organismos. Um mesmo grupo de pesquisa liderou os estudos com metanogênicas por mais de 20 anos e nesse tempo, concluiu-se que, apesar de morfologicamente distintos, os organismos produtores de metano possuíam uma fisiologia em comum (WOLFE, 2006). A caracterização de enzimas do metabolismo metanogênico teve início na década de 70 com a descrição da coenzima M pelo grupo liderado por Wolfe. Esse mesmo grupo forneceu as culturas para o estudo de Carl Woese comparando sequências de rRNA 16S de diferentes grupos microbianos (WOLFE, 2006). Observando as sequências de rRNA 16S obtidas das células metanogênicas, Woese verificou que elas se distanciavam do padrão obtido para as demais bactérias e, no artigo em que propõe o uso da molécula de rRNA 16S como um marcador filogenético (WOESE e FOX, 1977), propõe também a criação de um novo domínio para agrupar as metanogênicas, *Archaeobacteria*, posteriormente *Archaea*, quando maiores evidências sugeriram a aproximação do grupo à linhagem eucariótica (WOLFE, 2006). Em seguida, estudos da composição da parede celular de diversos micro-organismos permitiram a inclusão de espécies não metanogênicas ao domínio *Archaea*, como os gêneros *Halobacterium*, *Sulfolobus* e *Thermoplasma*. Apenas na década de 90 o termo arqueia começou a aparecer em livros-texto, mas ainda hoje esse grupo, bem como a divisão dos seres-vivos em três domínios, não são amplamente conhecidos (WOLFE, 2006).

As arqueias metanogênicas sempre foram de grande interesse para exploração biotecnológica, especialmente na área de saneamento ambiental. As sucessivas crises do petróleo desde 1973 levaram a uma grande procura por formas alternativas de energia, incluindo a recuperação do metano gerado pela digestão anaeróbia de resíduos. Melhoramentos no projeto de digestores só foram possíveis graças a avanços no entendimento

da ecologia e da fisiologia das metanogênicas no campo da veterinária, mais especificamente no conhecimento sobre o processo de fermentação no rúmen (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000). O conhecimento do metabolismo dos micro-organismos anaeróbios possibilitou o desenvolvimento de vários processos e biorreatores para a estabilização da matéria orgânica, com grande ganho para a despoluição ambiental (VAZOLLER, 1996).

A produção do metano é o passo final do fluxo de carbono em vários habitats anaeróbios, incluindo sedimentos marinhos e de água doce, solos alagados, ambientes geotermiais e trato gastrointestinal de animais (ZINDER, 1993; SCHINK, 1997). Sob anaerobiose, a conversão da matéria orgânica a metano ocorre através da cooperação entre diferentes culturas microbianas, cada uma sendo responsável por determinados passos na degradação. Na atividade microbiana anaeróbia nota-se a ocorrência de oxidação de compostos complexos que leva à formação dos precursores do metano, como o acetato e o hidrogênio (Figura 2) (VAZOLLER, 1996). Em ambientes onde a concentração de sulfato é baixa, como sedimentos de água doce (100-200 μm), a metanogênese substitui a redução de sulfato como principal processo final da degradação de matéria orgânica (LIU e WHITMAN, 2008).

Uma característica fisiológica importante das arqueias metanogênicas é sua especialidade catabólica. As metanogênicas podem usar de um a dois substratos como fonte de energia e produção do metano, normalmente o hidrogênio e o dióxido de carbono e/ou substratos de um ou dois carbonos (Tabela 3). Essa característica restritiva ao tipo de substrato traz como consequência a necessidade das metanogênicas viverem em associação com outros organismos que possam degradar compostos maiores a moléculas de um ou dois carbonos. Em contrapartida, as metanogênicas removem metabólitos e o hidrogênio, levando ao favorecimento das reações de fermentação (ZINDER, 1993).

Figura 2- Fluxo de carbono na degradação de matéria orgânica em ambientes anaeróbios. Os números ao lado das setas referem-se ao tipo de micro-organismo responsável pela realização do respectivo passo na degradação: 1- bactérias fermentadoras primárias, 2- fermentadoras acetogênicas, 3- homoacetogênicas, 4- arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, 5- arqueias metanogênicas acetoclásticas

FONTE: Modificado a partir de Demirrel e Schrer, 2008.

<i>Famílias</i>	<i>Substratos utilizados</i>
<i>Methanococcaceae</i> Gênero: <i>Methanococcus</i>	A maioria utiliza H ₂ -CO ₂ e formiato.
<i>Methanobacteriaceae</i> Gêneros: <i>Methanobacterium</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanosphaera</i>	A maioria utiliza apenas H ₂ :CO ₂ . Alguns também utilizam formiato.
<i>Methanomicrobiaceae</i> Gêneros: <i>Methanomicrobium</i> , <i>Methanogenium</i> , <i>Methanoculleus</i> , <i>Methanospirillum</i>	A maioria utiliza H ₂ :CO ₂ e formiato.
<i>Methanosarcinaceae</i> Gêneros: <i>Methanosarcina</i> , <i>Methanococcoides</i> , <i>Methanolobus</i> , <i>Methanohalophilus</i> , <i>Methanosaeta</i>	Todos utilizam metanol e metilaminas; alguns utilizam acetato e H ₂ :CO ₂ . Os gêneros <i>Methanosaeta</i> e <i>Methanosarcina</i> são os únicos grupos conhecidos capazes de utilizar acetato.

Tabela 3- Principais grupos metanogênicos e os substratos energéticos que utilizam.

Figura 3- Resumo das três principais vias metanogênicas. CoM, coenzima M; H₄SPT, tetrahydrosarcinapterina; MF, metanofurano.
FONTE: Galagan et al., 2002.

Dentre as metanogênicas cujo metabolismo é conhecido, apenas membros da família *Methanosarcinaceae* apresentam as três vias metabólicas metanogênicas já descritas – hidrogenotrófica, acetoclástica e metilotrófica (Figura 3) (LIU e WHITMAN, 2008). Esses metabolismos têm diferentes rendimentos energéticos (Tabela 4) e sua ocorrência no ambiente está relacionada à disponibilidade do substrato bem como à competição com outros micro-organismos por esses substratos. Em ambiente marinho, as bactérias redutoras de sulfato são as principais competidoras por acetato e hidrogênio, enquanto em ambientes de água doce as bactérias acetogênicas competem por hidrogênio (CONRAD, 2007).

Tabela 4: Energia livre dos principais metabolismos metanogênicos.

Metabolismo	$\Delta G^{\circ'} \text{ (kJ molCH}_4^{-1}\text{)}$
Hidrogenotrófico	
$4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	- 135
$4 \text{ HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{ CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	- 130
Metilotrófico	
$4 \text{ CH}_3\text{OH} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	- 105
Acetoclástico	
$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-33

FONTE: Adaptado de Liu e Whitman, 2008.

A maioria dos organismos metanogênicos é extremamente sensível ao oxigênio e resistente a alguns antibióticos como penicilina e vancomicina (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000). A identificação de micro-organismos tanto aeróbios quanto anaeróbios requer diversos testes que envolvem a avaliação do metabolismo dos micro-organismos e de suas melhores condições de cultivo, como por exemplo, temperatura e pH. É necessário também avaliar a morfologia celular e o tipo de colônia, bem como o tempo de geração, a composição de lipídeos de membrana e a relação de conteúdo das bases nitrogenadas citosina/guanina do DNA, além de grande massa de células para obtenção de DNA em quantidade e qualidade suficientes para os testes de hibridização DNA-DNA (SHLIMON et al., 2004; DIANOU et al., 2001; SIMANKOVA et al., 2001).

Várias pesquisas em ecologia microbiana de arqueias metanogênicas não resultam no isolamento dos micro-organismos devido às dificuldades do trabalho sob anaerobiose estrita, e grande parte do conhecimento nessa área advém de trabalhos empregando técnicas de biologia molecular. Apesar da importância dessas sequências para estudos de filogenia e biogeografia, elas fornecem pouca informação acerca do metabolismo dos micro-organismos e de seu papel ecológico no ambiente em que foram encontrados. Dado esse cenário, nos últimos anos tem ocorrido uma retomada dos trabalhos clássicos em microbiologia, na tentativa de se isolar novos micro-organismos nos ambientes onde foram encontradas sequências não pertencentes às espécies já descritas. Novas técnicas de cultivo e isolamento vêm sendo empregadas na tentativa de recuperar a diversidade conhecida apenas nos bancos de sequências. No caso das arqueias metanogênicas, o estudo da microbiologia de arrozais revelou em diversos trabalhos (RAMAKRISHNAN et al., 2001; CHIN et al., 2003; CONRAD, 2007) a existência de um grupo específico responsável pela produção de metano nesse ambiente logo após o alagamento dos solos – o “Rice Cluster I” – que não era relacionado proximamente a nenhuma das famílias metanogênicas conhecidas. O primeiro representante isolado desse grupo (SAKAI et al., 2007) foi conseguido empregando-se uma técnica de co-cultura com uma bactéria do gênero *Syntrophobacter*, de forma que o substrato para as metanogênicas foi fornecido em fluxo constante e baixa concentração e dessa forma favoreceu o crescimento da arqueia ainda não isolada em detrimento do crescimento daquelas já conhecidas para esse ambiente e que crescem melhor em altas concentrações do substrato. Estratégia parecida foi empregada com sucesso para a obtenção de novos isolados bacterianos a partir do sedimento de um lago profundo (MÜLLER et al., 2008). Nesse trabalho, diluições

dos sedimentos foram incubadas em placas juntamente com uma cultura de *Methanospirillum hungatei*, responsável por consumir o hidrogênio liberado pelo metabolismo bacteriano. Dessa forma conseguiu-se o isolamento de uma espécie do gênero *Bacillus* ainda não descrita. Porém, o isolamento de micro-organismos ainda não cultivados pode também ser conseguido com uma caracterização detalhada do ambiente amostrado e a adequação de meios de cultura às condições ambientais.

3.3 Emissão de metano no ambiente amazônico

Apesar de ainda serem poucos os estudos envolvendo a ocorrência de arqueias metanogênicas em ambiente amazônico (PAZZINATO, 2007; SANTANA et al., no prelo), sabe-se da importância da emissão de metano de origem biogênica nesse ambiente. Melack et al. (2004) empregaram a combinação de imagens de satélite para avaliar a área total alagada pelos rios Amazonas e Solimões com dados de metano obtidos *in situ* por Devol et al. (1990) na mesma região, nas estações de cheia e de vazante. Dessa forma, os autores puderam extrapolar os dados obtidos localmente para toda a planície alagável amazônica, chegando ao valor de $22 \text{ Tg CH}_4 \text{ ano}^{-1}$, o equivalente a 20% do total estimado de emissão de metano global a partir de terrenos alagados. No entanto, a confiabilidade dessa estimativa depende de mais medidas de emissão *in situ*, dada a heterogeneidade dos sedimentos alagados na Bacia Amazônica.

Também as hidrelétricas construídas em ambiente amazônico representam uma importante fonte de metano para a atmosfera, e os lagos das usinas de Samuel e de Tucuruí foram avaliados quanto a essa emissão. Considerando-se apenas as emissões medidas na superfície do reservatório, o lago de Tucuruí emite cerca de $35 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ por difusão, enquanto o lago de Samuel emite cerca de $130 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (ROSA et al., 2002; LIMA, 2005). Considerando-se o metano emitido para a atmosfera por bolhas, ou na passagem da água pelas turbinas, esses valores podem ser até quatro vezes maiores (FEARNSIDE, 2002). O principal fator responsável pela diferença de emissão entre esses dois reservatórios é a profundidade, sendo que o lago de Samuel tem em média 6 m e o lago de Tucuruí, cerca de 20 m, possuindo, portanto, uma maior coluna d'água, onde ocorre a oxidação do metano por bactérias metanotróficas (LIMA, 2005). Esses valores revelam a importância global do estudo da produção, consumo e emissão de metano no ambiente amazônico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição da área de estudo

O estado de Rondônia possui uma área de 243.044 km² e é parte da Amazônia Legal Brasileira. Localizado na Amazônia Ocidental, entre os paralelos de 7° 58' e 13° 43' de latitude Sul e entre os meridianos de 59° 50' e 66° 48' de longitude Oeste, o estado não sofre grandes influências do mar ou da altitude. Segundo a classificação de Köppen, Rondônia possui um clima do tipo Aw - Clima Tropical Chuvoso, com média climatológica da temperatura do ar durante o mês mais frio superior a 18 °C (megatérmico), e um período seco bem definido durante o inverno, com índices pluviométricos inferiores a 50 mm ao mês. É nessa estação de inverno que o clima apresenta grande amplitude térmica diurna, sendo que a amplitude térmica é insignificante ao longo do ano (RONDÔNIA, 2003). A média anual da precipitação pluvial varia de 1.400 a 2.750 mm, enquanto a média anual da temperatura do ar varia de 24 a 29 °C e a umidade do ar é cerca de 85% (MORTATTI et al., 1989; RONDÔNIA, 2003). O relevo pode ser classificado como levemente ondulado ou plano, sendo que o norte do estado está ligado à planície Amazônica, com grandes áreas alagáveis. A floresta Amazônica tropical úmida com árvores altas predomina no estado, mas muitas áreas de transição são observadas devido ao intensivo desmatamento que vem ocorrendo na região (MORTATTI et al., 1989). A figura 4 apresenta a hidrografia do estado, destacando os pontos em que foram feitas as amostragens no rio Madeira (seta azul) em 2002 e no rio Floresta (seta vermelha) em 2006.

4.1.1 Descrição do rio Madeira

A bacia hidrográfica do Rio Madeira tem uma área total de aproximadamente 1,52 milhões de km², o que compõe cerca de 24% da bacia Amazônica. O rio Madeira (Figuras 5 e 6) é, portanto, um dos principais tributários do rio Amazonas, possuindo 1459 km de extensão em território brasileiro e vazão média de 23000 m³s⁻¹. Essa grande vazão é responsável por transportar cerca de 40 x 10⁶ t de sólidos em suspensão por ano até o rio Amazonas, o equivalente a 35% da carga sólida despejada anualmente por esse rio no Oceano Atlântico (BERNARDI et al., 2009).

Figura 4- Mapa apresentando hidrografia do estado de Rondônia com destaque aos pontos de coleta no rio Madeira (seta azul) e no rio Floresta (seta vermelha).
 FONTE: BRASIL, 2009.

O rio Madeira é classificado como um rio de águas brancas, rico em material dissolvido e particulado e com transparência média variando entre 10 e 50 cm (SIOLI, 1967³ apud GOMES et al., 2009).

No ano de 2002, quando que foi realizada a coleta nesse rio, a temperatura média próxima ao ponto de coleta, no mês de novembro, foi de 26,06 °C, com máxima de 35,11 °C e mínima de 21,02 °C. A umidade relativa média foi de 85,16% e a precipitação total foi de 192,76 mm. No período de setembro a maio houve um excedente hídrico de 1128,8 mm nas proximidades de Porto Velho (RONDÔNIA, 2003).

³ SIOLI, H. Hydrochemistry and geology in the Brazilian Amazon region. **Amazoniana**, v. 1, p. 267-277, 1967.

Figura 5- Imagem de satélite mostrando em detalhe o ponto de coleta no rio Madeira, a montante da cidade de Porto Velho e do recebimento das águas do rio Jamari, principal tributário do rio Madeira.

FONTE: Imagem obtida através do “software” Google Earth®.

Figura 6- Vista do rio Madeira, próximo ao ponto de coleta.

FONTE: Imagem da autora.

4.1.2 Descrição do rio Floresta

O rio Floresta (Figuras 7 e 8) nasce na serra dos Pacaás Novos e compõe a micro-bacia do rio Machado, parte da Bacia do rio Jamari, principal tributário do Rio Madeira. O rio passa por região relativamente preservada no estado, sendo que o principal impacto antrópico dessa região advém da extração de cassiterita. Apesar de suas margens com mata ciliar ainda preservada no ponto em que foi amostrado, as cidades de Monte Negro e Ariquemes,

próximas ao ponto de coleta, estão entre as que apresentam maiores índices de desmatamento dentre as cidades que compõem o Vale do Jamari, do qual o rio Floresta faz parte (BRASIL, 2006). No ponto amostrado, o rio delimita um dos lados da reserva indígena dos Uru-Eu-Wau-Wau, palco de recentes invasões e lutas pela terra (KANINDÉ, 2003).

Figura 7- Imagem de satélite mostrando em detalhe o ponto de coleta no rio Floresta, pequeno afluente do rio Jamari. O local foi escolhido pelo bom estado de preservação das margens desse rio e pela facilidade de acesso a partir da cidade de Monte Negro, onde está situado o campus avançado ICB V.

FONTE: Imagem obtida através do “software” Google Earth[®].

Figura 8- Vista do rio Floresta, no ponto de coleta.

FONTE: Imagem da autora.

A escolha desse rio se deu pela facilidade de acesso a partir do ICB V, localizado na cidade de Monte Negro, e pelo interesse em se pesquisar um rio menos afetado por atividades antrópicas, em uma região mais preservada do estado.

No ano de 2006, quando foi realizada a coleta nesse rio, a temperatura média próxima ao ponto de coleta, no mês de novembro, foi de 25,9 °C, com máxima de 34 °C e mínima de 19,9 °C. A umidade relativa média para todo o estado foi de 83% e a precipitação total próxima ao ponto de coleta foi de 189,5 mm ao longo do mês de novembro. A localidade de Ariquemes, relativamente próxima ao ponto amostrado, apresentou um longo período de déficit hídrico e seu excedente – de 1151,1 mm – ocorreu apenas entre novembro e abril (BRASIL, 2006).

4.2 Amostragem

As amostras de sedimento coletadas nos rios Madeira e Floresta, para ensaios de biologia molecular e para cultivo de metanogênicas, foram transportadas em gelo do local de coleta (Rondônia) até o local de processamento (São Paulo), sendo que as amostras para biologia molecular foram previamente congeladas. A tabela 5 resume as informações de cada coleta, detalhadamente descritas nos itens 4.2.1 e 4.2.2.

Tabela 5- Informações sobre a coleta das amostras de sedimento empregadas no presente trabalho.

<i>Rio</i>	<i>Localização</i>	<i>Data</i>	<i>Método</i>	<i>Medidas F-Q in situ</i> ¹
Madeira	S 08° 33' 17,0"	14/11/02	Espátulas	Não
	W 063° 33' 14,6"			
Floresta	S 10° 28,311'	02/11/06	Testemunhador manual	Sim
	W 063° 15,960'			

¹F-Q: análises físico-químicas feitas *in situ* empregando-se sonda multiparâmetros (ver item 4.2.2)

4.2.1 Coleta no rio Madeira

A coleta no Rio Madeira foi realizada em 2002, durante uma expedição organizada pelo ICB V, na cidade de Monte Negro - Rondônia, que percorreu alguns rios da Bacia Amazônica para a realização de diversos trabalhos de pesquisa e atendimento médico-odontológico a populações ribeirinhas.

As coletas de sedimento foram realizadas próximas às margens, devido às dificuldades encontradas para transporte de equipamento que permitisse coletar o sedimento no meio do

rio, abaixo da coluna d'água (com mais de 1 m de altura). A coleta realizada no rio Madeira foi feita manualmente com espátulas estéreis e o sedimento foi imediatamente transferido para frascos de 500 mL estéreis até seu completo preenchimento. Os frascos foram vedados para minimizar o contato com ar atmosférico, permitindo a recuperação de micro-organismos anaeróbios em laboratório.

