

DIEGO ARMANDO CASTILLO FRANCO

**DIVERSIDADE FILOGENÉTICA E FUNCIONAL MICROBIANA EM
ÁREAS GEOTERMAIS NO ESTREITO DE BRANSFIELD, PENÍNSULA
ANTÁRTICA**

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

São Paulo
2019

DIEGO ARMANDO CASTILLO FRANCO

**DIVERSIDADE FILOGENÉTICA E FUNCIONAL MICROBIANA EM
ÁREAS GEOTERMAIS NO ESTREITO DE BRANSFIELD, PENÍNSULA
ANTÁRTICA**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Vivian Helena Pellizari

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital De Teses De Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

2019

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

© reprodução total

Franco, Diego Armando Castillo.

Diversidade filogenética e funcional microbiana em áreas geotermiais no estreito de Bransfield, Península Antártica / Diego Armando Castillo Franco. -- São Paulo, 2019.

Orientador: Profa. Dra. 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: Ecologia microbiana.

Versão do título para o inglês: Phylogenetic and functional microbial diversity in geothermal areas at Bransfield Strait, Antarctic Peninsula.

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

ICB/SBIB081/2019

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

Candidato(a): Diego Armando Castillo Franco

Titulo da Tese: Diversidade filogenética e funcional microbiana em áreas geotermais no Estreito de Bransfield, Península Antártica

Orientador: Vivian Helena Pellizari.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CEEA-IOUSP
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Instituto Oceanográfico - USP

PARECER SOBRE PROTOCOLO DE PESQUISA COM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O projeto de doutorado de Diego Castillo Franco, orientado pela Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari, estudará a biodiversidade filogenética e funcional de áreas geotermiais no Estreito de Bransfield, Península Antártica conforme protocolo descrito abaixo:

Especies estudadas:

Dominios Bacteria e Archaea

Quantidade: 12 amostras de sedimento (10g/amostra)

Tipo de experimento:

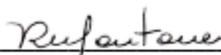
Extração de DNA/RNA dos microorganismos que habitam áreas de atividade geotermal usando kits específicos com o objetivo de determinar a diversidade filogenética e funcional dessas áreas no Estreito de Bransfield.

geração de resíduo

Há geração de resíduos sólidos que serão incinerados seguindo o protocolo de descarte hospitalar

A Comissão de Ética em Experimentação Animal do IOUSP entende que o parecer não se aplica nesse estudo uma vez que abordará bactérias e arqueias e não haverá experimentos. Dessa maneira o protocolo de pesquisa não infringe os princípios éticos de experimentação com animais elaborados pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

São Paulo, 15 de dezembro de 2014.



Prof. Dra. Rosalinda Carmela Montone
Comissão de Ética em Experimentação Animal do IOUSP
Presidente

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

AGRADECIMENTOS

Ao BRASIL e ao povo brasileiro por ter me acolhido e por ter me ensinado tantas coisas novas, obrigado por ser meu segundo lar.

À minha mãe Clara, à minha irmã, ao meu irmão e aos meus sobrinhos por serem o combustível e a motivação todos os dias

À Dra. Vivian Helena Pellizari pelas inúmeras oportunidades, pela torcida e pela amizade ao longo desses anos.

À Universidade de São Paulo, ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia e ao Instituto Oceanográfico, aos professores, alunos e funcionários pela oportunidade de formação e pela ajuda prestada.

A todos os alunos e ex-alunos do LECOM pela força, ajuda e paciência

Ao Dr. Stefan Sievert pela oportunidade de aprender no seu laboratório, pela amizade e por compartilhar a mesma paixão pelo futebol.

Ao Banco Santander e à Pró-Reitoria de Pós-Graduação da USP pelo apoio financeiro para realizar o estágio no exterior.

Ao Instituto de Ortopedia de Traumatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

À Secretaria Interministerial de recursos do mar (SECIRM), ao Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR), ao Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), à Força Aérea Brasileira (FAB) e à Marinha do Brasil pelo apoio logístico e financeiro durante as coletas.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente durante esses 4 anos de crescimento profissional e pessoal, isto aqui é para você. Obrigado mesmo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Um agradecimento especial à agência de fomento CAPES pela bolsa de estudos concedida via programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia. Período 03/2015 – 02/2019

“Choose Life...”

Mark Renton

RESUMO

FRANCO, D. C. **Diversidade filogenética e funcional microbiana em áreas geotermiais no estreito de Bransfield, Península Antártica.** 2019. 82 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O estreito de Bransfield é uma bacia marginal formada por um processo de rifteamento da crosta continental onde são encontrados montes submarinos de origem vulcânica. Sítios hidrotermais no Estreito de Bransfield, especificamente Hook Ridge (HR) tem sua importante localização na distribuição de comunidades quimiossintéticas dentre os oceanos Atlântico, Índico e Pacífico. Estudos prévios nesta região descreveram a macrofauna em Hook Ridge, no entanto, informações relacionadas com as comunidades microbianas que habitam esse sítio geotermal são escassas, assim como os estudos comparando as diferenças entre a estrutura microbiana dos sedimentos em áreas sem e com influência de atividade hidrotermal. Para descrever a diversidade filogenética e funcional de sedimentos marinhos influenciados pela atividade hidrotermal, foram empregadas as técnicas de sequenciamento do gene do RNAr 16S e metagenoma. No Estreito de Bransfield foram selecionados cinco pontos amostrais para coleta do sedimento marinho, denominados: HR6 (1190 m de profundidade), HR4 (1090m), BR1 (Ilha Bridgeman – 707m), 3S (Three Sisters – 1188 m) e AXE (520m). A atividade hidrotermal em HR6 é caracterizada por ser um fluido difuso a baixa temperatura (~20 °C) e efêmera. A amostra HR6 apresentou filotipos como *Acetothermia*, *Aerophobetes*, *Aminicentantes*, *Atribacteria* e *Campylobacteria*, decritos previamente em ambientes geotermiais e quimiossintéticos. Além do mais, novos filos de *Archaea* (*Aenigmarchaeota*, *Altiarchaeales*, *Hadesarchaea* and *Asgardaeota*), recentemente descritos como quimiolitototróficos, foram encontrados exclusivamente em HR6, mostrando um perfil de comunidade microbiana único nesta amostra. Genes envolvidos com vias de fixação de carbono incluindo o ciclo dos ácidos tricarbóxicos reverso (rTCA), via Wood-Ljungdahl e o ciclo 3-Hydroxypropionate/4-Hydroxybutyrate foram identificados em maior proporção em HR6. Os resultados deste estudo confirmam a presença de comunidades microbianas quimiolitototróficas e seu potencial como fixador de carbono em Hook Ridge, atestando haver fonte de exsudação potencialmente ativa na região.

Palavras-chave: Antártica. Diversidade microbiana. Quimiossíntese. Fontes hidrotermais

ABSTRACT

FRANCO, D. C. **Phylogenetic and functional microbial diversity in geothermal areas at Bransfield Strait, Antarctic Peninsula.** 2019. 82 p. PhD thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Bransfield Strait is a marginal basin that was formed by rifting and it hosts a chain of submerged seamounts of volcanic origin. Hydrothermal sites in the Bransfield Strait, such as Hook Ridge (HR), potentially provide a stepping stone between chemosynthetic communities in the Atlantic, Indian and Pacific Oceans. While previous studies have described the macrofauna at the hydrothermally active Hook Ridge, limited information currently exists on the microbial communities inhabiting these sediments, and how they differ from non-hydrothermal deep-sea sediments in the Southern Ocean. Here, we used 16S rRNA sequencing and shotgun metagenomics to describe and compare microbial communities of deep-sea sediments influenced by hydrothermal activity with non-venting areas of the Bransfield Strait. Sediment samples were collected at three different volcanic edifices: Three Sisters (1188 mbsl), HR4 (1090 mbsl), HR6 (1190 mbsl), and near the subaerial volcano Bridgeman Island (707 mbsl). Hydrothermal activity at HR6 is characterized by diffuse flow at low temperatures ($\sim 20^{\circ}\text{C}$) and appears to be ephemeral. Samples from HR6 showed bacterial phylotypes such as Acetothermia, Aerophobetes, Aminicentantes, Atribacteria and Campylobacteria, described in geothermal and chemosynthetic environments. In addition, new archaeal phyla (Aenigmarchaeota, Altiarchaeales, Hadesarchaea and Asgardaeota), recently described as chemolithoautotrophs, were exclusively found at HR6, contributing to an unique microbial community profile of that sample. Genes related with carbon fixation pathways, including reductive tricarboxylic acid cycle (rTCA), Wood-Ljungdahl pathway, and the 3-Hydroxypropionate/4-Hydroxybutyrate Cycle, were identified at HR6, providing further support for hydrothermal activity. Our study confirmed the presence of a chemosynthetic microbial community and the potential for dark carbon fixation at Hook Ridge.