A parte do sedimento destinada aos ensaios com técnicas de biologia molecular foi transferida para sacos plásticos estéreis, resfriada no campo e posteriormente congelada para armazenamento. O restante dessa mesma amostra foi empregado para análises de matéria orgânica, análise elementar (C, N, H) e granulometria.

4.2.2 Coleta no rio Floresta

A coleta desse sedimento foi realizada empregando-se um testemunhador manual, o qual consiste num cilindro de aço inox aberto nas duas extremidades, que depois de inserido no sedimento é fechado na extremidade inferior por uma pá que desliza cortando o sedimento na profundidade amostrada e na superior por uma tampa de PVC, de tal forma que o cilindro possa ser retirado do sedimento sem perder o conteúdo com que foi preenchido. O testemunho retirado do sedimento foi sub-amostrado com seringas de 60 mL empregadas como testemunhadores e vedadas pelo êmbolo e por uma válvula de 3 vias encaixada ao bico.

Parte do sedimento coletado foi transferida para sacos plásticos estéreis, resfriada e posteriormente congelada. Essas amostras foram empregadas para os estudos moleculares microbianos e também para as análises de DQO (demanda química de oxigênio), amônia e STV (sólidos totais dissolvidos), matéria orgânica, análise elementar (C, N, S) e granulometria. Foram também mensurados pH, temperatura, salinidade e condutividade nesse local de coleta.

No momento da coleta no Rio Floresta foram determinados condutividade, salinidade, pH, temperatura, oxigênio dissolvido e potencial de óxido-redução empregando-se uma sonda multiparâmetros (YSI 556 MPS).

4.3 Determinações físico-químicas

As análises de demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais dissolvidos e amônia foram realizadas no Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos, baseadas em métodos descritos no “Standard Methods for the Examination of

Water and Wastewater” (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION - AWWA; WATER ENVIRONMENT FEDERATION - WEF, 1995).

As análises granulométricas foram processadas em laboratório e seguindo o método descrito por Suguio (1973), detalhado a seguir. O sedimento foi seco em estufa a 50 °C e 50 g foram pesadas para as análises granulométricas. Em seguida, a matéria orgânica contida na amostra foi eliminada através de tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) diluído a 10 % e o carbonato de cálcio foi, por sua vez, eliminado com ácido clorídrico (HCl) diluído a 10 %.

Foi realizado o peneiramento úmido (em peneira de malha 62 μm) e o material retido foi seco em estufa, pesado e peneirado constituindo-se a fração mais grossa. Esse sedimento foi separado utilizando-se um jogo de peneiras da marca Granutest com malhas de 2.000 μm a 62 μm , com intervalos de 500 μm em um peneirador RO - TAP[®].

A fração fina (< 62 μm) foi colocada em suspensão com água destilada, em proveta graduada de 1000 ml. Para evitar a floculação, adicionou-se 1 g de pirofosfato de sódio ($Na_4P_2O_7$), seguindo-se então, a pipetagem do material. Este método de pipetagem baseia-se na Lei de Stokes, que tem como princípio básico a velocidade de decantação das partículas.

4.3.1 Concentração de matéria orgânica e carbonato de cálcio

A determinação da concentração de matéria orgânica foi realizada anteriormente à granulometria e obtida através da diferença do peso inicial com o peso final (amostra tratada com H_2O_2 , ou seja, sem a matéria orgânica). A determinação da concentração de carbonato de cálcio foi realizada da mesma forma, por meio da diferença do peso inicial com o peso final (amostra tratada com HCl).

4.3.2 Concentração de carbono orgânico

A determinação das concentrações de carbono orgânico (Corg) foram feitas tratando inicialmente as amostras com ácido clorídrico (HCl) diluído à 10 % para eliminação do carbonato de cálcio (carbono inorgânico existente), sendo que posteriormente o material foi pesado e 5 mg foram levadas para a análise.

As análises foram realizadas no Laboratório de Análise Elemental da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O equipamento utilizado para essas

análises, o Elemental Analyzer 2400 CHN-Perkin Elmer® é um instrumento utilizado para micro e semi-micro determinações de carbono total, hidrogênio e nitrogênio presentes em amostras de natureza inorgânica e orgânica. O método analítico original é baseado na completa oxidação das amostras, o que converte todos os elementos, sejam orgânicos ou inorgânicos, em produtos da combustão (CO_2 , H_2O , NO_2 , N_2O_2). A mistura desses gases passa por um tubo de cobre (Cu) para remoção do excesso de oxigênio (O_2) e para a redução de alguns óxidos de nitrogênio para nitrogênio puro (N_2).

O resultado dessa mistura é direcionado para uma coluna cromatográfica onde os componentes são separados como nitrogênio (N_2), dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O), os quais passam por um detector de condutividade térmica, que gera um sinal correspondente às concentrações de cada elemento presente na amostra.

4.4 Fluxogramas de trabalho

As figuras 9 e 10 apresentam os fluxogramas dos experimentos realizados para cada uma das amostras coletadas. Os procedimentos experimentais estão descritos nos itens subsequentes.

Figura 9- Sequência dos experimentos realizados com amostras de sedimento coletadas no Rio Madeira.

Figura 10- Sequência dos experimentos realizados com amostras de sedimento coletadas no Rio Floresta.

4.5 Extração de DNA total a partir dos sedimentos

O sedimento coletado para análises moleculares foi levado ao laboratório e aliqotado em porções de 0,5 g que foram congeladas e mantidas a -20 °C do momento em que chegaram ao laboratório até o processamento. As extrações foram realizadas em triplicata empregando-se FastDNA SPIN Kit for Soil (Q-Biogene, EUA). Cada réplica de 0,5 g foi adicionada a um tubo contendo a matriz de lise (partículas de sílica e cerâmica), ao qual foram adicionados posteriormente os tampões de lise. Os tubos foram vigorosamente agitados no equipamento FastPrep (Q-Biogene, EUA) por 30 s na velocidade 5.5 e, após esse tempo os tubos foram centrifugados a 13500 rpm por 3 minutos, a fim de remover a matriz de lise e restos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado o reagente PPS, para limpeza do DNA. Esse tubo foi homogeneizado manualmente e posteriormente centrifugado a 13.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante dessa centrifugação foi transferido para um tubo limpo, ao qual foi adicionada uma suspensão de uma matriz que se liga ao DNA. Esse tubo foi homogeneizado manualmente por 2 minutos para completa ligação do DNA à matriz, sem danificar a molécula. Após a mistura, deixou-se o tubo parado por 3 minutos, para sedimentação da matriz de sílica. Descartou-se aproximadamente metade do sobrenadante, evitando-se a remoção da matriz, onde o DNA estava ligado. O restante do sobrenadante foi utilizado para ressuspender a matriz e transferi-la para um filtro acoplado a

um tubo. O conjunto foi centrifugado a 13500 rpm por 1 minuto e então foi adicionado o tampão de lavagem (SEWS-M) e uma nova centrifugação foi realizada por mais 1 minuto. Para garantir a remoção total do tampão, o conjunto foi centrifugado por mais 2 minutos e então o filtro foi transferido para um novo tubo. Deixou-se o tubo secar em temperatura ambiente e posteriormente adicionou-se 50 µL de água livre de DNase para resuspende a matriz. Essa mistura foi homogeneizada e centrifugada por 1 minuto a fim de recuperar no tubo o DNA que estava ligado à matriz. O DNA extraído foi quantificado através do aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, EUA) e avaliou-se a qualidade do DNA extraído em gel de agarose 2%.

4.6 Amplificação do gene rRNA 16S de arqueias a partir do DNA extraído do sedimento

As triplicatas da extração foram reunidas e amplificou-se, também em triplicata, o fragmento do gene rRNA 16S com os iniciadores específicos para o domínio *Archaea*: 109f (ACK GCT CAG TAA CAC GT) e 915r (GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT) (GROSSKOPF et al., 1998a). A reação em cadeia da polimerase foi iniciada com uma etapa de desnaturação a 94 °C por 5 minutos seguida por 30 ciclos de anelamento a 52 °C por 60 segundos, extensão a 72 °C por 90 segundos e desnaturação a 94 °C por 60 segundos; ao final dos ciclos foi determinada uma etapa final de anelamento a 52 °C por 60 segundos e uma etapa de extensão final a 72 °C por 6 minutos. As reações foram preparadas contendo 1,5 mM de MgCl₂, 0,8 mM de DNTP, 0,3 µM de cada iniciador, 0,5 U da enzima Taq polimerase (Invitrogen, EUA). As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Alemanha). O anexo C apresenta todos os iniciadores e sondas empregados nesse trabalho.

4.7 Purificação dos produtos da amplificação

As triplicatas dos produtos amplificados foram agrupadas e purificadas empregando-se o PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen, EUA). O conjunto consiste em um tubo com membrana acoplado a um tubo para coleta do material que passa pela membrana. Inicialmente misturou-se o produto a ser purificado ao tampão de ligação (quatro vezes o volume do produto) e transferiu-se essa mistura para a membrana. O conjunto foi centrifugado a 12000 rpm por 30s. O tampão que passa pela membrana foi descartado e adicionou-se sobre a

membrana 500 μ L de tampão de lavagem. O conjunto foi então centrifugado a 12000 rpm por 30s por duas vezes e ainda uma terceira vez, por 2 minutos, para total remoção do tampão de lavagem. Então transferiu-se o tubo com membrana para um novo tubo coletor e procedeu-se a eluição do DNA adicionando-se 100 μ L do tampão de eluição e, após 1 minuto para absorção do tampão pela membrana, o conjunto foi centrifugado por 1,5 minuto à máxima velocidade, ficando então o DNA no tubo coletor. Os produtos de PCR purificados foram quantificados no equipamento Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, EUA).

4.8 Construção de bibliotecas do gene rRNA 16S a partir do DNA total extraído dos sedimentos

Para construção da biblioteca de clones utilizou-se o pGEM-T Easy Vector (Promega, EUA) e células termo-competentes JM109 (Promega, EUA).

A reação de ligação foi realizada empregando-se a proporção de 2:1 para a relação inserto:vetor e foi incubada a 4 °C por 18 horas. A transformação das células foi realizada por choque térmico em banho-seco Thermomix compact (Eppendorf, Alemanha) a 42 °C por 45 segundos, sendo imediatamente transferidas para banho de gelo, onde foram incubadas por 2 minutos. As células transformadas foram transferidas para 950 μ L de meio SOC (triptona, 2%; extrato de levedura, 0,5%; NaCl, 10 mM; KCl, 2,5 mM; Mg⁺₂, 20 mM; glicose, 2,5 mM), onde foram incubadas por 1,5 h a 37 °C com agitação de 150 rpm.

A seleção dos clones contendo o fragmento de interesse foi feita por transferência das células crescidas para ágar LB (triptona, 1%; extrato de levedura, 0,5%; NaCl, 0,5%; ágar bacteriológico, 1,5%; água destilada, q.s.p. 1L) contendo de ampicilina, 100 mg mL⁻¹; IPTG 100 mM, 100 μ L por placa e X-Gal 50 mg mL⁻¹, 20 μ L por placa. As colônias brancas foram transferidas para nova placa a fim de se verificar se realmente continham o vetor e o inserto. Aquelas que continuaram brancas nessa nova placa foram diretamente transferidas para o tubo de reação de amplificação com iniciadores do vetor.

Amplificou-se o vetor dos clones transformados com os iniciadores M13f (GTT TTC CCA GTC ACG AC) e M13r (CAG GAA ACA GCT ATG AC) (Promega, EUA), em reação contendo 1,7 mM de MgCl₂, 0,3 mM de DNTP, 0,3 μ M de cada iniciador, 1 U da enzima Taq polimerase (Invitrogen, EUA). A reação, realizada no termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Alemanha), consistiu de uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de anelamento a 50 °C por 2 minutos, extensão a 72 °C por 5 minutos e

desnaturação a 94 °C por 2 minutos, com uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 minutos. O sequenciamento dos fragmentos foi realizado com o iniciador T7 (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) (Promega, EUA), no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP.

4.9 Análise filogenética e índices de diversidade das sequências obtidas

As sequências obtidas foram manualmente editadas e alinhadas através do programa BioEdit 7.0.9.0 (HALL, 1999). A checagem de quimeras e outros artefatos da amplificação foi feita através dos programas Bellerophon (HUBER; FAULKNER; HUGENHOLTZ, 2004) e Mallard (ASHELFORD et al., 2006), utilizando uma sequência de *Thermoprotei* sp. como modelo e com limite de confiança de 99,9%. A construção das árvores filogenéticas foi feita através do programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2008), utilizando-se o algoritmo de “Neighbor-Joining” (SAITOU e NEI, 1987) e fator de correção de Jukes-Cantor. Para compor a árvore foram selecionadas sequências disponíveis nos banco de dados do RDP II (COLE et al., 2008) e do GenBank (BENSON et al., 2008), escolhidas por sua similaridade às sequências desse trabalho, além de sequências de referência para verificar a topologia da árvore. Sequências similares foram obtidas através da ferramenta BLAST dos referidos bancos de dados.

A análise de cobertura das bibliotecas, bem como os índices de diversidade apresentados, foram calculados pelo programa Dotur (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2005) a partir das sequências alinhadas. A comparação entre as duas bibliotecas foi realizada através do programa Unifrac (LOZUPONE e KNIGHT, 2005).

4.10 Cultivos para enriquecimento e isolamento de arqueias metanogênicas

Toda manipulação das amostras e culturas foi realizada empregando-se o Sistema de Distribuição Simultânea de Gases (Figura 11), de modo a minimizar ou evitar o contato das células com oxigênio atmosférico.

Figura 11- Sistema de distribuição simultânea de gases empregado para manipulação de micro-organismos anaeróbios estritos.

Os cultivos visando enriquecimento e isolamento de arqueias metanogênicas foram realizados em meio de cultura descrito por Zinder e Koch (1984) adaptado por Vazoller (1995), contendo NH_4Cl , 10 mM; KH_2PO_4 , 3 mM; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,3 mM; resazurina (0,1% m/v), 1% v/v e solução traço de metais (Anexo A, VAZOLLER, 1995), 10% v/v. A esse meio basal foram adicionadas soluções de fontes de carbono, de tamponamento, vitaminas (Anexo A, TOUZEL e ALBAGNAC, 1983; adaptado por VAZOLLER, 1995) e de redução do meio, conforme descrito na tabela 6.

A composição e modo de preparo das soluções descritas na tabela 6 encontram-se detalhadamente descritos no anexo A. A adição dessas soluções aos meios de cultura variou de acordo com o objetivo do experimento. Nos enriquecimentos – etapas (1) e (2) da figura 7 e etapa (1) da figura 8 – todas as fontes de carbono foram empregadas simultaneamente. Nas fases de isolamento – etapas (3), (4) e (5) da figura 7 – optou-se por adicionar apenas uma das fontes de carbono em cada cultivo. O antibiótico vancomicina e a solução de extrato de levedura foram utilizados apenas nas etapas de isolamento.

Os frascos de cultivo foram fechados e mantidos sob atmosfera de mistura gasosa $\text{H}_2:\text{CO}_2$ (80:20), que é também um substrato energético e fonte de carbono para a grande maioria das arqueias metanogênicas.

Para o isolamento foram também realizados cultivos em meio sólido empregando a técnica de “roll-tube” (BALCH et al., 1979). Ao meio acima descrito foram adicionados 0,2% de ágar bacteriológico. A inoculação foi feita com o meio ainda fundido, e o tubo vedado contendo meio e inóculo foi girado em um recipiente com gelo para que o ágar se solidificasse formando uma película na parede interna do tubo, fornecendo suporte para o crescimento de colônias.

Tabela 6- Soluções adicionadas ao meio de cultura para enriquecimento e isolamento de arqueias metanogênicas.

<i>Solução</i>	<i>[] estoque</i>	<i>[] no meio</i>
Solução tampão	NaHCO ₃ 10 %	0,1 %
Solução de vitaminas		-
Formiato de sódio*	2 M	0,02 M
Acetato de sódio*	2 M	0,02 M
Metanol*	2 M	0,02 M
Extrato de levedura*	2 %	0,02 %
Vancomicina*	0,1 %	0,001 %
Solução redutora	Na ₂ S 5 %	0,05 % (6,4 mM)
Inóculo	-	-
Volume final	-	-

* A adição dessas soluções variou de acordo com o objetivo da cultura. Para enriquecimento, todas as fontes de carbono foram empregadas simultaneamente. Nas etapas de isolamento optou-se por adicionar apenas uma das fontes de carbono em cada cultivo. O antibiótico vancomicina e a solução de extrato de levedura também foram utilizados apenas na etapa de isolamento.

4.11 Avaliação do crescimento de arqueias metanogênicas

O crescimento microbiano foi analisado visualmente, observando-se a turbidez em meio líquido ou o crescimento de colônias em meio sólido. A confirmação da ocorrência de células metanogênicas nos cultivos foi feita analisando-se a porcentagem de gás metano na atmosfera do frasco, através de cromatografia gasosa com detector FID (Agilent GC-6850) com gás de arraste N₂. As análises cromatográficas foram a 40 °C, por 3 minutos, sendo o tempo de retenção do metano por volta de 1,3 minutos. As amostras foram retiradas dos frascos de cultivo com seringa “gas tight” acoplada à agulha que foi flambada ao rubro entre as retiradas de amostra. O volume de injeção foi de 100 µL.

A ocorrência de células metanogênicas foi também confirmada pela observação de células autofluorescentes em microscopia de fluorescência (Zeiss – Axiovert S100 com câmera Hamamatsu CCD), uma vez que a coenzima f420, presente em todas as metanogênicas, fluoresce quando estimulada com luz ultravioleta.

4.12 Detecção de arqueias metanogênicas por hibridização fluorescente *in situ*

Nos primeiros enriquecimentos feitos com o sedimento do Rio Madeira (Etapa 1, Figura 7) aplicou-se a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para identificação das famílias de metanogênicas encontradas.

A fixação das células, adaptada por Araújo, 2001 a partir de Raskin et al., 1994a, foi realizada em tampão fosfato salino - PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄; pH 7,2) adicionado de paraformaldeído 4% m/v e NaOH 10 N 0,3%. Empregaram-se as sondas MSMX860, MC1109, MB310 e MG1200, específicas, respectivamente, para as famílias *Methanosarcinaceae*, *Methanococcace*, *Methanobacteriaceae* e *Methanomicrobiaceae* (RASKIN et al., 1994a). A hibridização em lâmina e a lavagem se deram como especificadas em Raskin et al., 1994b.

Após realização do FISH, as lâminas foram coradas com solução DAPI (4', 6-diamidino-2-fenil indol) 0,1%. Observaram-se as lâminas em microscópio de fluorescência (Zeiss – Axiovert S100 com câmera Hamamatsu CCD) equipado com filtro para transmissão na região do azul, UG-1– para observação das células coradas com DAPI – e do vermelho, BP-545 – para observação das células hibridizadas com as sondas, uma vez que essas eram marcadas com rodamina, um fluoróforo com emissão na região do vermelho. O protocolo detalhado dessa técnica encontra-se no anexo B.

4.13 Identificação molecular de arqueias cultivadas

A identificação dos micro-organismos cultivados foi feita através de sequenciamento de fragmento do gene para a subunidade 16S do RNA ribossomal. A extração do DNA a partir dos cultivos foi feita conforme protocolo descrito por Massana (1997), modificado por Piza (2004). Partiu-se de 2 mL de culturas bastante crescidas, que foram então centrifugados a 13000 rpm por 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ao precipitado foram adicionados 900 µL de tampão de lise (EDTA, 40 mM; tris.HCl pH 8, 50 mM; sacarose, 0,75 M). As células foram ressuspendidas no tampão e adicionou-se lisozima em concentração final de 1 mg mL⁻¹. Os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos. Ao final desse tempo de incubação, foram adicionados SDS – concentração final de 1% – e proteinase K – concentração final de 0,5 mg mL⁻¹ – e nova incubação foi realizada, a 55 °C por 2 horas. A separação do DNA foi feita com 2 lavagens com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e uma lavagem com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Cada lavagem consistiu

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

As reações de amplificação do gene para o rRNA 16S de arqueias foram feitas empregando-se os iniciadores 344f (ACG GGG YGC AGC AGG CGC GA) (BENLLOCH et al., 2002) e 1400r (CGG CGA CTT CGT GCA AGG AGC AGG GAC) (KUDO et al., 1997).

A reação em cadeia da polimerase foi iniciada com uma etapa de desnaturação a 94 °C por 5 minutos seguida por 35 ciclos de anelamento a 59 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2 minutos e desnaturação a 94 °C por 1 minuto; ao final dos ciclos foi determinada uma etapa final de extensão a 72 °C por 7 minutos. As reações foram preparadas contendo 2,5 mM de MgCl₂, 0,8 mM de DNTP, 0,2 µm de cada iniciador e 0,5 U da enzima Taq polimerase (Invitrogen, EUA). As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Alemanha).

Além de reações empregando o DNA extraído de cultivos em meio líquido, foram feitas amplificações nas quais colônias crescidas em “roll-tubes” foram transferidas diretamente para os tubos de reação, sem que houvesse extração de DNA (Etapa 4, figura 7).

4.13.1 Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA)

Para seleção do material a ser sequenciado aplicou-se análise de restrição dos fragmentos do rRNA 16S amplificados (ARDRA) com as enzimas *Hae*III e *Hha*I (New England Biolabs, EUA) (WRIGHT e PIMM, 2003):

- *Hae*III: 5' ... G G⁻C C... 3'
 3' ...C C⁻G G... 5'

- *Hha*I: 5' ... G C G⁻C... 3'
 3' ...C⁻G C G... 5'

Os amplicons com cerca de 1300 pb foram adicionados a um tubo de reação contendo a enzima de interesse e o tampão recomendado pelo fabricante. A reação foi mantida a 37 °C por 2,5 horas e, posteriormente, os amplicons digeridos foram submetidos a eletroforese em

gel de agarose a 4% (g/V), que foi corado com brometo de etídeo para observação dos padrões de restrição.

4.13.2 Sequenciamento dos fragmentos de interesse

Para os sequenciamentos empregaram-se os iniciadores 344f (ACG GGG YGC AGC AGG CGC GA) (BENLLOCH et al., 2002) e 1400r (CGG CGA ATT CGT GCA AGG AGC AGG GAC) (KUDO et al., 1997). As reações de sequenciamento foram feitas no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP. A análise e edição das sequências, bem como a construção de um fragmento maior a partir dos sequenciamentos obtidos foram realizados através do programa BioEdit 7.0.9.0 (HALL, 1999). As árvores filogenéticas foram construídas através do programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2008), conforme detalhado no item 4.9.

4.14 Identificação de bactérias associadas aos cultivos metanogênicos

A fim de se identificar as bactérias associadas aos cultivos metanogênicos em meio líquido, procedeu-se a amplificação do gene para o RNA ribossomal 16S com os iniciadores 27f (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) (HEUER et al., 1997) e 1401r (CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG) (HEUER et al., 1997) a partir do mesmo DNA extraído para amplificação do rRNA 16S de arqueias. A reação de amplificação do consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos seguido por 35 ciclos de anelamento a 55 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 90 segundos e desnaturação a 94 °C por 30 segundos; ao final dos ciclos foi determinada uma etapa final de extensão a 72 °C por 7 minutos. As reações foram preparadas contendo 1,5 mM de MgCl₂, 0,8 mM de DNTP, 0,2 µM de cada iniciador, 1U da enzima Taq polimerase (Invitrogen, EUA). As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Alemanha). Os produtos amplificados foram purificados como descrito no item 4.7 e sequenciados com o iniciador 27f pelo Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP. As sequências foram editadas pelo programa BioEdit 7.0.9.0 (HALL, 1999) e comparadas às sequências depositadas nos bancos de dados RDP II (COLE et al., 2008) e do GenBank (BENSON et al., 2008) através da ferramenta BLAST disponível nesses bancos de dados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química

Os rios amostrados, no momento e local da coleta, apresentaram águas com pH próximo ao neutro e bastante oxigenadas (Tabela 7). Essas características são compatíveis com a classificação desses rios como sendo de águas brancas (PATEL et al., 1999).

Tabela 7- Parâmetros físico-químicos da coluna d'água dos rios Floresta e Madeira.

Rio	T (°C)	pH	OD (%)	POR (mV)
Floresta	28,6	6,17	72,7	180,9
Madeira*	31,2±2,9	6,5	66±8	-

T: temperatura; OD: oxigênio dissolvido; POR: potencial de óxido-redução;

* FONTE: Bernardi et al., 2009.

Os sedimentos desses rios apresentaram valores muito baixos de matéria orgânica, de carbono orgânico total e nitrogênio total (Tabela 8) – respectivamente 4,38%, 0,07% e 0% para o rio Floresta, e 5,03%, 0,44% e 0,05% para o rio Madeira. Esses valores são característicos de sedimentos fluviais minerais – não orgânicos – e condizem com as análises granulométricas, que revelaram que os sedimentos são arenosos ou silte-arenosos (FURLAN e CALIJURI, 2008). O sedimento do rio Madeira apresenta granulometria mais fina e concentrações levemente maiores de matéria orgânica. Valores comparativamente baixos de carbono orgânico também já foram detectados em outros rios tropicais – 0,09% no rio Pahang, Malásia (KAMARUZZAMAN et al., 2009), em rios de ambientes temperados – 1,06% no rio Hudson, Nova York (FENG et al., 1998) e subtropicais – 2,3% no rio Ortega, Flórida (OUYANG et al., 2006), 0,61% no rio Pearl, China (JIA e PENG, 2003). A baixa concentração de matéria orgânica do sedimento condiz com os baixos valores de DQO e STV determinados para a amostra do rio Floresta. Essas análises não foram realizadas com os sedimentos do rio Madeira devido ao longo tempo em que essa amostra ficou armazenada fora das condições ideais para realização dessas medidas.

Em todos os trabalhos citados acima foi observada uma forte influência da sazonalidade na concentração de matéria orgânica nos sedimentos. Portanto, os dados

apresentados nesse trabalho devem ser discutidos com cautela, uma vez que refletem uma situação pontual encontrada no momento da coleta.

Tabela 8- Parâmetros físico-químicos dos sedimentos dos rios Floresta e Madeira.

Rio	Floresta	Madeira
Granulometria (SHEPARD, 1954)	Areia	Silte arenoso
% seixos	0,00	0,00
% grânulos	0,10	0,00
% areia	99,69	15,84
% silte	0,21	71,49
% argila	0,00	12,67
Classificação de Folk e Ward (1957)	Moderadamente selecionado	Pobrememente selecionado
Matéria orgânica %	4,38	5,03
Corg %	0,07	0,44
H %	0,03	0,43
N %	0,00	0,05
STV (g gsed⁻¹)	4,0526	NR
NH₄⁺ (µg gsed⁻¹)	16,6	NR
DQO (mg L⁻¹)	0,318	NR

Corg: carbono orgânico; H: hidrogênio; N: nitrogênio; STV: sólidos totais voláteis; DQO: demanda química de oxigênio; NR – análise não realizada.

5.2 Biblioteca do gene rRNA 16S a partir do sedimento do rio Floresta

Dentre os 96 clones sequenciados, 26 foram excluídos por apresentarem sequências de má qualidade ou serem quimeras, de acordo com os resultados das análises dos programas Bellerophon e Mallard. Vinte e dois clones, dos 70 restantes, foram semelhantes a representantes do reino *Euryarchaeota* enquanto 48 foram afiliados ao reino *Crenarchaeota*. Apenas um dos clones teve maior similaridade com uma espécie já cultivada – *Methanosarcina mazei* – sendo que o restante dos clones se relacionou mais proximamente a arqueias ainda não cultivadas.

As técnicas empregadas nesse trabalho não permitiram a quantificação dos diferentes grupos de arqueias, mas a predominância de clones afiliados a um ou outro reino permite inferir qual grupo é majoritário na amostra, uma vez que os iniciadores empregados sejam universais. Assim como detectado nesse trabalho, a predominância de representantes do reino *Crenarchaeota* dentre as arqueias foi também verificada em outros ambientes terrestres, como sedimentos de água doce (UTSUMI et al., 2003; RASTOGI et al., 2009), em pântanos salgados (NELSON; MOIN; BERNHARD, 2009) e em solos de floresta temperada (KEMNITZ; KOLB; CONRAD, 2007).

5.2.1 Clones obtidos do sedimento do rio Floresta afiliados ao reino *Euryarchaeota*

Além do clone relacionado ao gênero *Methanosarcina*, metade (11) dos clones pertencentes ao reino *Euryarchaeota* puderam ser classificados dentro de famílias de arqueias metanogênicas (Figura 12). Um clone afiliou-se à família *Methanobacteriaceae* e 8 clones à família *Methanomicrobiaceae*, sendo 4 deles relacionados ao subgrupo E1, do qual recentemente se obteve o primeiro isolado (CADILLO-QUIROZ; YAVITT; ZINDER, 2009). Outros dois clones relacionaram ao grupo RC-1 (“Rice Cluster 1”), que teve o metabolismo metanogênico confirmado pelo recente isolamento da espécie *Methanocella paludicola* (SAKAI et al., 2008).

As famílias *Methanosarcinaceae* e *Methanobacteriaceae* apresentam-se amplamente distribuídas na natureza, já tendo sido detectadas em sedimentos fluviais (KEMNITZ et al., 2004). A ocorrência desses grupos nos sedimentos de rios amazônicos está discutida no item 6.2.1, referente ao cultivo desses grupos a partir do sedimento do rio Madeira.

Dentre os oito clones afiliados à família *Methanomicrobiaceae*, quatro deles tiveram maior similaridade ao clado que contém vários gêneros isolados em diversos ambientes, inclusive a partir de sedimentos de lagos de água doce (GARCIA; OLLIVIER; WHITMAN, 2006). Os demais quatro clones relacionaram-se ao subgrupo E1, proposto para agrupar sequências obtidas em camadas inferiores do sedimento de um pântano ácido (CADILLO-QUIROZ et al., 2006). A camada inferior do pântano onde foram encontradas as sequências desse grupo se caracteriza por apresentar menor acidez que as camadas superiores e, de fato, o recente isolamento de um representante desse grupo, *Methanosphaerula palustris* (CADILLO-QUIROZ; YAVITT; ZINDER, 2009) revelou que o pH ótimo da espécie está em condições levemente ácidas (5,7), como as medidas na água do rio Floresta.

Figura 12: Análise filogenética baseada em fragmento de 450 pb do gene rRNA 16S em clones do reino *Euryarchaeota* obtidos a partir do sedimento do Rio Floresta (FLO). A árvore foi construída empregando-se o método de “Neighbor-Joining” com modelo de substituição de Jukes-Cantor. Números junto aos nós representam valores de “bootstrap” para 1000 réplicas (apenas os maiores que 70 são mostrados).

Dois clones relacionaram-se ao cluster RC-I, proposto com base em sequências encontradas em solos de arrozais (GROSSKOPF; STUBNER; LIESACK, 1998), do qual também recentemente se obteve um isolado, *Methanocella paludicola* (SAKAI et al., 2008). Os clones podem ser confirmados como pertencentes à ordem *Methanocellales*, pois apresentaram 96% e 94% de divergência em relação à espécie, única representante cultivada dessa ordem (SAKAI et al., 2008). Essa metanogênica foi isolada a partir de solos de cultivo

de arroz e é a primeira representante do grupo denominado RC-I (“Rice Cluster I”) a ser isolada. Apesar de ocorrer caracteristicamente em solos de plantações de arroz, membros desse grupo já foram detectados em diversos ambientes naturais (CONRAD; ERKEL; LIESACK, 2006), inclusive no sedimento anaeróbico de um rio na Holanda (KEMNITZ et al., 2004).

Seis clones puderam ser classificados dentro do cluster RC-V (“Rice Cluster V”), também inicialmente proposto com base em sequências encontradas em solos de arrozais (GROSSKOPF; STUBNER; LIESACK, 1998) mas com representantes detectados em diversos ambientes, inclusive na coluna d’água de um rio do ártico (GALAND; LOVEJOY; VINCENT, 2006), onde compunha considerável fração (até 40%) dos clones atribuídos ao reino *Euryarchaeota* encontrados nesse ambiente.

Um dos clones teve maior similaridade a sequências atribuídas ao grupo MBG-D (“Marine Benthic Group D”) encontrado inicialmente em sedimentos marinhos (VETRIANI et al., 1999), mas também com representantes encontrados em diversos ambientes terrestres, como em sedimentos de lago (JURGENS et al., 2000) e pântanos ácidos (CADILLO-QUIROZ et al., 2006).

Três dos clones obtidos apresentaram baixa similaridade (máximo de 86%) a sequências depositadas no banco de dados e formaram um grupo-irmão ao clado RC-V. Como não há muitos trabalhos realizados no sedimento de rios tropicais, o fato de se encontrar sequências com baixa similaridade àquelas disponíveis no banco de dados não é surpreendente. No entanto, com a falta de maiores informações, não se pode especular sobre o papel desses micro-organismos nesse ambiente.

5.2.2 Clones obtidos do sedimento do rio Floresta afiliados ao reino *Crenarchaeota*

Nenhum dos 48 clones pertencentes ao reino *Crenarchaeota* está relacionado aos poucos organismos já cultivados desse grupo (Figura 13). Cerca de metade dos clones foi relacionada a sequências pertencentes ao grupo I.3. Esse grupo inclui o clado TMCG (“Terrestrial Miscellaneous Crenarchaeotic Group”) (TAKAI et al., 2001), ao qual 12 clones foram afiliados. O grupo TMCG contém sequências de *Crenarchaeota* obtidas a partir de diversos ambientes terrestres (TESKE e SORENSEN, 2008), como solos e sedimentos de água doce (OCHSENREITER et al., 2003). Como um todo, o clado reconhecido como I.3 (DE LONG, 1998) apresenta diversas sequências atribuídas a sedimentos e à coluna d’água de

ambientes de água doce, solos e também em resíduos de tratamento de esgoto (JURGENS et al., 2000; OCHSENREITER et al., 2003). Por sua vez, o clado I.2 (DE LONG, 1998), ao qual um dos clones obtidos nesse trabalho está relacionado, é composto principalmente por sequências obtidas em sedimentos, tanto marinhos quanto de lagos de água doce.

O clado I.1b, ao qual 6 clones foram afiliados, é o principal clado de *Crenarchaeota* encontrado em ambientes terrestres, especialmente em solos (JURGENS et al., 2000; OCHSENREITER et al., 2003), mas representantes também já foram encontrados em sedimentos de água doce (HERSHBERGER et al., 1996) e amostras de sub-superfície (TAKAI et al., 2001). Especula-se que, devido à grande diversidade de solos em que representantes desse grupo foram encontrados, esse seja o grupo de arqueias que melhor compete com bactérias por nichos em diferentes solos (HANSEL et al., 2008).

Sete clones da biblioteca do rio Floresta relacionaram-se ao grupo I.1c, inicialmente proposto sob o nome de FFS por ter sido encontrado em solo de floresta – “Finnish Forest Soil” (JURGENS; LINDSTROM; SAANO, 1997). O grupo ainda não possui representantes cultivados, mas destaca-se por sua abundância em solos ácidos, onde compõe a maior parte das arqueias encontradas (NICOL et al., 2005; KEMNITZ; KOLB; CONRAD, 2007; HANSEL et al., 2008; LEHTOVIRTA; PROSSER; NICOL, 2009).

O restante (11) dos clones obtidos nessa biblioteca afiliou-se ao clado I.1a (DE LONG, 1998), sendo que 9 deles relacionaram-se a sequências pertencentes ao MG-1 (“Marine Group 1”) (DE LONG, 1992) e 2 pertencentes ao SAGMCG-2 (“South Africa Gold Mines Crenarchaeotic Group”) (TAKAI et al., 2001). O grupo I.1a é composto principalmente por sequências obtidas em amostras de plâncton marinho, mas também é frequentemente encontrado nos sedimentos oceânicos (TESKE e SORENSEN, 2008), possuindo também representantes em ambientes terrestres (TAKAI et al., 2001). A espécie *Nitrosopumilus maritimus* (KÖNNEKE et al., 2005) é o primeiro isolado desse grupo e verificou-se que realiza oxidação de amônia, revelando que esse grupo tem uma grande importância no ciclo do nitrogênio em ambiente marinho.

5.3 Biblioteca do gene rRNA 16S a partir do sedimento do rio Madeira

Foram sequenciados 96 clones, dos quais 16 resultaram sequências de má qualidade ou com suspeita de serem quimeras de acordo com os resultados das análises pelos programas Bellerophon e Mallard. Dentre os 80 clones restantes, 74 foram semelhantes a representantes do reino *Crenarchaeota* enquanto apenas 6 foram afiliados ao reino *Euryarchaeota*. Todos os clones obtidos tiveram maior similaridade com sequências de espécies ainda não cultivadas, o que não é surpreendente, dado que 75% das sequências de arqueias depositadas no banco de dados do NCBI advêm de amostras ambientais (ROBERTSON et al., 2005), proporção mantida até o presente momento.

5.3.1 Clones obtidos do sedimento do rio Madeira afiliados ao reino *Crenarchaeota*

A quase totalidade (90%) das sequências de boa qualidade analisadas nesse trabalho agrupou-se junto a sequências do grupo I.1b, pertencente ao reino *Crenarchaeota* (Figura 14).

Oito dos 71 clones desse grupo apresentaram similaridade com sequências relacionadas à espécie *Nitrososphaera gargensis* (HATZENPICHLER et al., 2008), a primeira arqueia oxidadora de amônia isolada em ambiente terrestre – uma fonte termal. A ocorrência de arqueias oxidadoras de amônia em sedimentos e no plâncton marinho foi especulada pela detecção de genes da enzima amônia mono-oxigenase (*amoA*) nessas amostras e posteriormente comprovada com o isolamento de uma espécie nitrificante autotrófica pertencente ao grupo I.1a (KÖNNEKE et al., 2005). Com o isolamento de uma arqueia nitrificante em ambiente terrestre e pertencente a outro clado filogenético, especula-se que o papel das arqueias no ciclo do nitrogênio seja muito mais importante que o anteriormente imaginado. Sequências relacionadas a essa espécie foram também encontradas em amostras do plâncton do rio Reno, mas o papel de arqueias nitrificantes em ambientes de água doce permanece inexplorado (HERFORT et al., 2009).