Keywords: Antarctica. Microbial diversity. Chemosynthesis. Hydrothermal Vents

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global das fontes hidrotermais segundo a base de dados da InterRidge. Fonte https://vents-data.interridge.org/maps	22
Figura 2 - Dinâmica da distribuição das comunidades e dos nutrientes presentes na exsudação quente Fonte: Adaptado de DICK et al., 2019.	23
Figura 3 - Mapa do Estreito de Bransfield e Passagem de Drake mostrando a localização das amostras.	32
Figura 4 – Abundância relativa dos filos mais abundantes de Bacteria (>0.1%) nas amostras de sedimento	43
Figura 5 – Abundância relativa dos filos mais abundantes de Archaea (>0.1%) nas amostras de sedimento.	43
Figura 6 - Non-metric multidimensional scaling (nMDS) ordination based on weighted UniFrac distance, with plotting of environmental parameters for bacterial (A) and archaeal (B) communities.	45
Figura 7 – Correlação de Spearman entre las 30 OTUs mas abundantes de Bacteria em todas as amostras (A), e exclusivamente em HR6 (B) com os parâmetros ambientais. Cor azul representa correlações positivas e cor vermelha correlações negativas.	46
Figura 8 - . Correlação de Spearman entre las 30 OTUs mas abundantes de Archaea em todas as amostras (A), e exclusivamente em HR6 (B) com os parâmetros ambientais. Cor azul representa correlações positivas e cor vermelha correlações negativas.	47
Figura 9 – Heatmap exibindo os grupos taxonômicos das amostras de sedimento do Estreito de Bransfield.	50
Figura 10 – Heatmap exibindo o perfil funcional das amostras de sedimento do Estreito de Bransfield baseado no nível 1 do SEED- <i>subsystems</i>	51
Figura 11 – Proporção dos genes chave que codificam as proteínas envolvidas com a fixação de carbono. Cada bolha representa a abundância relativa do gene comparado com o número total de genes analisados no metagenoma	52
Figura 12 – Proporção dos genes chave que codificam as proteínas envolvidas com o metabolismo do enxofre.	55
Figura 13 – Proporção dos genes chave que codificam as proteínas envolvidas com o metabolismo do nitrogênio.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das amostras coletadas no Estreito de Bransfield durante a OPERANTAR XXXIII.	38
Tabela 2 - Características mineralógicas e geoquímicas das amostras.	39
Tabela 3 - – Índices de Alfa-diversidade para cada amostra, incluindo o índice de riqueza <i>abundance-based coverage estimator</i> (ACE), índice de diversidade Simpson e o número total de OTUs.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-HP/4-HB: ciclo 3-hidroxiopropionato/4-hidroxi butirato

3S: Three Sisters

ACC: *Antarctic Circumpolar Current* (Água circumpolar antártica)

ATP: Adenosin Triphosphate (Adenosin Trifosfato)

AXE1: The Axe

BR1: Bridgeman Island.

CBB: Calvin-Benson-Bassham

CTAB: Cetyl trimethylammonium bromide

CO: Monóxido de Carbono

CO₂: Dióxido de carbono

DNA: Desoxirubonucleic Acid

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid

HR4: Hook Ridge 4

HR6: Hook Ridge 6

m: metros

MBC: Mini Box Corer

mM: miliMolar

OAXXXIII: Operação Antártica XXXIII

OTU: Operational Taxonomic Unit (Unidade Taxonômica Operacional)

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

RDP: Ribossomal Data Project

rRNA: ribossomal Rubonucleic Acid

rTCA: reductive Tricarboxylic Acid Cycle

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SOX: sulfur-oxidizing multi-enzyme system

TAE: Tris-Acetato-EDTA

UV: Ultra Violeta

WL: Wood-Ljungdah |

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVO	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 ANÁLISE DE LITERATURA.....	22
3.1 Fontes hidrotermais	22
3.2 Quimiossíntese.....	24
3.3 Oceano Austral	26
3.4 Estreito de Bransfield	26
3.5 Caracterização das comunidades microbianas empregando métodos independentes de cultivo	27
3.6 Comunidades microbianas em fontes hidrotermais	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Coleta de Amostras ambientais no Estreito de Bransfield e Passagem de Drake	32
4.2 Análises físico-químicas.....	33
4.3 Extração de DNA total.....	34
4.4 Análise dos dados de sequenciamento do gene do rRNA 16S por Illumina.....	35
4.5 Análise metagenômica.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento	37
5.2 Alfa diversidade.....	37
5.3 Composição taxonômica das comunidades procarióticas dos sedimentos marinhos profundos do Estreito de Bransfield	39
5.5 Beta-diversidade	44
6 Perfil Metagenômico Das Comunidades Microbianas Em Hook-Ridge, Estreito De Bransfield, Península Antártica.....	48
6.1 Classificação taxonômica dos genes funcionais	48
5.3.2 Classificação dos genes funcionais.....	49
5.3.3 Fixação de Carbono	52
5.3.4 Metabolismo do enxofre	54

5.3.5 Metabolismo do nitrogênio.....	56
6 CONCLUSÕES	59
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS	78
ANEXO A – Lista de publicações, trabalhos apresentados em eventos científicos e colaborações	78

1. INTRODUÇÃO

O assoalho oceânico é considerado o ecossistema mais extenso do planeta, com uma variedade de ambientes como o sedimento marinho, sedimentos de subsuperfície, áreas geotermiais e fontes de exsudação fria, abrigando, em sua maioria, micro-organismos capazes de sobreviver a condições extremas de temperatura, pressão e baixas concentrações de matéria orgânica.

Apesar da sua importância e conseqüentemente estudos realizados nesta região, o mar profundo permanece com a maior parte de sua área não explorada devido aos altos custos logísticos envolvidos na pesquisa e exploração de áreas profundas.

O descobrimento das fontes hidrotermais e dos organismos associados a esses ambientes na década de 70, iniciaram uma nova era nas pesquisas oceanográficas. Antes desse descobrimento, acreditava-se que a vida no mar profundo era dependente da degradação do material depositado proveniente da superfície oceânica. Mas foi comprovado pela primeira vez que a vida nesses ambientes ocorre devido a produção primária quimiossintética, processo pelo qual os micro-organismos utilizam a energia geoquímica disponível. Dessa forma um novo metabolismo, não fotossintético, foi descoberto.

A partir dessas descobertas, as pesquisas microbiológicas destes habitats têm sido focadas em descrever as comunidades microbianas com o intuito de entender as relações entre a produtividade primária, geologia, geoquímica, relação com os hospedeiros e biogeografia em ambientes hidrotermais.

O continente antártico apresenta características específicas de isolamento devido, entre outras coisas, à influência de correntes eólicas e marinhas que impedem a dispersão de organismos provenientes de outros locais do planeta.

Na Península antártica foram descritas áreas com supostas atividades hidrotermais. As primeiras evidências de atividade hidrotermal no estreito de Bransfield vem de anomalias registradas na coluna d'água. Essas evidências foram confirmadas em Hook Ridge e Three Sisters. No entanto observações realizadas por Aquilina e colaboradores

em 2013 em Hook Ridge não mostraram padrões de fauna característicos de ambientes hidrotermais com metabolismo quimiossintético, sugerindo que o fato seria devido as concentrações de sulfeto serem diferentes das encontradas classicamente em ambientes hidrotermais ativos. No entanto a atividade quimiossintética microbiana não foi estudada.

A hipótese desta tese é de que as alterações observadas por Aquilina e colaboradores (2013) podem permitir que a atividade hidrotermal presente em Hook Ridge seja suficiente para sustentar a quimiossíntese na área sob influência dos fluídos hidrotermais.

Para comprovar a presença de comunidade quimiosintética foram empregadas duas abordagens metodológicas. Com o avanço das tecnologias de sequenciamento em larga escala, tem sido possível descrever com maior detalhe a composição taxonômica e o perfil funcional microbiano. Esses métodos baseiam-se tanto na amplificação de marcadores filogenéticos, como o gene RNA 16S, quanto na fragmentação e posterior sequenciamento do DNA total dos micro-organismos (Metagenoma).

O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade taxonômica e o perfil funcional das comunidades microbianas presentes nos sedimentos marinhos potencialmente influenciados pela atividade hidrotermal no Estreito de Bransfield, Península Antártica, investigando se existem comunidades microbianas quimiossintéticas que possam ser a base da produtividade primária nesse ambiente.

Esta tese foi estruturada da seguinte forma. Inicialmente apresenta-se o escopo geral do trabalho na introdução e objetivos, seguidos da revisão de literatura. A seguir os resultados estão organizados em dois capítulos, sendo o objetivo do capítulo 1 descrever a diversidade microbiana em sedimentos com e sem influência hidrotermal e no capítulo 2 estudar a diversidade funcional dos microrganismos nos sedimentos com ênfase nas vias de obtenção de energia e fixação de carbono no mar profundo. No final apresenta-se as conclusões do estudo.