Figura 14- Análise filogenética baseada em fragmento de 500 pb do gene rRNA 16S em clones do reino *Crenarchaeota* obtidos a partir do sedimento do rio Madeira (MAD). A árvore foi construída empregando-se o método de “Neighbor-Joining” com modelo de substituição de Jukes-Cantor. Números junto aos nós representam valores de “bootstrap” para 1000 réplicas (apenas os maiores que 70 são mostrados).

O restante das sequências pertencente ao grupo I.1b foi similar a diversas sequências oriundas principalmente de amostras de solo de diferentes localidades e com diferentes características físico químicas (SIMON; DODSWORTH; GOODMAN, 2000; TAKAI et al., 2001; QUAISER et al., 2002; SLIWINSKI e GOODMAN, 2004; CADILLO-QUIROZ et al., 2008; NELSON et al., 2009), revelando a grande abrangência desse grupo em ambientes terrestres. A razão de se encontrar muitos clones relacionados a amostras de solo pode decorrer do fato de relativamente poucos estudos terem abordado arqueias em sedimentos fluviais, especialmente em ambiente tropical; mas também pode ser devido às características do rio Madeira, que recebe esse nome devido à grande quantidade de material edáfico, inclusive árvores, que arrasta em seu leito. Muitas arqueias encontradas na coluna d'água do rio Mackenzie (GALAND; LOVEJOY; VINCENT, 2006) também foram similares a sequências encontradas em sedimentos lacustres e os autores supõem que esses organismos sejam alóctones e tenham sido carregados pelo rio na sua passagem por uma planície com muitos lagos. A mesma situação pode explicar a ocorrência, no sedimento do rio Madeira, de clones relacionados a sequências de solo, uma vez que esse rio percorre uma vasta planície alagável.

Ainda, três dos clones encontrados na biblioteca do rio Madeira foram relacionadas ao grupo I.1a. Como já discutido para o rio Floresta, onde esse grupo também foi detectado, esses organismos inicialmente detectados apenas em amostras marinhas, já possuem representantes encontrados em amostras terrestres.

5.3.2 Clones obtidos do sedimento do rio Madeira afiliados ao reino *Euryarchaeota*

Os seis clones de *Euryarchaeota* encontrados se relacionam à classe *Thermoplasmata* (Figura 15), mas tiveram no máximo 90% de similaridade com sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Os membros cultivados da classe *Thermoplasmata* são descritos como termofílicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, podendo ser tanto auto como heterotróficos (HUBER e STETTER, 2006). Algumas espécies isoladas desse grupo crescem em temperaturas de 30-35 °C, apesar do ótimo para a maioria das espécies estar em 60 °C. O pH em que esses organismos já foram cultivados varia entre 0 e 2 (HUBER e STETTER, 2006).

Figura 15- Análise filogenética baseada em fragmento de 500 pb do gene rRNA 16S em clones do reino *Euryarchaeota* obtidos a partir do sedimento do rio Madeira (MAD). A árvore foi construída empregando-se o método de “Neighbor-Joining” com modelo de substituição de Jukes-Cantor. Números junto aos nós representam valores de “bootstrap” para 1000 réplicas (apenas os maiores que 70 são mostrados).

Os grupos não cultivados dentro da classe *Thermoplasmata* apresentam-se classificados nos clados E2 (sequências de ambientes hidrotermais e o clado TMEG – “Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotic Group”) e E3 (MG – “Marine Group” II e III). Robertson et al. (2009), em seu estudo da diversidade de arqueias em biofilmes formados em salinas, empregam essa divisão e encontram sequências que puderam ser afiliadas a esse grupo. Outras sequências que os autores incluíram nesses grupos (E2 ou E3) pertencem a trabalhos em sedimentos marinhos (KENDALL et al., 2007); exudações quentes (DHILLON et al., 2005) e frias (KNITTEL et al., 2005) e biofilmes hipersalinos (SORENSEN et al., 2005). A filogenia feita por Dhillon et al. (2005) também apresenta dois clados de sequências não cultivadas relacionadas a *Thermoplasmatales*. Um desses clados é composto por sequências de ambientes hidrotermais, enquanto o outro apresenta sequências oriundas de biodigestores, mas nenhum trabalho foi publicado a cerca dessas sequências. Nos sedimentos

de um lago eutrofizado na França os autores (BRIÉE; MOREIRA; LOPEZ-GARCIA, 2007) detectaram sequências relacionadas a diversos grupos inicialmente encontrados em fontes hidrotermais profundas e atribuíram tal fato às condições anaeróbias encontradas nesses ambientes.

O fato de se encontrar esses grupos característicos de ambientes extremos na biblioteca do sedimento de um rio com pH entre 6 e 7 e temperaturas em torno dos 30 °C deve ser encarado com cautela, uma vez que são poucos os representantes isolados e os genomas completos obtidos para as classes *Thermoplasmata* e *Thermoprotei*. Dessa forma, não podem ser tiradas maiores conclusões a cerca da fisiologia e metabolismo desse grupo. Ainda, sequências de 16S são insuficientes para a diferenciação entre espécies e podem ser idênticas dentro de um grupo sem refletir suas diferentes capacidades metabólicas e os nichos ecofisiológicos que esse grupo pode ocupar (JASPER e OVERMANN, 2004).

Apesar de se ter conseguido cultivar micro-organismos metanogênicos a partir do sedimento do rio Madeira (item 5.6.1), não foram encontrados clones relacionados a nenhum dos grupos sabidamente metanogênicos. Tal fato pode indicar que, na porção amostrada, as metanogênicas ocorrem em menor proporção que outras arqueias ou que tiveram a amplificação de seu gene preterida em relação ao gene das demais arqueias, de forma a não estarem representadas na biblioteca. Grabowski et al. (2005) empregaram técnicas de cultivo e técnicas moleculares para a caracterização da microbiota da água de produção de um poço de petróleo. Todos os clones obtidos a partir da amostra ambiental estavam relacionados ao gênero *Arcobacter*, mas, no entanto, os autores conseguiram recuperar clones relacionados ao gênero *Firmicutes* e aos grupos *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* e *Spirochaetes* em bibliotecas construídas após enriquecimento da amostra. Os autores atribuem essa diferença à especificidade do iniciador em diferentes condições, como pode ter ocorrido nesse trabalho. O mesmo problema foi encontrado quando o perfil de DGGE – “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis” – da amostra da coluna d’água de um rio foi comparado ao perfil de uma cultura enriquecida a partir dessa mesma amostra (PLASENCIA et al., 2010) e apenas no enriquecimento puderam ser detectadas no gel sequências pertencentes a metanogênicas não detectadas na amostra original.

Como o iniciador foi capaz de detectar grupos metanogênicos na amostra do rio Floresta, é ainda preciso considerar o método de coleta empregado e as características de cada amostra para explicar a ausência desse grupo na biblioteca. Ainda, a análise de cobertura da biblioteca (Figura 15, item 5.4) mostra que a diversidade em nível de classe está coberta, de

forma que, na porção da amostra analisada, o sequenciamento de mais clones não revelaria a ocorrência dos grupos metanogênicos que se conseguiu cultivar.

O volume de amostra coletado para as análises moleculares foi menor que o volume coletado para os cultivos e, portanto, é possível que na amostra destinada ao cultivo tenha sido coletada uma porção mais inferior do sedimento, que seria mais anaeróbia e, assim, forneceria as condições necessárias para o crescimento da maior parte de arqueias metanogênicas. Ainda, como discutido acima, é possível que a comunidade microbiana do sedimento coletado às margens do rio Madeira sofra forte influência da microbiota lixiviada dos solos pela passagem do rio e, portanto, predominem na amostra espécies relacionadas a sequências tipicamente encontradas em solos. No entanto, com o uso de meio de cultura específico e condições adequadas para a manipulação de anaeróbios estritos, foi possível cultivar e manter culturas de arqueias metanogênicas, ainda que essas estivessem em pequenas quantidades na amostra original.

5.4 Índices de α e β diversidade

A análise de cobertura da biblioteca através das curvas de rarefação do rio Floresta (Figura 16) mostra que mesmo considerando-se a divergência tolerada para separação de classes (20%) (COHAN, 2005), a diversidade da amostra não foi coberta pelo número de clones sequenciados, uma vez que as três curvas apresentadas não chegaram a um platô.

Por sua vez, a análise da cobertura da biblioteca do rio Madeira (Figura 17) revela que nem toda a diversidade da amostra esteve compreendida na biblioteca ao nível de gênero (3% de diferença) (COHAN, 2005), mas as curvas relativas à diversidade de ordens (10% de diferença) e de classes (20% de diferença) já apresentam uma tendência à estabilização com o aumento do número de clones sequenciados, indicando que a diversidade da amostra nesses níveis encontra-se coberta pela biblioteca. Essa análise permite inferir que a amostra encontra-se dominada por poucas ordens, embora exista diversidade em nível de gênero entre os clones pertencentes a esse grupo. Essa distribuição pode ser observada também na árvore filogenética, que apresenta 88% dos clones atribuídos ao grupo I.1b do reino *Crenarchaeota* (Figura 14).

Figura 16- Curvas de rarefação da biblioteca construída a partir do sedimento do Rio Floresta. Os valores de divergência tolerados em cada curva foram selecionados para representar diferentes níveis de agrupamentos filogenéticos, segundo Cohan, 2005 – 3% para gênero, 10% para família e 22% para classe.

Figura 17- Curvas de rarefação da biblioteca construída a partir do sedimento do Rio Madeira. Os valores de divergência tolerados em cada curva foram selecionados para representar diferentes níveis de agrupamentos filogenéticos, segundo Cohan, 2005 - 3% para gênero, 10% para família e 22% para classe.

A riqueza (calculada pelos índices de *Chao* e de *Ace*) e a diversidade (calculada pelos índices de *Simpson* e de *Shannon*) estimadas para o rio Floresta foram maiores do que as obtidas para o rio Madeira (Tabela 9), como pode ser observado também pela comparação entre as curvas de rarefação (Figuras 16 e 17).

Tabela 9- Índices de riqueza (Ace e Chao) e diversidade (Simpson e Shannon) obtidos para as bibliotecas dos rios Floresta e Madeira, considerando-se as divergências de 3% (nível de gênero) e 10% (nível de família).

3%	<i>Ace</i>	<i>Chao</i>	<i>Simpson</i>	<i>Shanon</i>
Floresta	138,75	105	0,020481	3,58024
Madeira	88,8059	76,0769	0,019444	3,66464
10%	<i>Ace</i>	<i>Chao</i>	<i>Simpson</i>	<i>Shanon</i>
Floresta	76,7653	52,25	0,045571	2,92734
Madeira	20,1421	20	0,099691	2,46407

A comparação entre as comunidades dos dois rios analisados foi realizada através de uma árvore filogenética contendo os clones das duas bibliotecas (não apresentada). Os testes de significância calculados pelo programa Unifrac (LOZUPONE e KNIGHT, 2005), revelaram que as comunidades dos dois rios são significativamente diferentes, uma vez que é nula a probabilidade ($p < 0,001$) da topologia da árvore ser mantida com a aleatorização dos ambientes a que pertencem as sequências analisadas. Esses dados mostram que as comunidades são estatisticamente diferentes, mas os testes não são suficientes para avaliar se essas diferenças são ecologicamente significativas (SCHLOSS, 2008).

5.5 Considerações sobre a diversidade de arqueias encontrada nos sedimentos estudados

Como mencionado anteriormente, ainda são poucos os estudos de arqueias em sedimentos fluviais e não foi encontrado nenhum trabalho a cerca desses organismos em rios tropicais, de forma que não surpreende que as sequências encontradas tenham, em geral, baixa similaridade (de 85% a 97%) com sequências depositadas nos bancos de dados. Os clones recuperados das duas bibliotecas realizadas nesse trabalho foram predominantemente pertencentes ao reino Crenarchaeota, um grupo que se revelou diverso e abundante tanto em ambientes marinhos (FUHRMAN; MCCALLUM; DAVIS, 1992) quanto em ambientes terrestres (BUCKLEY; GRABER; SCHMIDT, 1998). A recente descoberta de membros mesofílicos desse grupo, capazes de crescer autotroficamente e realizar nitrificação (KÖNNEKE et al., 2005; HATZENPICHLER et al., 2008) acrescenta ainda mais interesse ao grupo e revela que seu papel na regulação dos ecossistemas vai muito além do conhecido, quando acreditava-se que o grupo era composto exclusivamente por membros termofílicos.

Ambos os rios apresentaram uma alta diversidade quando são considerados os gêneros encontrados (97% de divergência entre sequências do gene para o rRNA 16S), mas o rio Floresta apresentou-se mais diverso quanto aos clados a que esses gêneros de arqueias pertencem. O sedimento rio Madeira mostrou-se dominado por sequências pertencentes ao clado I.1b, típica de solos, o que pode ser devido à grande planície que é sazonalmente alagada por esse rio e de onde grandes quantidades de material orgânico são transportadas pelo leito do rio, como ocorre com o rio Mackenzie (GALAND; LOVEJOY; VINCENT, 2006). Em solos amazônicos, levemente ácidos, assim como as águas dos rios analisados nesse trabalho, a comunidade de arqueias apresentou-se dominada por representantes nitrificantes (*Candidatus Nitrososphaera* e *Candidatus Nitrosocaldus*), os primeiros cultivados pertencentes ao grupo I.1b (TAKETANI e TSAI, 2010). Porém, não pode ser descartada a hipótese de que as sequências desse grupo sejam autóctones do sedimento do rio Madeira, uma vez que membros do grupo I.1b já foram detectados em outros sedimentos e nesse trabalho não foi realizada nenhuma comparação visando traçar a origem dos grupos detectados na amostra. De qualquer forma, a ocorrência de grupos nitrificantes nesse sedimento vem acrescentar maiores dados para o recente estudo dessas arqueias e é um dos primeiros relatos do grupo em sedimentos de água doce.

O rio Floresta também apresenta comportamento sazonal mas, no entanto, é um rio estreito e de pequena vazão, sem força para carregar muito material de suas margens, e apresenta, além de clones típicos de sedimentos alagados – como o RC-V – clones também relacionados a amostras de solo. A biblioteca construída a partir do sedimento do rio Floresta mostrou-se mais diversa, com clones afiliados a diversos grupos de Crenarchaeota não cultivadas e Euryarchaeota, tanto cultivadas como apenas conhecidas por métodos moleculares.

A discussão com base nos resultados apresentados limita-se pelo fato de pouco poder ser inferido a cerca da maior parte de arqueias não cultivadas e pela ampla distribuição apresentada pela maioria dos grupos, como é o caso do clado MG-1 que inicialmente continha apenas sequências obtidas a partir do plâncton marinho, mas que hoje agrupa sequências oriundas de diversas amostras, inclusive aterros sanitários. O rio Floresta também apresenta clones pertencentes a esse grupo e o mais provável é que esse grupo venha a ser dividido ou renomeado a fim de contemplar toda a diversidade que abarca.

No momento em que foram realizadas as coletas, o sedimento dos rios continham concentrações muito baixas de matéria orgânica. Não é possível avaliar como essa condição

varia ao longo do dia ou do ano, mas a ocorrência de períodos oligotróficos nesses sedimentos faz com que os micro-organismos tenham de sobreviver a essa baixa concentração de matéria orgânica. Tanto na amostra do rio Madeira como na amostra do rio Floresta foram encontradas sequências relacionadas a micro-organismos sabidamente autotróficos, como as arqueias metanogênicas e arqueias nitrificantes. Especula-se que as arqueias surgiram evolutivamente para ocupar nichos sujeitos a estresse energético, como ambientes com extremos de temperatura e pH e, a partir daí, ocuparam demais ambientes, se especializando em ambientes com pouca disponibilidade de substratos energéticos (VALENTINE, 2007). Considerando-se que os sedimentos apresentam características oligotróficas e as águas, levemente ácidas, é possível que os grupos de arqueias encontrados tenham uma importância ecologicamente significativa nesse ambiente, merecendo futuros estudos.

A não detecção de metanogênicas nos sedimentos do rio Madeira podem decorrer do fato desse grupo ocorrer em menor abundância nessa amostra, de forma que a amplificação de seu gene foi preterida em relação à amplificação de grupos numericamente mais significativos. Problemas de especificidade do iniciador ou do protocolo de extração do DNA foram descartados, pois o mesmo procedimento adotado para o rio Floresta levou a obtenção de sequências metanogênicas.

De forma geral, esse trabalho contribui para o conhecimento da diversidade de arqueias em dois pontos de dois rios da Bacia Amazônica, ainda não explorados para estudos a cerca de um domínio que ainda desperta muito interesse, e cujo papel ecológico apenas recentemente vem sendo estudado a fundo. É especialmente importante ressaltar a detecção de grupos relacionados às arqueias nitrificantes, reforçando a necessidade de se abrangerem os estudos do ciclo do nitrogênio no ambiente amazônico, incluindo-se as novas descobertas envolvendo o papel de arqueias nesse ciclo.

5.6 Enriquecimento de arqueias metanogênicas a partir do sedimento do rio Madeira

Os procedimentos de cultivo para enriquecimento e isolamento de arqueias metanogênicas a partir do sedimento do rio Madeira foram adotados a partir dos resultados obtidos a cada etapa de cultivo e, dessa forma, são apresentados nesse item (Figura 18).

Os cultivos para enriquecimento de metanogênicas, bem como os repiques subsequentes, surpreenderam pela alta porcentagem de metano acumulado no frasco após curto tempo de incubação a 30 °C. Os primeiros enriquecimentos realizados em meio basal

contendo os substratos tipicamente metanogênicos (acetato, formiato, metanol e mantidos sob atmosfera de $H_2:CO_2$) apresentaram valores de até 33,5% de metano acumulado após 16 dias de incubação. A partir do quarto enriquecimento, fez-se um repique em duplicata, sendo que em uma das réplicas adicionou-se vancomicina ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) para inibir o crescimento de bactérias (etapa 1, figura 18). Essa adição não prejudicou a produção de metano nos frascos e os valores foram semelhantes para os repiques com ou sem o antibiótico. Sob microscopia de fluorescência, foi possível observar a ocorrência de sarcinas, cocos e bacilos autofluorescentes (Figura 19), uma característica das arqueias metanogênicas conferida pela coenzima f420.

Figura 18- Etapas de cultivo empregadas para enriquecimento e isolamento de arqueias metanogênicas a partir do sedimento do rio Madeira. Setas grossas representam repiques das culturas.

Figura 19- Observação de células encontradas no enriquecimento feito a partir do sedimento do Rio Madeira empregando-se fontes de carbono utilizadas por células metanogênicas. É possível observar sarcinas e bacilos autofluorescentes quando vistos à luz ultravioleta.

Amostra do repique do enriquecimento contendo vancomicina (etapa 1, figura 18) foi inoculada em meio contendo apenas uma das fontes de carbono empregadas no enriquecimento (etapa 2, figura 18). As culturas que apresentaram maior produção de metano foram repicadas em meio sólido contendo a mesma fonte de carbono com que vinham sendo cultivadas (etapa 3, figura 18). O crescimento de colônias foi observado após o trigésimo dia de incubação e 6 colônias foram selecionadas para novo repique em meio líquido (etapa 4, figura 18). Do cultivo dessas colônias, 2 apresentaram alta produção de metano após 23 dias (77% e 46% de metano acumulado na atmosfera dos frascos) e juntamente com um terceiro cultivo que apresentava o crescimento de sarcinas, foram selecionados para continuidade do trabalho visando o isolamento de células metanogênicas.

As três culturas selecionadas (2, 3 e 6) foram então repicadas em meio contendo todas as fontes de carbono que já vinham sendo utilizadas – acetato, formiato, metanol e atmosfera de $H_2:CO_2$ – e também em meios contendo apenas uma dessas fontes (etapa 5, figura 18). Foi possível verificar que a maior produção de metano se deu nos frascos alimentados com $H_2:CO_2$, enquanto o acetato e o metanol renderam a menor produção de metano, com exceção da cultura 12, que também teve alta porcentagem de metano acumulado em frasco contendo apenas metanol como substrato (Tabela 10).

Tabela 10- Porcentagem de metano acumulado na atmosfera dos frascos de repique das colônias selecionadas para continuidade do trabalho de isolamento. As colônias foram repicadas em meio contendo todas as fontes de carbono citadas e em meio contendo cada uma das fontes separadamente.

<i>Cultivo</i>		2		3		6	
		% CH ₄	dias	% CH ₄	Dias	% CH ₄	Dias
Etapa 4		1,81	23	46,3	23	77,7	23
Etapa 5	Acetato	0,58	12	1,25	12	1,89	12
	Formiato	5,62	12	4,61	12	5,76	12
	Metanol	0,57	12	0,57	12	8,93	12
	H ₂ :CO ₂	9,90	12	4,45	12	16,64	12
	Combinação dos 4 substratos	7,58	12	21,51	12	27,03	12

Na maioria dos sedimentos de água doce estudados, a metanogênese acetoclástica corresponde a 70% do total da produção de metano, enquanto a hidrogenotrófica corresponde aos demais 30% (CONRAD, 1999). O metabolismo metilotrófico ocorre raramente, refletindo a ausência de substratos metilados em sedimentos de água doce (CAPONE et al., 1988⁴ apud LIU e WHITMAN, 2008). A obtenção de culturas mistas que apresentaram maior produção de metano a partir de H₂:CO₂ em comparação aos demais substratos deve-se ao fato das condições de enriquecimento não refletirem as condições locais, especialmente no que tange a quantidade de substrato disponível. Como o metabolismo hidrogenotrófico é o que leva a maior liberação de energia livre (WHITMAN; BOWEN; BOONE, 2006) e também é o mais amplamente distribuído entre os diferentes gêneros metanogênicos, em condições favoráveis à sua ocorrência espera-se maior liberação de metano a partir desse substrato.

As culturas 2 e 3 apresentaram maior produção de metano a partir de H₂:CO₂ e formiato, indicando a ocorrência de espécies hidrogenotróficas. A pequena produção de metano detectada na cultura 3 a partir de acetato pode indicar tanto a capacidade das

⁴ CAPONE, D. G.; KIENE, R. P. Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: contrasts in anaerobic carbon catabolism. **Limnology and Oceanography**, v. 33, p. 725–749, 1988.

metanogênicas presentes em diretamente utilizar esse substrato, quanto na ocorrência de bactérias capazes de metabolizar o acetato a H_2 e CO_2 , como as homoacetogênicas (DEMIRREL e SCHRER, 2008).

A cultura 6 apresentou o maior rendimento em metano para os quatro substratos empregados (Tabela 10). Essa capacidade pode ser explicada pela possível ocorrência de arqueias da família *Methanosarcinaceae* que, como discutido anteriormente, são capazes de metabolizar acetato, metanol e hidrogênio. No entanto, os membros dessa família não possuem a enzima formiato desidrogenase (KENDALL e BOONE, 2006), levando a crer que diferentes grupos de arqueias foram responsáveis pela produção de metano frente aos substratos empregados. Ainda é preciso considerar que essas culturas estavam bastante mistas, inclusive com a ocorrência de bactérias (confirmada por amplificação com iniciadores específicos – item 5.6.3). Portanto, é possível que a produção de metano detectada não tenha ocorrido diretamente a partir do substrato empregado, mas que esse tenha sido consumido por outros micro-organismos que podem ter liberado metabólitos como o H_2 ou o CO_2 e que esses tenham sido empregados na metanogênese.

A maior produção de metano a partir da adição dos quatro substratos nas culturas 3 e 6 pode ser indício tanto da ocorrência de culturas mistas de metanogênicas como da ocorrência de metanogênicas com maior espectro metabólico. Ainda pode ser também explicada pela presença de bactérias sintróficas, como discutido no parágrafo anterior. A cultura 2 apresentou produção de metano semelhante para a adição de $H_2:CO_2$, formiato ou da combinação de fontes (Tabela 10), indicando que essa cultura apresenta metanogênicas hidrogenotróficas, e que não foram enriquecidas pela adição dos demais substratos. Os resultados também indicam menor influência do metabolismo sintrófico, apesar de bactérias também terem sido detectadas nesses cultivos.

As culturas que acumularam mais que 5% de metano foram repicadas por 5 vezes (etapa 6, figura 18) e a produção de metano foi acompanhada, bem como análises microscópicas – de contraste de fase, fluorescência e através da coloração de Gram – foram feitas para se analisar a pureza das culturas. Até o quinto repique, nenhuma delas estava pura. Fez-se então 15 repiques em meio sólido (etapa 7, figura 18) das culturas que continuaram a produzir metano durante as sucessivas inoculações. As culturas selecionadas estavam sendo cultivadas em meio apenas sob atmosfera de $H_2:CO_2$ ou alimentadas com todas as fontes. As culturas que inicialmente cresceram com apenas acetato, metanol ou formiato deixaram de crescer nos repiques subsequentes.

Figura 20- Aspecto geral de colônias crescidas nos frascos de “roll-tube”. A coloração variou entre bege (A) e branca (B), e muitas apresentavam bordas irregulares. Foram repicadas colônias variando entres os tamanhos de 0,2 e 0,7 cm de diâmetro.

A partir das culturas em meio sólido, 104 colônias foram selecionadas e transferidas para meio líquido contendo todas as fontes de carbono já mencionadas. As colônias apresentaram coloração bege (Figura 20a) ou branca (Figura 20b) e seus tamanhos variaram entre 0,2 e 0,7 mm; a maioria apresentava bordas irregulares. Além das colônias repicadas, outras 72 colônias desses cultivos foram transferidas individualmente para um tubo de reação em cadeia da polimerase feita com os iniciadores 334f e 1400r (etapa 7, figura 18). Das 104 colônias repicadas, 28 cresceram e produziram acima de 7% de metano após 30 dias de incubação. Muitas das culturas podem ter sido perdidas durante o processo de transferência para o meio líquido, pois, apesar dos cuidados tomados, a colônia fica exposta ao ar por um curto período de tempo. Dentre as 28 colônias crescidas, 7 ainda são mantidas no laboratório e, como o isolamento não foi obtido, realizou-se a caracterização dos consórcios como descrito nos itens subsequentes.

5.6.1 Hibridização fluorescente *in situ* dos enriquecimentos

No quarto frasco de enriquecimento foi empregada a técnica de hibridização fluorescente *in situ* para identificação, em nível de família, das metanogênicas encontradas. Foram encontradas as famílias *Methanosarcinaceae* e *Methanobacteriaceae* (Figura 21).

As famílias encontradas são amplamente distribuídas em habitats anaeróbios, inclusive em sedimentos de ambientes lacustres (LIU e WHITMAN, 2008). Os membros da família *Methanobacteriaceae* geralmente utilizam $H_2:CO_2$, sendo que algumas espécies são capazes de utilizar formiato. Já foram descritos em biodigestores, sedimentos de água doce, pântanos e

no rúmen. Geralmente são bacilos podendo ter de 0,6 a 25 μm de comprimento (LIU e WHITMAN, 2008), sendo que os observados nesse trabalho (Figura 21D) possuem de 2-3 μm . A família *Methanosarcinaceae* é a que apresenta maior diversidade catabólica, podendo empreender as três vias descritas para o metabolismo metanogênico, com exceção do metabolismo do formiato (KENDALL e BOONE, 2006). Já foram descritas em biodigestores, sedimentos anaeróbios de água doce e salgada, bem como em rúmen (LIU e WHITMAN, 2008). Essa família apresenta morfologias variadas, como cocos, bacilos e pseudosarcinas. As células hibridizadas observadas nesse trabalho apresentaram formato de pseudosarcinas (Figura 21B).

Figura 21- Microscopia de fluorescência de células hibridizadas com sondas marcadas com rodamina (vermelho). Em B é possível observar sarcinas hibridizadas com a sonda MSMX860, específica para a família *Methanosarcinaceae*. Em D aparecem bacilos hibridizados com a sonda MB310, específica para a família *Methanobacteriaceae*. As imagens A e C referem-se a visualização das células coradas com DAPI, vistas no mesmo campo que B e D, respectivamente.

Diferentemente das sondas apresentadas acima, as sondas para as famílias *Methanomicrobiaceae* e *Methanococcaceae* não apresentaram fluorescência quando

hibridizadas à cultura utilizada como controle positivo, de forma que a ausência de células fluorescentes com o emprego das referidas sondas na amostra de enriquecimento não pode ser interpretada como ausência de membros dessas famílias.

5.6.2 Identificação molecular das arqueias cultivadas

As reações de amplificação do gene para o rRNA 16S a partir das colônias, sem uma etapa de extração, permitiu o sequenciamento de um fragmento desse gene sem que a cultura estivesse pura. Para escolha do produto da amplificação a ser sequenciado foi feita uma análise de restrição desses fragmentos com as enzimas *Hae* III e *Hha* I.

Diversos trabalhos compararam enzimas de restrição para a identificação de arqueias metanogênicas e concluíram que *Hae* III e *Hha* I apresentaram a melhor resolução para diferenciar diferentes espécies metanogênicas (HIRAISHI et al., 1995; PESARO e WIDMER, 2002; WRIGHT e PIMM, 2003), o que garante que essas enzimas foram suficientes para a escolha do material a ser sequenciado nesse trabalho. Os padrões observados nos artigos citados, apesar de terem sido propostos para identificação de arqueias metanogênicas, não podem ser comparados com o obtido nesse trabalho (Figura 22), uma vez que iniciadores diferentes foram utilizados, gerando diferentes tamanhos de fragmentos amplificados. Ainda, nesse trabalho o objetivo dessa técnica não foi a identificação, mas sim a seleção do DNA amplificado a ser sequenciado.

Apenas 1 dos 72 fragmentos analisados apresentou um padrão diferente dos demais, para as duas enzimas empregadas (Figura 22). Para o sequenciamento foi então escolhido esse produto diferente dos demais e o representante do padrão dominante que apresentou maior quantidade de DNA amplificado (colônias 29 e 16, respectivamente). O padrão apresentado pela digestão com a enzima *Hae* III da amplificação da colônia 44 (seta vermelha, figura 22) revela a ocorrência de mais de um fragmento do gene para o rRNA 16S nessa colônia. As duas colônias selecionadas cresceram em meio suplementado com a combinação das fontes de carbono. A colônia 29 era branca e tinha aspecto cremoso e diâmetro aproximado de 0,5 cm. A colônia 16 tinha aproximadamente 0,2 cm de diâmetro e aspecto rugoso com bordas irregulares e também apresentava cor branca.

Figura 22- Gel de agarose para observação dos fragmentos gerados pela digestão enzimática dos produtos da amplificação de parte do gene rRNA 16S de colônias crescidas em “roll-tube”. As setas azuis indicam as amplificações que foram sequenciadas. A seta vermelha indica um padrão apresentado pela amplificação do gene para o rRNA 16S de mais de um micro-organismo.

As sequências obtidas das colônias 16 e 29 tiveram boa qualidade e quando comparadas com sequências depositadas nos bancos do RDP e do NCBI, revelaram pertencer, respectivamente, aos gêneros *Methanosarcina* e *Methanobacterium*. Esse resultado está de acordo com as primeiras análises feitas no enriquecimento através da hibridização de sondas fluorescentes, que revelou a ocorrência de arqueias pertencente às famílias desses dois gêneros (item 5.6.1).

A sequência obtida a partir da colônia 16, representativa do padrão dominante encontrado nos géis de ARDRA, teve 98% de similaridade com diversas sequências identificadas como sendo da espécie *Methanosarcina mazei* (Figura 23), encontrada em diversos ambientes, como lagos salinos, estuário e biodigestores. A sequência teve também a mesma similaridade com clones não cultivados obtidos a partir de reservatórios de petróleo,

sedimentos permanentemente congelados, solos de plantação de arroz e poços artesianos. Representantes desse gênero são amplamente distribuídos, já tendo sido descritos para sedimentos de água doce (LIU e WHITMAN, 2008).

Figura 23- Árvore filogenética construída pelo método “Neighbor-Joining” a partir das sequências recuperadas das colônias 16 e 29 (●). Sequências de culturas tipo obtidas do banco de dados do RDP e sequências de clones obtidas do banco NCBI (Δ). Números junto aos nós representam valores de “bootstrap” para o teste com 1000 réplicas.

A espécie *Methanosarcina mazei* foi a primeira metanogênica descrita (BARKER, 1936), sendo posteriormente descoberto que se tratava de uma cultura mista, validada por Mah e Kuhn (1984). A espécie é capaz de formar cistos e agregados (KENDALL e BOONE, 2006), como foi observado em alguns cultivos realizados nesse trabalho (dados não apresentados). O crescimento dessa espécie pode ocorrer em temperaturas variando entre 25-45 °C, e o ótimo é a 42 °C. A espécie cresce com pH variando entre 5,8-8, com ótimo entre 6,8-7,2 (KENDALL e BOONE, 2006). Essas características estão de acordo com as condições encontradas no ambiente do qual essa cultura foi obtida (temperatura de 26 °C e pH 7,3) e

com as condições nas quais foi cultivada (37 °C, pH 7,0). A espécie *M. mazei* é capaz de metabolizar acetato, H₂:CO₂, metanol e metilaminas, e tem seu crescimento estimulado pela adição de extrato de levedura e peptonas ao meio de cultivo (KENDALL e BOONE, 2006). A espécie também já foi isolada a partir de sedimentos de lago (CAIRÓ et al., 1992), de lagos salinos para criação de peixes (LAI et al., 1999), de sedimentos estuarinos (LAI et al., 2000) e de solos permanentemente congelados (RIVKINA et al., 2006). Seu genoma já foi sequenciado e é uma espécie modelo para os estudos metabólicos e genéticos em arqueias metanogênicas (DEPPENMEIER et al., 2002).

Por sua vez, a sequência obtida a partir da colônia 29, encontrada apenas uma vez nos padrões de ARDRA, teve 99% de similaridade com a sequência da espécie *Methanobacterium congolense* e com a espécie *M. curvum* (Figura 21) e 97% de similaridade com clones afiliados ao gênero *Methanobacterium* obtidos a partir de solos ácidos, estações de tratamento de esgoto e plantações de arroz. A espécie *Methanobacterium congolense* foi isolada de um biodigestor tratando resíduos de casca de mandioca, no Congo. São bacilos de 2-20 µm de comprimento e crescem exclusivamente com o uso de H₂:CO₂. Sua temperatura de crescimento é entre 25 °C e 50 °C, com ótimo entre 37 °C e 42 °C; o pH pode variar entre 5,9 e 8,2, sendo o ótimo de 7,2. A espécie *Methanobacterium curvum*, isolada de um biodigestor tratando resíduos de uma fábrica de cerveja, é também capaz de crescer apenas com H₂:CO₂ (SUN; ZHOU; DONG, 2001), mas sua descrição ainda não foi validada. As condições descritas para as duas espécies condizem com as empregadas nesse trabalho e com aquelas do ambiente de onde a cultura foi obtida. Outras espécies do gênero foram isoladas também a partir de solos de plantação de arroz (JOULIAN et al., 2000) e sedimentos marinhos (SHLIMON et al., 2004). O gênero foi descrito como dominante nos sedimentos de um lago em Wisconsin, EUA, no qual não foi detectada metanogênese acetoclástica (ZEIKUS e WINFREY, 1976).

É ainda interessante ressaltar que os dois gêneros cultivados possuem resistência a períodos de dessecação e exposição ao oxigênio, mesmo não apresentando formas de resistência (FETZER; BAK; CONRAD, 1993; MOROZOVA e WAGNER, 2007), o que condiz com o ambiente de onde foram isoladas. O rio Madeira apresenta alta sazonalidade e seu nível pode variar em até 17 metros entre os períodos de cheia e seca. Como a amostragem foi feita à margem do rio, no início das cheias, sabe-se que sedimento fica exposto a condições de dessecação e ao oxigênio por alguns meses do ano mas, ainda, as células anaeróbias podem ficar protegidas em micro-nichos anaeróbios. Repiques subsequentes das

colônias recuperadas estão em andamento na tentativa de se obter uma cultura pura dessas metanogênicas e para manutenção da cultura ativa em laboratório, de forma que poderá servir a futuros trabalhos do grupo.

5.6.3 Identificação de bactérias associadas aos cultivos

Mesmo após os sucessivos repiques em meio definido e em meio contendo vancomicina, não foi possível purificar os organismos metanogênicos cultivados. Através de observação microscópica, 7 culturas da etapa 8 (figura 16) produtoras de metano foram selecionadas e tiveram seu DNA extraído. Fez-se então amplificação do rRNA 16S com iniciadores específicos para o domínio *Bacteria* e posterior sequenciamento. A análise das sequências obtidas a partir desse DNA revelou que 3 das culturas aparentemente apresentam apenas uma espécie de bactéria, uma vez que as sequências obtidas foram de boa qualidade.

Quando comparadas ao banco de dados do RDP, as sequências foram afiliadas à família *Veillonellaceae*, pertencente à classe *Clostridiales*. No entanto, as sequências apresentaram menos de 50% de similaridade a qualquer gênero cultivado na comparação feita pelo banco de dados RDP através da ferramenta *Classifier*. Na comparação através da ferramenta BLAST do banco de dados do NCBI, as sequências que apresentaram maior similaridade às sequências obtidas nesse trabalho são de organismos não cultivados, obtidos principalmente a partir de digestores anaeróbios, mas também da microbiota intestinal de peixes e microbiota oral humana (trabalhos não publicados). No entanto, a similaridade das sequências, mesmo a esses clones, variou entre 84 e 92%, representando a possível ocorrência de um gênero ainda não detectado em demais ambientes.

Alguns membros da classe *Clostridiales* apresentam metabolismo homoacetogênico, podendo crescer com base na conversão de H_2 e CO_2 a acetato através da via acetil-CoA. Ainda, o meio de cultura normalmente empregado para o isolamento de espécies acetogênicas é muito semelhante ao meio empregado nesse trabalho, o que explica a ocorrência de células acetogênicas nos cultivos. As bactérias acetogênicas são abundantes em sedimentos de ambientes de água doce, onde competem por H_2 , principalmente com arqueias metanogênicas. Apesar da família *Veillonellaceae* não ser descrita como acetogênica, é comum que espécies acetogênicas estejam filogeneticamente relacionadas a espécies que não apresentam esse metabolismo (DRAKE; KÜSEL; MATTHIES, 2006); se considerarmos a baixa similaridade entre as sequências obtidas e aquelas depositadas no banco de dados, podemos inferir que a

bactéria cultivada nesse trabalho se trate de um membro da família *Vellionellaceae* ainda não descrito, com metabolismo homoacetogênico.