Este trabalho foi desenvolvido no escopo dos projetos “Registro paleoclimático da transição (greenhouse-icehouse) Eoceno-Oligoceno na Antártica Ocidental” (PROANTAR-CNPq Proc. 55036/2009-7), coordenado pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Rocha Campos e Profa Dra. Wania Duleba e “Vida Microbiana na Criosfera Antártica: Mudanças Climáticas e Bioprospecção (MICROSFERA) (PROANTAR-CNPq Proc. 407816/2013-5) coordenado pela Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari. Ambos os projetos ocorreram no âmbito do Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) cumprindo todas as exigências logísticas do Ministério do Meio Ambiente e da Secretaria da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (SECIRM) para a realização das coletas.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo descrever filogenética e funcionalmente a comunidade microbiana em áreas geotermais potencialmente ativas e nas inativas ainda pouco estudadas no Estreito de Bransfield (Península Antártica), relacionando-as com os parâmetros ambientais de outras regiões, permitindo desta forma o estudo de biogeografia desta importante região, através do estudo da diversidade do gene rRNA 16s e técnicas de metagenoma.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar físico-quimicamente os sedimentos do estreito de Bransfield;
- Descrever a estrutura de comunidade da região estudada, com foco na busca de grupos quimiossintéticos e sua relação com os parâmetros abióticos;
- comparar o perfil funcional das amostras de sedimento do Estreito de Bransfield, com ênfase nos genes envolvidos com a obtenção de energia a partir de compostos provenientes da atividade hidrotermal e a fixação de carbono no mar profundo
- Analisar a proporção de genes relacionados com o metabolismo quimiossintético nas áreas de influência hidrotermal.

3 ANÁLISE DE LITERATURA

3.1 Fontes hidrotermais

As fontes hidrotermais foram descobertas em 1977 no arquipélago de Galápagos (CORLLIS; BALLARD, 1977). Hoje em dia, sabe-se que as fontes hidrotermais estão amplamente distribuídas ao redor do planeta (Figura 1). Os fluidos hidrotermais emitidos são basicamente essencialmente água do mar quimicamente alterada durante a interação com a crosta e o magma (BUTTERFIELD et al., 1997; TIVEY, 2007; KAWAGUCCI et al., 2013).