5.7 Enriquecimento de arqueias metanogênicas a partir do sedimento do rio Floresta

Realizou-se também o enriquecimento de arqueias metanogênicas a partir do sedimento do rio Floresta. Optou-se por realizar dois enriquecimentos, um empregando 20 mM de cada um dos substratos (acetato, formiato e metanol) e outro empregando 10 mM também de cada um deles, a fim de proporcionar o crescimento de metanogênicas com diferentes afinidades pelos substratos. Cada um dos enriquecimentos foi feito em duplicata e 3 réplicas da amostra de sedimento foram utilizadas. A produção de metano medida após 6 meses de incubação (Tabela 11) apresentou valores muito menores que aqueles obtidos a partir do sedimento do rio Madeira incubado nas mesmas condições (20 mM de cada um dos substratos). O fato do sedimento desse rio ser arenoso o faz mais permeável ao oxigênio que pode ter entrado em contato com a amostra no momento da coleta e durante o transporte, dificultando a recuperação de células metanogênicas em laboratório. O trabalho com esses cultivos está em continuidade na tentativa de se obter uma cultura metanogênica pura e para caracterização molecular das metanogênicas enriquecidas.

Tabela 11- Porcentagem acumulada de metano na atmosfera dos frascos de enriquecimento após 186 dias de incubação a 30°C.

	CH₄ acumulado (%) após 180 dias		
	<i>Floresta 1</i>	<i>Floresta 2</i>	<i>Floresta 3</i>
20 mM 1	21,07	55,66	60,12
20 mM 2	35,00	50,17	41,11
10 mM 1	23,84	0,02	25,65
10 mM 2	14,62	15,67	28,02

É interessante ainda notar que, apesar de não ter sido feita análise da atividade metanogênica *in situ*, a medida de fluxo de metano para a atmosfera no local onde foi realizada a coleta apresentou alto valor, comparável a valores medidos em outros sedimentos de água doce em ambientes tropicais (Anexo D). Essa medida permite inferir a atividade de células metanogênicas no local e momento em que foram feitas as coletas, e maiores esforços devem ser despendidos na caracterização dessas células e na recuperação de culturas metanogênicas de grupos ainda não cultivados.

O cultivo de arqueias metanogênicas, assim como de inúmeros grupos microbianos ainda não cultivados, apresenta-se atualmente como um grande desafio aos microbiologistas, uma vez que as análises moleculares, mesmo os estudos genômicos, são insuficientes para se entender o papel ecológico desses grupos no ambiente. Apenas 100 gêneros de arqueias estão disponíveis na coleção de cultura alemã (em oposição a 1601 gêneros de bactérias), dos quais 34 são gêneros de arqueias metanogênicas, revelando a grande dificuldade de se obter organismos isolados desse domínio, e a necessidade de maiores esforços nesse sentido.

Apesar dos micro-organismos metanogênicos cultivados nesse trabalho pertencerem a gêneros já conhecidos, a obtenção dessas cepas a partir dos sedimentos dos rios amazônicos estudados apresenta-se como um novo dado para esse tipo de ambiente. Essa informação é particularmente importante frente aos altos valores de emissão de metano detectados no ambiente amazônico, uma vez que esse metano é, essencialmente, de origem microbiana.

6 CONCLUSÕES

1. Arqueias pertencentes ao reino *Crenarchaeota* predominaram nas bibliotecas do gene rRNA 16S de arqueias, realizadas a partir dos sedimentos dos rios Madeira e Floresta. A maioria dos clones das duas bibliotecas relacionaram-se a grupos ainda não cultivados, sendo que alguns deles apresentaram baixa similaridade (<97%) mesmo com sequências disponíveis nos bancos de dados, indicando a necessidade de maiores estudos na caracterização de arqueias dessas amostras e o potencial de descoberta de novas espécies.
2. Clones relacionados a arqueias nitrificantes foram encontrados no sedimento do rio Madeira e esse é um dos primeiros relatos desse grupo em sedimentos de água doce. Esse resultado revela a necessidade de se estudar a contribuição desses micro-organismos para o ciclo do nitrogênio no ambiente amazônico.
3. Foi possível estimular a atividade metanogênica dos sedimentos, levando inclusive ao estabelecimento de duas cepas metanogênicas em condições de laboratório. Os gêneros cultivados não foram detectados na biblioteca do sedimento de que tiveram origem, indicando que, apesar da quantidade significativa de metano emanado dos sedimentos alagados amazônicos, o grupo de metanogênicas representa uma porção menor da comunidade de arqueias dessas amostras.

REFERÊNCIAS⁵

- ABREU, C. et al. Crenarchaeota and Euryarchaeota in temperate estuarine sediments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 713–718, 2001.
- ACHÁ, D. et al. Sulfate-reducing bacteria in floating macrophyte rhizospheres from a amazonian floodplain lake in Bolivia and their association with Hg methylation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7531-7535, 2005.
- ALVALÁ, P. C.; KIRCHHOFF, V. W. J. H. Methane fluxes from the Pantanal floodplain in Brazil: seasonal variation. In: VAN HAM, J. et al. (Eds.). **Non-CO₂ Greenhouse gases: scientific understanding, control and implementation**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 95-99.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION - AWWA; WATER ENVIRONMENT FEDERATION - WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19th ed. Washington: American Public Health Association, 1995.
- ARAÚJO, J. C. **Biofilmes anaeróbios: desenvolvimento e caracterização filogenética usando a hibridização in situ com sondas fluorescentes**. 189 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
- ASHELFORD, K. E. et al. New screening software shows that most recent large 16s rRNA gene clone libraries contain chimeras. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 5734–5741, 2006.
- AUGUET, J.-C.; BARBERAN, A.; CASAMAYOR, E. O. Global ecological patterns in uncultured Archaea. **The ISME Journal**, v. 4, n. 2, p. 182-190, 2010.
- AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, 2004.
- BALCH, W. et. al. Methanogens: Reevaluation of a unique biological group. **Microbiology Reviews** v. 43, p. 260-269, 1979.
- BANNING, N. et al. Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 947-960, 2005.
- BARKER, H. A. Studies upon the methane-producing bacteria. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 7, p. 420-438, 1936.

⁵ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARNS, S. M. et al. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 91, p. 1609-1613, 1994.

BARNS, S. M. et al. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 93, p. 9188-9193, 1996.

BARTLETT, K. B.; HARRISS, R. C. Review and assessment of methane emissions from wetlands. **Chemosphere**, v.26, p. 261-320, 1993.

BENLLOCH, S. et al. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. **Environmental Microbiology**, v.4, p. 349-360, 2002.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 15-18, 2008.

BERNARDI, J. V. E. et al. Aplicação da análise das componentes principais na ordenação dos parâmetros físico-químicos no alto rio Madeira e afluentes, Amazônia Ocidental. **Geochimica Brasiliensis**, v. 23, n. 1, p. 79-90, 2009.

BINTRIM, S. B. et al. Molecular phylogeny of Archaea from soil. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 94, p. 277-282, 1997.

BOETIUS, A. et al. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. **Nature**, v. 407, p.623-626, 2000.

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

BRASIL. Ministério de Ciência e Tecnologia. **Programa de Grande Escala da Biosfera-Atmosfera na Amazônia - LBA**. Disponível em: < <http://lba.cptec.inpe.br/lba/?p=3>>, Acesso em: 2008.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Agrário. Secretaria do Desenvolvimento Territorial. **Plano territorial de desenvolvimento rural sustentável - Território rural Vale do Juary**. Ariquemes, 2006. 108 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Agência Nacional de Águas. **Mapas hidrológicos**. Disponível em: <<http://hidroweb.ana.gov.br/HidroWeb.asp?TocItem=4010&Procura=false&MapaSel=1>>, Acesso em: 2009.

BRIÉE, C.; MOREIRA, D.; LOPEZ-GARCIA, P. Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. **Research in Microbiology**, v. 158, p. 213-227, 2007.

BROCHIER, C.; FORTERRE, P.; GRIBALDO, S. An emerging phylogenetic core of Archaea: phylogenies of transcription and translation machineries converge following addition of new genome sequences. **BMC Evolutionary Biology**, v. 5, p. 36-43, 2005.

BROCHIER-ARMANET, C. et al. Mesophilic *Crenarchaeota*: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 6, p. 245-262, 2008.

BUCKLEY, D. H.; GRABER, J. R.; SCHMIDT, T. M. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom *Crenarchaeota* and their diversity and abundance in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4333-4339, 1998.

CADILLO-QUIROZ, H. et al. Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 1428-1440, 2006.

CADILLO-QUIROZ, H. et al. Characterization of the archaeal community in a minerotrophic fen and terminal restriction fragment length polymorphism-directed isolation of a novel hydrogenotrophic methanogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 7, p. 2059-2068, 2008.

CADILLO-QUIROZ, H.; YAVITT, J. B.; ZINDER, S. H. *Methanosphaerula palustris* gen. nov., sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from a minerotrophic fen peatland. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 928-935, 2009.

CAIRÓ, J. J. et al. *Methanosarcina mazei* JC2, a new methanogenic strain isolated from lake sediments, that does not use H₂/CO₂. **Microbiologia**, v. 8, n. 1, p. 21-31, 1992.

CHABAN, B.; NG, S. Y. M.; JARRELL, K. F. Archaeal habitats – from the extreme to the ordinary. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 73-116, 2006.

CHIN, K. J. et al. Archaeal community structure and pathway of methane formation on rice roots. **Microbial Ecology**, v. 47, p. 59-67, 2003.

CLEMENTINO, M. M. et al. Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 141-151, 2006.

COHAN, M. F. Towards a conceptual and operational union of bacterial systematic, ecology, and evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 361, p. 1985-1996, 2005.

COLE, J. R. et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D141-D145, 2008.

CONRAD, R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 28, p. 193-202, 1999.

CONRAD, R. Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. **Advances in Agronomy**, v. 96, p. 1-63, 2007.

CONRAD, R.; ERKEL, C.; LIESACK, W. Rice Cluster I methanogens, an important group of Archaea producing greenhouse gas in soil. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 262-267, 2006.

DE LONG, E. F. Archaea in coastal marine environments. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 89, p. 5685-5689, 1992.

DE LONG, E. F. et al. High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. **Nature**, v. 371, p. 695-697, 1994.

DE LONG, E. F. Everything in moderation: Archaea as "nonextremophiles". **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 8, p. 649-654, 1998.

DE LONG, E. F. Microbial Community Genomics in the Ocean. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 3, p. 459-469, 2005.

DE SANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069-5072, 2006.

DEMIRREL, B.; SCHRER, P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 7, p. 173-190, 2008.

DEPPENMEIER, U. et al. The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between Bacteria and Archaea. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 453-461, 2002.

DEVOL, A. H. et al. Seasonal dynamics in methane emissions from the Amazon River floodplain to the troposphere. **Journal of Geophysical Research**, v. 95, n. D10, p. 16417-16426, 1990.

DHILLON, A. et al. Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4592-4601, 2005.

DIANOU, D. et al. *Methanoculleus chikogoensis* sp. nov., a novel methanogenic archaeon isolated from paddy field soil in Japan, and DNA-DNA hybridization among *Methanoculleus*

species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1663-1669, 2001.

DRAKE, H. L.; KÜSEL, K.; MATTHIES, C. Acetogenic Prokaryotes. In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3 ed. New York: Springer, 2006. v. 2, cap. 1.13, p. 354-420.

FEARNSIDE, P. M. Greenhouse gas emissions from a hydroelectric reservoir (Brazil's Tucuruí Dam) and the energy policy implications. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.133, p.69-96, 2002.

FENG, H. et al. Distribution of heavy metal and PCB contaminants in the sediments of an urban estuary: The Hudson River. **Water Science and Technology**, v. 45, p. 69-88, 1998.

FETZER, S.; BAK, F.; CONRAD, R. Sensitivity of methanogenic bacteria from paddy soil to oxygen and dissection. **FEMS Microbiology Ecology**, v.12, p.107-115, 1993.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 3, p. 626-631, 2006.

FLOYD, M. M. et al. Captured diversity in a culture collection: caase study of the geographic and habitat distributions of environmental isolates held at the American Type Culture Collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.6, p.2813-2823, 2005.

FOLK, R. L.; WARD, W. C. Brazol river bar: a study in the significance of grain size parameters. **Journal of Sedimentary Petrology**, v. 27, n. 1, p. 3-26, 1957.

FUHRMAN, J. A.; MCCALLUM, K.; DAVIS, A. A. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature*, v. 356, p. 148-149, 1992.

FUHRMAN, J. A.; MCCALLUM, K.; DAVIS, A. A. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1294-1302, 1993.

FUHRMAN, J.A.; DAVIS, A. A. Widespread archaea and novel bacteria from the deep sea as shown by 16S rRNA gene sequences. **Marine Ecology Progress Series**, v. 150, p. 275-285, 1997.

FURLAN, N.; CALIJURI, M. C. A influência da composição granulométrica sobre os teores de matéria orgânica do sedimento do rio Jacupiranga, Baixo Ribeira de Iguape, SP. In: XVI SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 2008, Ribeirão Preto.

FUTTERER, O. et al. Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 101, p. 9091-9096, 2004.

GALAGAN, J. E. et al. The Genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. **Genome Research**, v. 12, p. 532-542, 2002.

GALAND, P. E. et al. Pathways for methanogenesis and diversity of methanogenic *Archaea* in three boreal peatland ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 2195-2198, 2005.

GALAND, P. E.; LOVEJOY, C.; VINCENT, W. F. Remarkably diverse and contrasting archaeal communities in a large arctic river and the coastal Arctic Ocean. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 44, p. 115-126, 2006.

GARCIA, J. L.; PATEL, B. K. C.; OLLIVIER, B. Taxonomic, Phylogenetic and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. **Anaerobe**, v. 6, p. 205-226, 2000.

GARCIA, J.-L.; OLLIVIER, B.; WHITMAN, W.B. The Order Methanomicrobiales. In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3 ed. New York: Springer, 2006. v.3, cap. 10, p.208-230.

GOMES, J. P. O. et al. Geoquímica de elementos-traço em sólidos em suspensão no alto rio Madeira, Rondônia, Brasil. **Geochimica Brasiliensis**, v. 23, n. 1, p. 49-66, 2009.

GRABOWSKI, A. et al. Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p. 427-443, 2005.

GRIBALDO, S.; BROCHIER, C. Phylogeny of prokaryotes: does it exist and why should we care? **Research in Microbiology**, v. 160, p. 513-521, 2009.

GROSSKOPF, R.; JANSSEN, P. H.; LIESACK, W. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 960-969, 1998.

GROSSKOPF, R.; STUBNER, S.; LIESACK, W. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice *roots* and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4983-4989, 1998.

HAHN, D. et al. Detection of micro-organisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labelled oligonucleotides. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p. 879-887, 1992.

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.

HANSEL, C. M. et al. Changes in Bacterial and Archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1620-1633, 2008.

- HATZENPICHLER, R. et al. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing Crenarchaeote from a hot spring. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 6, p. 2134-2139, 2008.
- HERFORT, L. et al. Diversity of Archaea and detection of crenarchaeotal *amoA* genes in the rivers Rhine and Têt. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 55, p. 189-201, 2009.
- HERSHBERGER, K. L. et al. Wide diversity of Crenarchaeota. **Nature**, v. 384, p. 420, 1996.
- HEUER, H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, 1997.
- HINRICHS, K.-U. et al. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. **Nature**, v. 398, p. 802-805, 1999.
- HIRAISHI, A.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K. Polymerase chain reaction amplification and restriction length polymorphism analysis of 16S rRNA genes from methanogens. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, p. 523-529, 1995.
- HOLMES, A. J. et al. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3312-3318, 1999.
- HUBER, H. et al. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. **Nature**, v. 417, p. 63-67, 2002.
- HUBER, H.; STETTER, K.O. Thermoplasmatales In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3 ed. New York: Springer. 2006, v. 3, cap. 7, p.101-112.
- HUBER, T.; FAULKNER, G.; HUGENHOLTZ, P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. **Bioinformatics**, v. 20, n. 14, p. 2317-2319, 2004.
- HUGENHOLTZ, P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. **Genome Biology**, v. 3, n. 2, p.0003.1-0003.8, 2002.
- INAGAKI, F. et al. Microbial Communities Associated with Geological Horizons in Coastal Subseafloor Sediments from the Sea of Okhotsk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7224-7235, 2003.
- JANSSEN, P. H.; KIRS, M. Structure of the archaeal community of the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3619-3625, 2008.
- JASPERS, E.; OVERMANN, J. Ecological significance of microdiversity: Identical 16S rRNA genes sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and

ecophysiological. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4831-4839, 2004.

JESUS, E. C. et al. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, v. 4, p. 1004-1011, 2009.

JIA, G. D.; PENG, P. A. Temporal and spatial variations in signatures of sedimented organic matter in Lingding Bay (Pearl estuary), southern China. **Marine Chemistry**, v. 82, p. 47-54, 2003.

JOULIAN, C. et al. *Methanobacterium oryzae* sp. nov., a novel methanogenic rod isolated from a Philippines rice field. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 525-528, 2000.

JURGENSE, G.; LINDSTROM, K.; SAANO, A. Novel Group within the Kingdom *Crenarchaeota* from Boreal Forest Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 803-805, 1997.

JURGENSE, G. et al. Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 34, p. 45-55, 2000.

KAMARUZZAMAN, B. Y. et al. Variability of organic carbon content in bottom sediment of Pahang river estuary, Pahang, Malaysia. **Journal of Applied Sciences**, v. 9, n. 24, p. 4253-4257, 2009.

KANINDÉ ASSOCIAÇÃO DE DEFESA ETNOAMBIENTAL, **Uru-Eu-Wau-Wau verbete produzido em parceria com Jupaú - Associação do Povo indígena Uru-Eu-Wau-Wau**. 2003. Disponível em: <<http://pib.socioambiental.org/pt/povo/uru-eu-wau-wau/print>>. Acesso em: 20 nov. 2009.

KEMNITZ, D. et al. Community analysis of methanogenic archaea within a riparian flooding gradient. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 449-461, 2004.

KEMNITZ, D.; KOLB, S.; CONRAD, R. High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 60, p. 442-448, 2007.

KENDALL, M. M. et al. Diversity of *Archaea* in marine sediments from Skan Bay, Alaska, including cultivated methanogens, and description of *Methanogenium boonei* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 407-414, 2007.

KENDALL, M. M.; BOONE, D. R. The Order Methanosarcinales. In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3 ed. New York: Springer, 2006. v. 3, cap. 12, p. 244-256.

KEOUGH, B. P.; SCHMIDT, T. M.; HICKS, R. E. Archaeal nucleic acids in picoplankton from great lakes on three continents. **Environmental Microbiology**, v. 46, p. 238-248, 2003.

KIM, J. S. et al. Archaeal diversity in tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. **Journal of Microbiology**, v. 43, p. 144-151, 2005.

KNITTEL, K. et al. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 467–479, 2005.

KÖNNEKE, M. et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature**, v. 437, p. 543-546, 2005.

KUDO, Y. et al. Methanogen flora of paddy soils in Japan. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22, p.39-48, 1997.

LAI, M.-C. et al. Characterization of *Methanosarcina mazei* N2M9705 isolated from a aquaculture fishpond. **Current Microbiology**, v. 39, p. 79-84, 1999.

LAI, M.-C. et al. *Methanosarcina mazei* strain O1M9704, methanogen with novel tubule isolated from estuarine environment. **Current Microbiology**, v. 41, p. 15-20, 2000.

LEHOURS, A.-C. et al. Phylogenetic diversity of *Archaea* and *Bacteria* in the anoxic zone of a meromictic lake (Lake Pavin, France). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 2016-2019, 2007.

LEHTOVIRTA, L. E.; PROSSER, J. I.; NICOL, G. W. Soil pH regulates the abundance and diversity of Group 1.1c Crenarchaeota. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 70, p. 367-376, 2009.

LEPP, P. W. et al. Methanogenic Archaea and the human periodontal disease. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 101, n. 16, p. 6176-6181, 2004.

LIMA, I. B. T. Biogeochemical distinction of methane releases from two Amazon hydroreservoirs. **Chemosphere**, v. 59, p. 1697-1702, 2005.

LIU, Y.; WHITMAN, W. B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic Archaea. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1125, p. 171-189, 2008.

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

LUDWIG, W. et al. ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 4, 2004.

MACGREGOR, B.J. et al. Crenarchaeota in Lake Michigan sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1178-1181, 1997.

MAH, R. A.; KUHN, D. A. Transfer of the type species of the genus *Methanococcus* to the genus *Methanosarcina*, naming it *Methanosarcina mazei* (Barker 1936) comb. nov. et emend.

and conservation of the genus *Methanococcus* (Approved Lists 1980) with *Methanococcus vannielii* (Approved Lists 1980) as the type species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, P. 263-265, 1984.

MARANI, L. **Estudo da Emissão de Metano no Pantanal Sul-Matogrossense**. 108f. Tese (Doutorado) – Departamento de Geofísica Espacial, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2007.

MARANI, L.; ALVALÁ, P. C. Methane emissions from lakes and floodplains in Pantanal, Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 41, n. 8, p. 1627-1633, 2007.

MASSANA, R. et al. Vertical Distribution and Phylogenetic Characterization of Marine Planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 50-56, 1997.

MELACK, J. M. et al. Regionalization of methane emissions in the Amazon Basin with microwave remote sensing. **Global Change Biology**, v.10, p.530-544, 2004.

MOROZOVA, D.; WAGNER, D. Stress response of methanogenic archaea from Siberian permafrost compared with methanogens from non permafrost habitats. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 61, p. 16-25, 2007.

MORTATTI, J. et al. Biogeochemistry of the Madeira river basin. **GeoJournal**, v.19.4, p.391-397, 1989.

MÜLLER, N. et al. Dominant sugar utilizers in sediment of Lake Constance depend on syntrophic cooperation with methanogenic partner organisms. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1501-1511, 2008.

NELSON, K. A.; MOIN, N. S.; BERNHARD, A. E. Archaeal Diversity and the Prevalence of *Crenarchaeota* in Salt Marsh Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 4211-4215, 2009.

NICOL, G. W. et al. Primary succession of soil *Crenarchaeota* across a receding glacier foreland. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 337-347, 2005.

OCHSENREITER, T.; SELEZI, D.; QUAISER, A. et al. Diversity and abundance of *Crenarchaeota* in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 787-797, 2003.

OUYANG, Y.; ZHANG, J. E.; OU, L.-T. Temporal and spatial distributions of sediment total organic carbon in an estuary river. **Journal of Environmental Quality**, v. 35, p. 93-100, 2006.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, p. 734-740, 1997.

PATEL, N. et al. Fluxes of dissolved and colloidal organic carbon along the Purus and Amazonas rivers, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 229, p. 53-64, 1999.

PAZZINATO, J. M. **Isolamento e identificação de micro-organismos metanogênicos em solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) e de várzea (Gleissolos) da Amazônia Oriental**. 187f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

PESARO, M.; WIDMER, F. Identification of novel *Crenarchaeota* and *Euryarchaeota* clusters associated with different depths layers of a forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 89-98, 2002.

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

PLASENCIA, A. et al. Maintenance of previously uncultured freshwater archaea from anoxic waters under laboratory conditions. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2010. In press.

PRESTON, C. M. et al. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 93, p. 6241-6246, 1996.

QUAISER, A. et al. First insight into the genome of an uncultivated crenarchaeote from soil. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 603-611, 2002.

RAMAKRISHNAN, B. et al. Archaeal community structures in rice soils form different geographical regions before and after initiation of methane production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 37, p. 175-186, 2001.

RASKIN, L. et al. Group-specific 16S rRNA Hybridization Probes to Describe Natural Communities of Methanogens. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1232-1240, 1994a.

RASKIN, L. et al. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 1241-1248, 1994b.

RASTOGI, G. et al. Molecular studies on the microbial diversity associated with mining-impacted Couer d'Alene river sediments. **Microbial Ecology**, v. 58, p. 129-139, 2009.

RIVKINA, E. et al. Biogeochemistry of methane and methanogenic archaea in permafrost. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 61, p.1-15, 2006.

ROBERTSON, C. E. et al. Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 638-642, 2005.

Rondônia (Estado). Secretaria de Estado do Desenvolvimento Ambiental. Núcleo de Sensoriamento Remoto e Climatologia. **Boletim climatológico de Rondônia – 2002**. Porto Velho, 2003. 25 p.

ROSA, L. P. et al. **Primeiro Inventário Brasileiro de Emissões Antrópicas de Gases de Efeito Estufa. Relatórios de referência. Emissões de Dióxido de Carbono e Metano pelos Reservatórios Hidrelétricos Brasileiros**. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia, 2002. 119 p.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAKAI, S. et al. Isolation of key methanogens for global methane emission from rice paddy fields: a novel isolate affiliated with the clone cluster Rice Cluster I. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4326-4331, 2007.

SAKAI, S. et al. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage ‘Rice Cluster I’, and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 929-936, 2008.

SANTANA, P. B. et al. Diversity and three-dimensional structures of the alpha mcr of the methanogenic archaea from the anoxic region of Tucuruí Lake, in eastern Brazilian Amazonia, **Canadian Journal of Microbiology**. In press.

SCHINK, B. Energetics of Syntrophic Cooperation in Methanogenic Degradation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 262-280, 1997.

SCHLEPER, C. Diversity and Ecology of Archaea: Perspectives from microbial ecology and metagenomics. In: KLENK, H.P.; GARRETT, R. (Eds.). **Archaea: Evolution, Physiology and Molecular Biology**. Blackwell Publishing, 2007, cap. 4, p. 39-53.

SCHLEPER, C.; HOLBEN, W.; KLENK, H. P. Recovery of crenarchaeotal ribosomal DNA sequences from freshwater lake sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 321-323, 1997.

SCHLEPER, C.; JURGENS, G.; JONUSCHEIT, M. Genomic analyses of uncultivated Archaea. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 479-488, 2005.

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

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, n. 3, p. 1501-1506, 2005.

SCHWARZ, J. I. K.; ECKERT, W.; CONRAD, R. Community structure of Archaea and Bacteria in a profundal lake sediment Lake Kinneret (Israel). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, p. 239-254, 2007.

SHEPARD, F.P. Nomenclature based on sand-silt-clay ratios. **Journal of Sedimentary Petrology**, v. 24, p. 151-158, 1954.

SHLIMON, A. G. et al., *Methanobacterium aarhusense* sp. nov., a novel methanogen isolated from a marine sediment (Aarhus Bay, Denmark). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 759-763, 2004.

SIMANKOVA, M. V. et al. *Methanosarcina lacustris* sp. nov., a new psychrotolerant methanogenic archaeon from anoxic lake sediments. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 362-367, 2001.

SIMON, H. M.; DODSWORTH, J. A.; GOODMAN, R. M. Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. **Environmental Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 495-505, 2000.

SLIWINSKI, M. K.; GOODMAN, R. M. Spatial heterogeneity of crenarchaeal assemblages within mesophilic soil ecosystems as revealed by PCR–single-stranded conformation polymorphism profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1811-1820, 2004.

SORENSEN, K.B. et al. Community composition of a hypersaline endoevaporitic microbial mat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7352–7365, 2005.

STACKENBRANDT, E.; GOBEL, 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, n. 4, p. 846-849, 1994.

STEIN, L. Y. et al. Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir. **FEMS Microbiology Ecology** v. 42, p. 431-440, 2002.

SUGUIO, K. **Introdução à sedimentologia**. São Paulo: Edgard Blucher, 1973. 317 p.

SUN, Z.; ZHOU, Y.; DONG, X. Characterization and phylogenetics of a new species of genus *Methanobacterium*. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v. 41, n. 3, p. 265-269, 2001.

TAKAI, K. et al. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5750-5760, 2001.

TAKAI, K.; HORIKOSHI, K. Molecular Phylogenetic Analysis of Archaeal Intron-Containing Genes Coding for rRNA Obtained from a Deep-Subsurface Geothermal Water Pool. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5586-5589, 1999.

TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M. The influence of different land uses on the structure of archaeal communities in Amazonian anthrosols based on 16S rRNA and *amoA* genes. **Microbial Ecology**, 2010. In press.

TAMURA, K. et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics**, v. 9, n. 4, p. 299-306, 2008.

TESKE, A.; SORENSEN, K. B.; Uncultured Archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? **The ISME Journal**, v. 2, p. 3-18, 2008.

TOUZEL, J. P.; ALBAGNAC, G. Isolation and characterization of *Methanococcus-mazei* strain MC3. **FEMS Microbiology Letters**, v. 16, n. 2-3, p. 241-245, 1983.

UEDA, T.; SUGA, Y.; MATSUGUCHI, T. Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field. **European Journal of Soil Sciences**, v. 46, p. 415-421, 1995.

UTSUMI, M. et al. Phylogenetic comparison of methanogen diversity in different wetland soils. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 49, p. 75-83, 2003.

VALENTINE, D. L. Adaptation to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 316-323, 2007.

VAZOLLER, R. F. **Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas**. 259 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

VAZOLLER, R. F. **Diversidade Microbiana e Desenvolvimento Sustentável – Microbiologia e Saneamento Ambiental**. Campinas, 1996. 24p. Texto apresentado no Workshop Biodiversidade: Oportunidade e Perspectivas Tecnológicas.

VETRIANI, C. et al. Population Structure and Phylogenetic Characterization of Marine Benthic Archaea in Deep-Sea Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4375-4384, 1999.

VIEIRA, R. P. et al. Archaeal communities in a tropical estuarine ecosystem: Guanabara Bay, Brazil, **Microbial Ecology**, v. 54, p. 460-468, 2007.

WHALEN, S. C. Biogeochemistry of methane exchange between natural wetlands and the atmosphere. **Environmental Engineering Science**, v. 22, n. 1, 2005

WHITMAN, W. B.; BOWEN, T. L.; BOONE, D. R. The Methanogenic Bacteria In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3 ed. New York: Springer, 2006. v. 3, cap. 9, p.165-207.

WOESE, C. R.; FOX, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.

WOLFE, R.S. The Archaea: a personal overview of the formative years. In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3 ed. New York: Springer, 2006. v. 3, cap. 1, p. p.3-9.

WRIGHT, A.-D. G.; PIMM, C. Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 337-349, 2003.

WUEBBLES, D. J.; HAYHOE, K. Atmospheric methane and global change. **Earth-Science Reviews**, v. 57, n.3-4 ,p. 177-210, 2002.

YIN, B. et al. Bacterial functional redundancy along a soil reclamation gradient. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4361-4365, 2000.

ZEIKUS, J. G.; WINFREY, M. R. Temperature limitation of methanogenesis in aquatic sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 99-107, 1976.

ZINDER, S. H.; KOCH, M. No-acetoclastic methanogenesis from acetate: oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. **Archives Microbiology**, v. 138, p. 263-272, 1984.

ZINDER, S. H. Physiological Ecology of Methanogens. In: FERRY, J.G. (Ed.). **Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics**. Chapman and Hall, 1993, cap. 3, p.128-206.

ANEXOS

ANEXO A – Preparo de meio de cultura e soluções para o cultivo de micro-organismos anaeróbios estritos

Tabela A.1- Composição e modo de preparo do meio de cultura basal

Meio Zinder		
<i>Reagentes</i>		<i>Vidraria</i>
NH ₄ Cl	0,5 g	• Erlenmeyer de 2000 mL
KH ₂ PO ₄	0,4 g	• Balão volumétrico – 1000 mL
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g	• Pipetas de vidro e mangueiras de silicone
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05 g	• Frascos de cultivo
Solução traço de metais	10 mL	
Solução de resazurina 0,1%	1 mL	
Água Milli-Q q.s.p.	1000 mL	
<i>Modo de Preparo</i>		
<ul style="list-style-type: none"> - Ferver 1200 mL de água Milli-Q em um erlenmeyer de 2000 mL e esfriar a 40°C; - Verter 500 mL da água em um balão volumétrico de 1000 mL e dissolver os sais e reagentes na ordem descrita na tabela acima; - Completar o volume para 1000 mL, transferir para erlenmeyer de 2000 mL e borbular com nitrogênio (100%) por 30 minutos; - Distribuir o meio nos frascos de cultura (10 mL para os experimentos de isolamento) sob fluxo de nitrogênio, fechar com a tampa de borracha revestida de Teflon ou de borracha de butila e lacrar; - Autoclavar os frascos por 20 min, a 120 °C e 15 psi; - Armazenar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz; - Antes da inoculação, trocar a atmosfera dos frascos para N₂:CO₂ (80:20) e adicionar alíquotas das soluções estoque de bicarbonato de sódio, vitaminas, fontes orgânicas e redutora, utilizando seringa com agulha de insulina. 		

Tabela A.2- Composição e modo de preparo de solução traço de metais para composição do meio de cultura basal

Solução traço de metais		
<i>Reagentes</i>		<i>Vidraria</i>
Ácido nitriloacético (NTA)*	1,5 g	
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,556 g	• Erlenmeyer de 2000 mL
MgSO ₄	0,5 g	• Balão volumétrico – 1000 mL
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g	• Pipetas de vidro e mangueiras de silicone
Na ₂ MoO ₄	0,24 g	• Frascos de cultivo
Na ₂ WO ₂ .2 H ₂ O	0,24 g	
Na ₂ SeO ₃	0,15 g	
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g	
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,01 g	
AlK(SO ₄) ₂	0,01 g	
H ₃ BO ₃	0,01 g	
KOH 10%		
Água Milli-Q q.s.p.	1000 mL	
Modo de Preparo		
<ul style="list-style-type: none"> - dissolver o NTA em 200 mL de água padrão Milli-Q previamente fervida; - acertar o pH para 6,5 com uma solução de KOH 10% m/v e adicionar 600 mL de água Milli-Q padrão; - dissolver os demais sais na ordem apresentada na tabela acima e completar o volume para 1000 mL com água Milli-Q; - ajustar o pH para 7; - esterilizar a solução por filtração em membrana (ver protocolo específico); - distribuir a solução em frascos Schott de 250 mL ou 500 mL e envolver os frascos com papel alumínio; - armazenar sob refrigeração e ao abrigo da luz. 		
<ul style="list-style-type: none"> - * em caso de precipitação, reiniciar adicionando 0,5 g de NTA a mais. 		

Tabela A.3- Composição e modo de preparo da solução de resazurina, indicadora de potencial de óxido-redução do meio de cultura

Solução Indicadora de Resazurina 0,1% (m/v)		
<i>Reagentes</i>	<i>Vidraria</i>	
Resazurina	0,1 g	• Béquer
Água Milli-Q q.s.p.	100 mL	• Balão volumétrico – 100 mL
		• Frasco âmbar
<i>Modo de Preparo</i>		
<ul style="list-style-type: none"> - diluir a resazurina em 80 mL de água Milli-Q; - verter a solução em balão volumétrico e completar o volume para 100 mL; - armazenar em frasco âmbar sob refrigeração. - Não necessita esterilização. 		

Tabela A.4- Composição e modo de preparo da solução de acetato de sódio

Solução estoque de acetato de sódio 2 moles.L⁻¹		
<i>Reagentes</i>	<i>Vidraria</i>	
Acetato de sódio	68,04 g	• Balão volumétrico – 250 mL
Água Milli-Q q.s.p.	250 mL	• Erlenmeyer
		• Pipeta de vidro e mangueira de silicone
		• Frascos de antibiótico
		• Batoques de borracha e lacres de alumínio
<i>Modo de Preparo</i>		
<ul style="list-style-type: none"> - Dissolver o sal em 250 mL de água Milli-Q; - Aferir o volume necessário no balão volumétrico; - Transferir a solução para um Erlenmeyer; - Borbulhar nitrogênio 100% por 20 minutos; - Distribuir 10 mL da solução nos frascos de antibiótico de 30 mL sob fluxo de nitrogênio 100%; - Tampar os frascos com batoques de borracha de butila e lacrar com anéis de alumínio; - Esterilizar os frascos por autoclavação por 20 minutos a 121 °C e 15 psi; - Armazenar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. 		

Tabela A.5- Composição e modo de preparo da solução de bicarbonato de sódio

Solução Bicarbonato de Sódio 10% (m/v)		
Reagentes		Vidraria
Bicarbonato de sódio	10 g	<ul style="list-style-type: none">• Balão volumétrico de 100 mL• Béquer• Erlenmeyer de 250 mL• Pipetas de vidro e mangueira de silicone estéreis• Frascos de antibiótico de 30 ou 50 mL• Vidraria para esterilização por filtração (ver protocolo específico)
Água Milli-Q q.s.p.	200 mL	
Modo de Preparo		
<ul style="list-style-type: none">- Ferver, por 5 minutos, 80 mL de água Milli-Q em um Erlenmeyer para auxiliar a expulsão do oxigênio do meio líquido e então esfriar a 40 °C;- Pesar o bicarbonato em béquer de vidro.- Dissolver o sal com um pouco da água Milli-Q. Caso a dissolução esteja difícil, aquecer a mistura, mas sem deixar ferver, pois o bicarbonato de sódio precipita.- Completar o volume com o restante da água Milli-Q em balão volumétrico de 100 mL.- Esterilizar a solução por filtração em membrana.- Borbulhar com N₂ (100%) por 20 minutos.- Distribuir 15 ou 25 mL da solução em frascos de antibiótico de 30 ou 50 mL respectivamente, sob fluxo de N₂ (100%), fechar com batoques de butila, ainda sob fluxo do gás e lacrar com anéis de alumínio.- Autoclavar os frascos por 20 minutos a 121 °C e 15 psi.- Envolver os frascos em papel alumínio.- Etiquetar e armazenar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.		