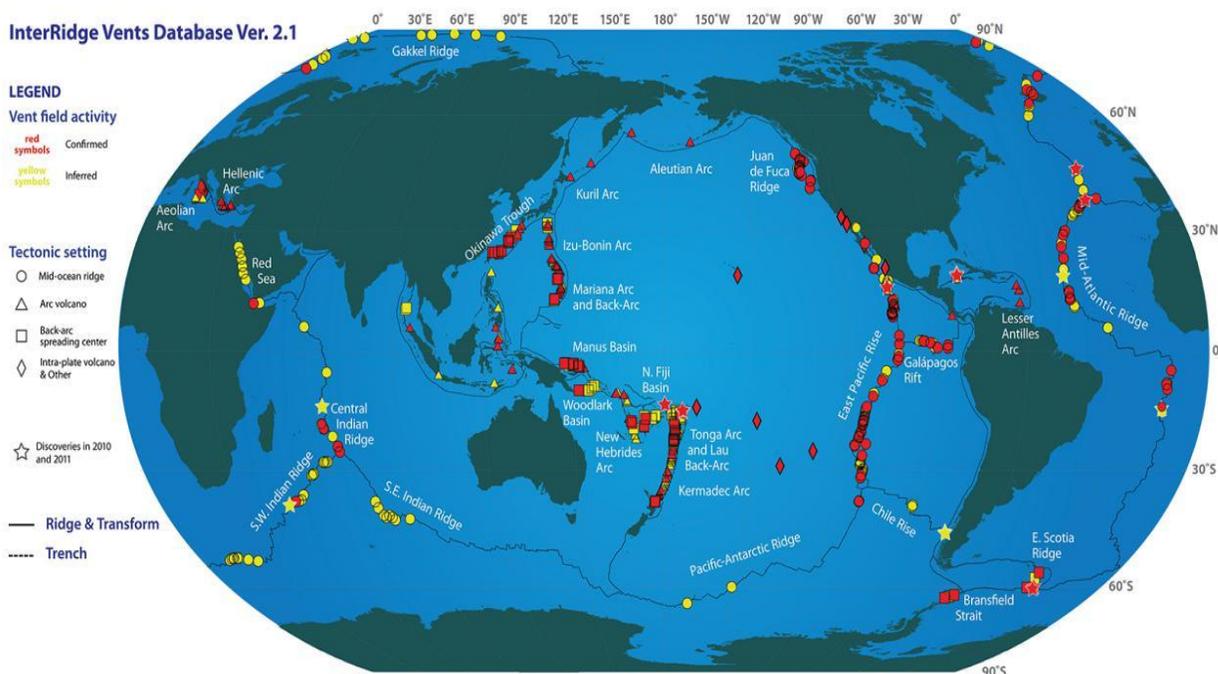


Figura 1 - Distribuição global das fontes hidrotermais segundo a base de dados da InterRidge. Fonte <https://vents-data.interridge.org/maps>.

As fontes hidrotermais estão associadas principalmente a formação e deformação do assoalho oceânico próximo às cordilheiras meso-oceânicas e zonas de subducção. Estas áreas lançam gases provenientes do próprio magma associado à atividade

vulcânica, podendo as temperaturas nesses locais alcançar até 400°C (KONHAUSER, 2007).

As exsudações e plumas hidrotermais ocorrem quando a fumarola expelle fluidos hidrotermais saturados com potenciais fontes de energia para os micro-organismos, como por exemplo H₂S, Fe, Mn, CH₄ e H₂ (Figura 2).

Os gradientes geoquímicos e termais (ex. >350°C entre distâncias de 1-3 cm em chaminés de sulfeto ativas) existente no entorno das chaminés, promovem grande variedade de nichos para a colonização dos micro-organismos e de fauna associada.