Tabela A.6- Composição e modo de preparo da solução de vitaminas para composição do meio de cultura basal

Solução de Vitaminas		
<i>Reagentes</i>		<i>Vidraria</i>
Biotina	0,002 g	<ul style="list-style-type: none"> • Erlenmeyer – 2000 mL • Frascos para estoque • Pipetas de vidro e mangueira de silicone estéreis • Vidraria para esterilização por filtração (ver protocolo específico)
Ácido fólico	0,002 g	
Tiamina.HCl	0,005 g	
Riboflavina	0,005 g	
Ácido nicotínico	0,005 g	
Pantetonato de cálcio	0,005 g	
Piridoxina.HCl	0,010 g	
Vitamina B ₁₂	0,0001 g	
Ácido lipóico (tióico)	0,005 g	
<i>Modo de Preparo</i>		
<ul style="list-style-type: none"> - Ferver por 5 minutos um volume de 800 mL de água Milli-Q em um Erlenmeyer de 2000 mL. - Introduzir fluxo de gás nitrogênio (100%) no erlenmeyer. - Dissolver as vitaminas no volume de água fervido e resfriado a 40 °C, na ordem descrita. - Completar o volume para 1000 mL com água Milli-Q previamente fervida e mantida sob fluxo de N₂. - Esterilizar a solução por filtração através de sistema Millipore com membrana de 0,22 µm. - Borbulhar com nitrogênio por 20 minutos; - Distribuir a solução em frascos de antibiótico de 150 mL, sob fluxo de nitrogênio 100%, fechar os frascos com batoques de butila e lacrar com anéis de alumínio; - Envolver os frascos em papel alumínio e armazená-los sob refrigeração a 4 °C. 		

Tabela A.7- Composição e modo de preparo da solução de metanol

Solução estoque de metanol 2 moles.L ⁻¹		
Reagentes		Vidraria
Metanol (99,9%)	20 mL	<ul style="list-style-type: none">• Erlenmeyer – 250 mL• Pipeta de vidro e mangueira de silicone• Frascos de antibiótico – 30 e 50 mL• Batoques de borracha de butila e lacres de alumínio• Seringas descartáveis estéreis
Água Milli-Q q.s.p.	100 mL	
Modo de Preparo		
<ul style="list-style-type: none">- Colocar 100 mL de água Milli-Q em um Erlenmeyer e borbulhar com nitrogênio 100% por 15 minutos.- Distribuir alíquotas de 9,2 mL de água em frascos de antibiótico, lacrar e esterilizar em autoclave (20 minutos, 121 °C, 15 psi).- Borbulhar nitrogênio 100% em 20 mL de metanol (99,9%) contidos em frascos de antibiótico de 50 mL por 3 minutos.- Lacrar e autoclavar o frasco por 20 minutos, a 121 °C e 15 psi.- Transferir com seringas descartáveis previamente lavadas com nitrogênio, sob condições de assepsia, alíquotas de 0,8 mL do metanol para os frascos de antibiótico contendo a água Milli-Q.		

Tabela A.8- Composição e modo de preparo da solução de sulfeto de sódio, empregada como agente redutor no meio de cultura

Solução Redutora de Sulfeto de Sódio 5% (m/v)		
<i>Reagentes</i>		<i>Vidraria</i>
Na ₂ S.9H ₂ O	5,0 g	• Erlenmeyer – 250 mL
Água Milli-Q	100 mL	• Frascos de antibiótico – 30 mL
<i>Modo de Preparo</i>		
<ul style="list-style-type: none"> - ferver por 5 minutos, um volume de 100 mL de água Milli-Q em um Erlenmeyer de 250 mL; - esfriar a 40 °C, introduzir fluxo de gás nitrogênio 100%; - antes de pesar o cristal de Na₂S.9H₂O, esse deve estar limpo. A limpeza deve ser feita colocando certa quantidade do sal em papel filtro grosseiro, deve-se então lavar o sal com água destilada, secá-lo e tritirá-lo. A pesagem deve ser feita logo antes do preparo da solução, pois o sal é muito higroscópico. - Dissolver o sal em 20-30 mL de água Milli-Q previamente fervida e mantida sob fluxo de nitrogênio 100%; - acrescentar o sal dissolvido no volume de água contido no Erlenmeyer sob fluxo de nitrogênio e completar o volume para 100 mL; - borbulhar com nitrogênio 100% por 20 minutos; - distribuir 15 mL da solução em frascos de antibiótico de 30 mL, sob fluxo de nitrogênio 100%; - fechar com tampas de borracha de butila e lacrar com anéis de alumínio; - armazenar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. 		

Tabela A.9- Procedimento empregado para esterilização por filtração de soluções anaeróbias sensíveis a autoclavagem

Esterilização a frio em sistema Millipore	
<i>Vidraria</i>	
<ul style="list-style-type: none">• conjunto de filtração• membrana de 0,22 µm• pipeta – 10 mL• mangueira de silicone• unidades de filtração Millex[®] de 0,22 µm de poro• frascos para estoque estéreis• tampas de borracha de butila e lacres	
<i>Método</i>	
<ul style="list-style-type: none">- Manter o forno removedor de oxigênio ligado à temperatura de 300 °C e acender um bico de Bunsen próximo ao sistema de filtração.- Acoplar a saída lateral do kitassato à mangueira e conectá-la à bomba de vácuo.- Inserir o suporte de membrana na extremidade superior do kitassato, colocar a membrana, com auxílio de pinça estéril, e acoplar o copo de filtração.- Ligar o vácuo e proceder à filtração da solução.- Desligar o vácuo, retirar o copo de filtração e o suporte da membrana da extremidade superior do kitassato e introduzir fluxo de nitrogênio 100% por 20 minutos, utilizando pipeta invertida acoplada à mangueira de silicone (ambos autoclavados).- Distribuir, sob fluxo de nitrogênio (100%), alíquotas da solução esterilizada em frascos para estoque previamente esterilizados. Importante: nesse estágio, o fluxo de nitrogênio deve passar por membranas filtrantes (Millex[®]) para evitar a contaminação da solução estéril.- Caso a solução seja armazenada em frascos de antibiótico, fechá-los com batoques de butila, sob fluxo de nitrogênio (100%), e lacrá-los com anéis de alumínio- Caso a solução seja armazenada em frasco Schott, fechá-lo com batoque de butila e lacrar com tampa de rosca.	

ANEXO B – Hibridização Fluorescente in situ e coloração de DAPI

1 Fixação das amostras

1. Transferir 1,5 mL da cultura para um tubo e centrifugar por dois minutos a 13.000 rpm. Se necessário, lavar uma vez a amostra com PBS 1x antes do próximo passo.
2. Ressuspender o pellet em 200 μ L de PBS 1x e adicionar 600 μ L de tampão de fixação.
3. Agitar bem e manter em banho de gelo por 2 horas.
4. Lavar a amostra duas vezes com PBS 1x.
5. Após a última lavagem, ressuspender o pellet em 300 μ L de PBS 1x e 300 μ L de etanol absoluto gelado (pós-fixação).
6. Guardar em freezer (-20 °C) até o momento do uso.

2 Hibridização e coloração DAPI

1. Colocar alíquotas de 1-10 μ L (dependendo da densidade celular) nos pocinhos da lâmina, distribuindo a amostra por todo o pocinho com a ponteira.
2. Colocar a lâmina em estufa a 45 °C, por 20 minutos (a temperatura mais alta aumenta a quantidade de células que se aderem à lâmina).
3. Passar a lâmina por banhos de álcool 50%, 70% e 100%, em tubos de centrífuga de 50 mL (3 minutos por banho). Usar uma pinça para transferir a lâmina de um banho para outro.
4. Secar a lâmina ao ar livre.
5. Enquanto a lâmina seca, colocar um pedaço de papel filtro ou toalha em um tubo de centrífuga de 50mL, revestido por fora com papel alumínio, embeber o filtro com 2 mL de tampão de hibridização, tampar e deixar em estufa a 45 °C até o momento do uso (é importante deixar pelo menos uns 5 minutos para criar uma atmosfera úmida no interior do tubo).

Obs.: esse procedimento é feito uma vez. A mesma câmara pode ser usada para várias hibridações. Deve-se checar somente se o papel está bem embebido no tampão, para garantir que a atmosfera ficará devidamente saturada.

6. Depois de seca a lâmina, colocar em cada pocinho 9 μ L de tampão de hibridização e 1 μ L de sonda (concentração de 25 a 50 ng/ μ L). Após acrescentar a sonda, misturar os dois delicadamente, utilizando a aspiração da pipeta. Usando a ponteira em posição

horizontal, espalhar bem a mistura de tampão e sonda pelo pocinho (lembrar de trocar de ponteiros entre pocinhos para não haver contaminação).

7. Colocar a lâmina no tubo com o papel embebido em tampão e deixar em estufa por 2 horas a 45 °C para ocorrer a hibridização.
8. Passado o tempo de hibridização, lavar delicadamente a lâmina com 800 µL de solução de lavagem (usar micropipeta). Em seguida, mergulhar a lâmina em um tubo falcon contendo o mesmo tampão e manter em estufa a 48 °C por 20 minutos (geralmente utiliza-se 15 a 20 minutos para a lavagem; o mínimo que se deve deixar na solução é 10 minutos).
9. Lavar a lâmina gentilmente com água destilada para retirar os sais e o SDS (não deixar cair água diretamente sobre os pocinhos e esperar secar a temperatura ambiente e no escuro).
10. Adicionar em cada pocinho 9 µL de água destilada estéril e 1 µL de uma solução de 10 µg/mL de DAPI. Espalhar como descrito no item 6. Deixar cerca de 10 minutos, enxaguar delicadamente com água destilada e deixar secar à temperatura ambiente e no escuro.
11. Colocar sobre cada pocinho 2,5 a 3,0 µL de uma solução de PBS:glicerol 20:80 e cobrir com lamínula, tomando o cuidado para não fazer bolhas. Se não for observar em seguida, guardar a lâmina em geladeira, protegida da luz.

3 Soluções e Reagentes

Tabela B.1- Modo de preparo da solução de Tris.HCl

Tris.HCl 1M pH7,2	PM 157,64
<i>Modo de Preparo</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Dissolver 15,76 g de Tris HCl em 80 mL de água. - Ajustar o pH para 7,2 com NaOH (4M) e completar o volume com água destilada. - Dividir em alíquotas e autoclavar. 	

Tabela B.2- Modo de preparo da solução de cloreto de sódio

NaCl 5M	PM 58,44
<i>Modo de Preparo</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Dissolver 116,88 g de NaCl em 400 mL de água destilada. - Colocar em frasco Schott de 500 mL e autoclavar. 	

Tabela B.3- Modo de preparo da solução de EDTA

EDTA 0,5M	PM 372,24
<i>Modo de Preparo</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Colocar 18,61 g de EDTA em 80 mL de água destilada e agitar vigorosamente em agitador magnético. - Ajustar o pH para 8,0 com pastilhas de NaOH (cerca de 2 g). - Dividir em alíquotas e autoclavar. 	
Obs.: o EDTA só solubiliza quando o pH é ajustado para 8.	

Tabela B.4- Modo de preparo da solução de SDS

SDS 20%
<i>Modo de Preparo</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Dissolver 10 g em 40 mL de água destilada. - Aquecer a 68 °C para dissolver. - Ajustar o pH para 7,2 adicionando algumas gotas de HCl concentrado. - Completar o volume para 50 mL. - Obs.: usar máscara ao pesar o SDS e limpar bem a área de trabalho após a pesagem. Não é necessário autoclavar o SDS nessa concentração

Tabela B.5- Concentração dos reagentes empregados para composição dos tampões de lavagem e de hibridização empregados

Tampões para hibridização e lavagem		
Reagentes	Tampão de hibridização	Tampão de lavagem
NaCl	52,60 g	--
Tris.HCl 1 M	20 mL	20 mL
SDS 20%	0,5 mL	0,5 mL
EDTA 0,25 M	40 mL	40 mL
NaCl 2,5 M	--	Variável ²
Formamida	Variável ¹	--
Água destilada	q.s.p. 1000 mL	q.s.p. 1000 mL

1. A quantidade varia para cada sonda - consultar a tabela 6 desse anexo; 2. Proporcional à quantidade de formamida adicionada ao tampão de hibridização – consultar tabela 6 desse anexo. **Obs.:** tanto a formamida quanto o NaCl aumentam a especificidade da sonda. Assim, as quantidades adicionadas de cada um são inversamente proporcionais.

Tabela B.6- Concentração dos agentes desnaturantes nos tampões e condições de incubação para as etapas de hibridização e lavagem para as sondas empregadas nesse trabalho

Sonda	Organismo alvo	Hibridização	Formamida	Lavagem	NaCl	Referência
ARC915	Arqueias (geral)	45 °C/2 h	20%	48 °C por 20 min	225 mM	Hahn et al., 1992
MB1174 MB310 MSMX860 MG1200 MC1109	Grupos metanogênicos	37 °C/4 h	40%	37 °C por 30 min	(utilizar tampão de hibridização para lavagem)	Raskin et al., 1994b.

Modificado de Araújo, J.C., 2001.

Tabela B.7- Modo de preparo da solução de DAPI

Solução de DAPI 10x (100 µg/mL)

Modo de Preparo

- Dissolver 1 mg de DAPI em 10 mL de água destilada.
- Colocar alíquotas de aproximadamente 1 mL em microtubos cobertos com papel alumínio.
- Guardar em geladeira e diluir 1:10 no momento do uso.

Obs.:o DAPI é um composto mutagênico e deve ser manuseado com cuidado.

ANEXO C – Iniciadores e sondas empregados

Tabela 1: Iniciadores e sondas empregadas nesse trabalho.

Finalidade	Iniciador	Sequência (5'→3')	Especificidade	Referência
Construção das bibliotecas	108r	ACK GCT CAG TAA CAC GT	Arquaria	Grocock et al., 1998
	915r	GTG CTC CCG CGC CAA TTC CT		
Amplificação do vetor	M13F	GTT TTC CCA GTC ACG AC	pGEM®-T Easy Vector (Promega)	pGEM®-T Easy Vector Protocol (Promega)
	M13r	CAG GAA ACA GCT ATG AC		
Sequenciamento do inseto no vetor	T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Arquaria	Beallock et al., 2002
Amplificação e sequenciamento do gene para o rRNA 16S de metazoogênicas cultivadas	344F	ACG GGG YGC AGC AGG CGC GA		
Amplificação e sequenciamento do gene para o rRNA 16S de bacterias cultivadas	1400r	CXG CXG CTT CGT GCA AGG AGC AGG GAC	Arquaria	Endo et al., 1997
	27r	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG		
Amplificação e sequenciamento do gene para o rRNA 16S de bacterias cultivadas	1401r*	CXG TGT GTA CAA GGC CXG GGA ACX	Bacteria	Heur et al., 1997
Sondas para famílias de metazoogênicas	MSMK860	GGC TCG CTT CAC GGC TTC CCT	<i>Mathanotritoma</i>	Rashin et al., 1994 ^b
	MCI109	GCA ACA TAG GGC ACG GGT CT		
	MB310	CTT GTC TCA GGT TCC ATC TCC G		
	MG1200	CGG ATA ATT CCG GGC ATG CTG		

ANEXO D – Medidas de emissão de metano in situ

Para complementação da caracterização do ambiente de estudo, objetivou-se a medida da emissão de metano na superfície do Rio Floresta. Devido ao pouco tempo disponível para essas medidas em campo e a alta proporção de perdas amostrais por essa técnica, como discutido abaixo, os resultados obtidos não foram significativos para compor o corpo da tese. No entanto, cabe notar a obtenção de algumas medidas com alta concentração de metano no ambiente, permitindo inferir a atividade metanogênica ocorrendo nesse ambientes.

O gás emanado na superfície da coluna d'água do rio Floresta foi amostrado através do método de câmara estática, conforme orientação do Prof. Dr. Plínio Carlos Alvalá do INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. O método consiste na colocação de uma câmara construída em PVC, com abertura voltada para baixo, boiando sobre a superfície do corpo aquático (Figura D.1). Uma saída na câmara se conecta a uma mangueira por onde são retiradas amostras do gás acumulado na câmara. As amostras foram levadas ao Laboratório de Ozônio, no INPE, e analisou-se a composição do gás por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama – FID (Shimadzu, GC-14A) (MARANI e ALVALÁ, 2007). A área do pico de metano obtida nas amostras foi comparada com a área obtida para a injeção de metano na concentração padrão atmosférica ($1749,4 \pm 4,5$ ppbv) e o valor obtido em ppb foi convertido em $\text{mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ através do procedimento descrito em Marani, 2007.

Figura D.1- Esquema do método de câmara estática empregado no rio Floresta para captura de gases emitidos pelo corpo d'água.

FONTE: Marani, 2007.

A estimativa da emissão de metano de um corpo d'água para a atmosfera ao longo de períodos de tempo, como dias ou anos, requer que dados obtidos em pequenos intervalos de tempo e pequena área sejam extrapolados para o período de tempo desejado e para a área total do corpo d'água. Para que tal extrapolação seja feita, os dados obtidos devem obedecer a duas premissas: 1 – a concentração de metano no interior da cúpula no tempo zero deve ser próxima à concentração de metano atmosférica (aproximadamente 1700 ppb) e 2 – a variação temporal da concentração de metano no interior da cúpula deve ser linear ($r^2 \geq 0.90$, ALVALÁ e KIRCHOFF, 2000) para que a medida seja considerada válida para o fluxo difusivo. Caso essa segunda premissa não seja alcançada, mas a primeira esteja presente, é possível considerar a medida como sendo de um fluxo ebulitivo (através de bolhas) e o cálculo feito é de um fluxo médio, comparando-se a concentração inicial e final de metano no interior da cúpula.

A obtenção de dados que obedeçam às premissas mencionadas é bastante difícil devido aos diversos fatores ambientais que podem alterar a posição da cúpula na superfície da água, como correntes, vento e galhos. Também a presença de animais na coluna d'água pode afetar a emissão capturada pela cúpula. Nesse trabalho, é também importante destacar que foi preciso transportar as seringas com amostras por via aérea, o que pode ter acarretado a perda de algumas amostras. No rio Floresta foram realizadas medidas para 13 fluxos e nenhum deles foi totalmente válido, devido aos fatores já mencionados. Tal fato não foi surpreendente, uma vez que normalmente são necessárias centenas de coletas para a obtenção de uma quantidade significativa de fluxos válidos (MARANI, 2007). Apenas um dos fluxos pode ser considerado como ebulitivo e pouco afetado por erros ou fatores ambientais no momento da medida (Figura D.2).

Figura D.2- Concentração de metano acumulada no interior da cúpula ao longo do tempo em um ponto no Rio Floresta.

O fluxo calculado através dessa coleta, de $619 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, é superior a valores encontrados para estimativas de emissão de metano por planícies alagadas amazônicas tanto na seca ($7\text{-}131 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) quanto na cheia ($192\text{-}230 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) (WHALEN, 2005) quando são considerados os fluxos difusivos. É também superior à estimativa para a planície amazônica como um todo, considerando suas diferentes coberturas vegetais, de $148 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ (BARTLETT e HARRISS, 1993) e às medidas de emissão de metano empregadas por Melack et al. (2004), que concluíram que toda a planície alagada amazônica emite cerca de $22 \text{ TgCH}_4 \text{ ano}^{-1}$.

No entanto, considerando-se que o fluxo empregado para o cálculo de emissão é ebulitivo, o valor é comparável a algumas medidas de fluxos ebulitivos realizadas em lagoas do Pantanal (MARANI e ALVALÁ, 2007), cujos valores variaram entre 1 e $2187 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, com média de $292 \pm 410 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$. A emissão ebulitiva é episódica, mas, como dessa forma grandes quantidades de metano são emitidas, pode ser responsável por até 90% do total de metano emitido por um corpo d'água (MARANI e ALVALÁ, 2007).

Neste trabalho, a medida apresentada serve como confirmação da emissão de metano pelo Rio Floresta, pois o dado é insuficiente para qualquer extrapolação além do ponto e do momento no qual foi feita a amostragem.