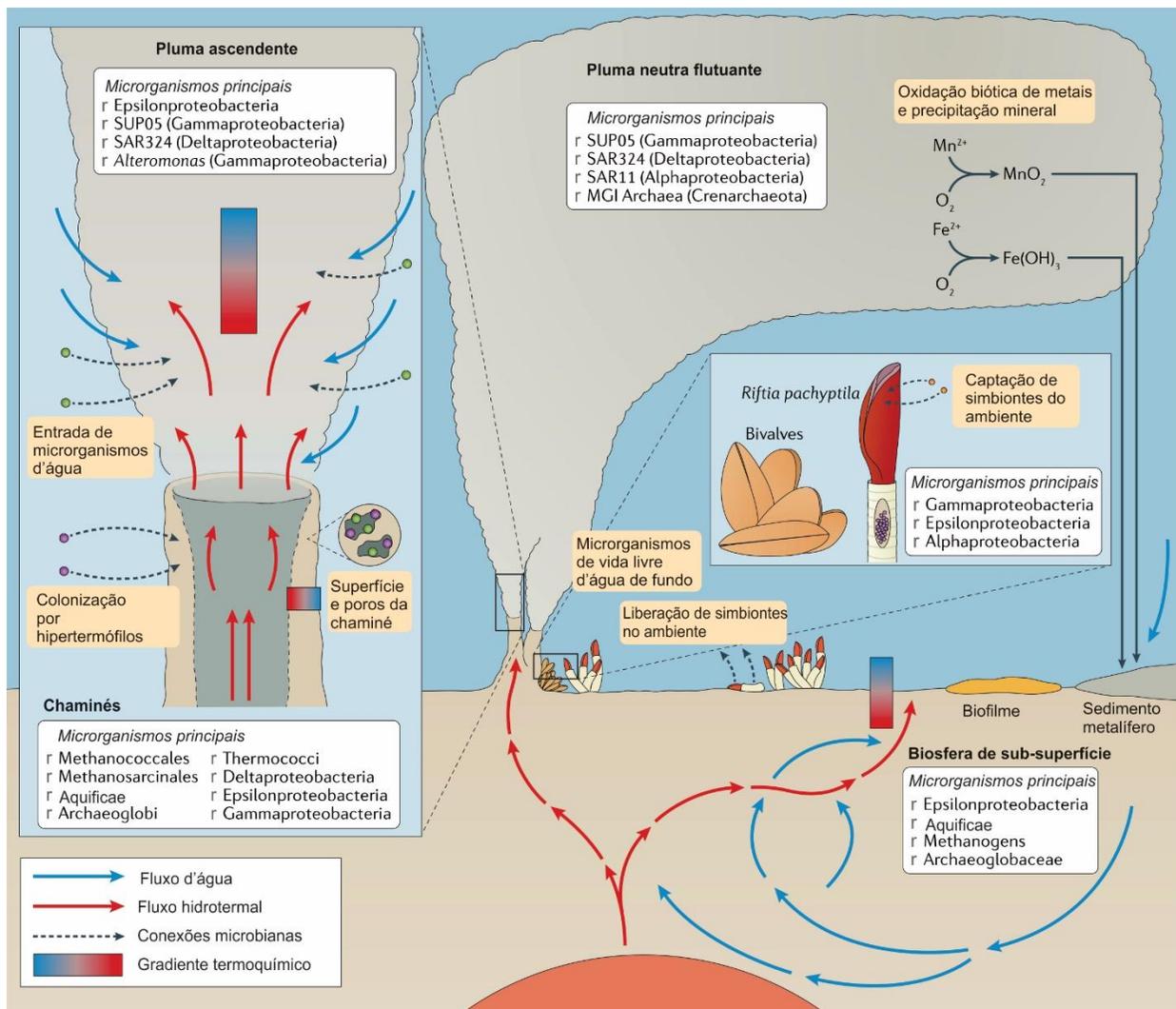


Figura 2 - Dinâmica da distribuição das comunidades e dos nutrientes presentes na exsudação quente. Fonte: Adaptado de DICK et al., 2019.

Nestes nichos habitam micro-organismos psicrófilicos (com crescimento ótimo a 4°C), mesofílicos (com crescimento ótimo de 25°C a 40°C), termofílicos (com crescimento ótimo de 40°C a 85°C) e hipertermofílicos (com crescimento ótimo acima de 85°C), os quais realizam processos de quimiolitotrofia ou heterotrofia, utilizando-se da energia química orgânica ou inorgânica e de fontes de carbono abundantes presentes no ambiente das fontes hidrotermais (FABRES *et al.*, 2000; DAHLMANN *et al.*, 2001; FRETZDORFF & SMELLIE, 2002).

3.2 Quimiossíntese

Aproximadamente 45,5 Pg de carbono inorgânico é fixado em matéria orgânica pelos organismos autotróficos marinhos a cada ano, o que constitui 46% do carbono fixado total no planeta (FIELD *et al.*, 1998).

Uma das vias de obtenção de energia para realizar a fixação de carbono vem da utilização da energia solar, processo feito pelas plantas superiores, algas e cianobactérias. Embora a luz solar penetre na coluna d'água só até os 300m de profundidade aproximadamente, a maior fração de matéria orgânica nos oceanos é produzida pelos organismos fotoautotróficos (DUNNE *et al.*, 2007; MIDDELBURG, 2011).

Essa produção é realizada por cianobactérias e algas eucarióticas, através do ciclo Calvin-Benson-Bassham (CBB) para realizar fotossíntese oxigênica e fixação de carbono. (RAVEN 2009; SCANLAN *et al.* 2009; BOWLER *et al.* 2010).

Muitos ecossistemas no mar profundo dependem deste aporte de matéria orgânica proveniente das regiões fólicas em forma de material particulado. No entanto, a energia necessária para fixar carbono nestas regiões onde a luz solar está ausente pode ser obtida a partir de reações químicas de oxido-redução.

Esse processo independente de luz conhecido como quimiolitotrofia ou quimiossíntese é realizado unicamente por organismos procarióticos e tem sido relatado em ambientes onde os aceptores e doadores de elétrons estão disponíveis junto com condições termodinâmicas favoráveis (BACH *et al.*, 2006; SWAN *et al.*, 2011).

Enquanto o carbono inorgânico e seus potenciais aceptores de elétrons tais como oxigênio, nitrato ou sulfato são amplamente distribuídos nos oceanos, doadores de elétrons como sulfetos, hidrogênio, metano, amônia e ferro são considerados fatores limitantes. No entanto, altas concentrações desses compostos reduzidos são inseridas nos oceanos em locais com atividade geológica como exsudações frias (*cold seeps*), vulcões de lama e fontes hidrotermais (ORCUTT et al., 2011).

As vias metabólicas quimiossintéticas são geralmente classificadas baseadas nos substratos que são utilizados (oxidação de sulfeto, redução de sulfato, oxidação anaeróbica de metano, oxidação aeróbica de metano, etc.).

Nas fontes hidrotermais, a importância desses processos metabólicos depende principalmente da composição dos fluidos hidrotermais e da capacidade metabólica dos grupos microbianos presentes nesses ambientes (geralmente influenciados pelas características geoquímicas *in situ*). Em exsudações frias e sedimentos anóxicos, a produção quimiossintética é principalmente realizada pela oxidação de metano e sulfeto.

Micro-organismos são geralmente agrupados dependendo das estratégias metabólicas para a obtenção de carbono e energia. As possíveis fontes de energia são as provenientes da luz solar e os compostos químicos reduzidos, os quais regulam os metabolismos fototróficos e quimioautotróficos respectivamente.

Existem vários mecanismos pelos quais a quimiossíntese pode ocorrer, mas a princípio, todos são bem parecidos. Elétrons provenientes de compostos reduzidos como sulfeto de hidrogênio e metano são usados para abastecer a cadeia transportadora de elétrons, ao invés de usar elétrons liberados d'água na fotossíntese, processo dependente de luz.

Até hoje, seis diferentes vias metabólicas de fixação de CO₂ foram descritas em microrganismos. Além do ciclo redutor das pentoses fosfato (Ciclo de Calvin-Beenson-Bassham), existem o Ciclo dos ácidos tricarbólicos redutor (rTCA), a via redutora do Acetil CoA ou Wood-Ljungdahl (WL), o ciclo 3-hidroxi propionato (3-HP), o ciclo 3-hidroxi propionato/4-hidroxi butirato (3-HP/4-HB) e o ciclo dicarboxilato/4-hidroxi butirato (DC/4-HB). (HUGLER; SIEVERT, 2011)

3.3 Oceano Austral

O oceano Antártico apresenta características únicas devido às condições extremas e isolamento pelas correntes oceânicas, especificamente a Corrente Circumpolar Antártica (*Antarctic Circumpolar Current - ACC*). Essa corrente cria uma barreira frontal ainda pouco explorada, que se estende desde as águas superficiais até o oceano profundo, separando os ambientes marinhos antárticos das águas relativamente mais quentes dos oceanos Pacífico, Índico e Atlântico (ROGERS et al., 2012; MARSH et al., 2015). Apesar disso, áreas com atividade geotermal foram recentemente descobertas na Península Antártica, possibilitando o estudo de ecossistemas de grande diversidade de características físico-químicas, favoráveis principalmente ao crescimento microbiano. (AQUILINA et al., 2013).

3.4 Estreito de Bransfield

No Oceano Austral, o Estreito de Bransfield é considerado um ambiente único por representar uma bacia marginal com atividade vulcânica, descrito como um *rifting* ativo na Península Antártica que se estende até as Ilhas Shetlands do Sul (KLINKHAMMER et al., 2001).

O Estreito de Bransfield é uma bacia de retro arco (*Back-arc ridge*) marginal localizada entre o norte da Península Antártica e as ilhas Shetland do Sul, formada pelo rifteamento da crosta continental, que se expande a razão de 2,7-7,5 mm/ano. Sua largura máxima é de 80 km e seu comprimento chega a atingir 400 km, entre *Small Island* e *Clarence Island*.

A bacia é dividida em sub-bacias (oeste, central e leste) pelos vulcões sub-aéreos Deception e Bridgeman, distanciados 200 km ao longo do eixo de rifteamento central. A bacia central é caracterizada por altas taxas de sedimentação (até 1,8 mm/ano) e a espessura de 3,3 km na camada de sedimentos (DeMASTER et al., 1988; PRIETO et al., 1998; HOWE et al., 2007). No eixo central do *rift*, vários edifícios vulcânicos elevaram-se acima do fundo do mar, incluindo Hook Ridge (com o topo a 1050 m de

profundidade), o complexo “Three Sisters” (com o topo a 1310 m de profundidade) e “The Axe” (1025 m de profundidade) (Aquilina et al., 2013).

As primeiras evidências de atividade hidrotermal no estreito de Bransfield vem de anomalias registradas na coluna d’água, principalmente de ^3He (SCHOLSSER et al., 1988; SUESS *et al.*, 1987) e concentrações elevadas de CH_4 (BOHRMANN *et al.*, 1998) e Mn (KLINKHAMMER *et al.* 1996; SUESS *et al.*, 1987). Essas evidências foram confirmadas por resultados de análises de sedimentos termicamente alterados (SUESS *et al.*, 1987; WHITICAR *et al.*, 1985) e pela presença de regiões silificadas e precipitados hidrotermais em Hook Ridge e Three Sisters (BOHRMANN *et al.*, 1998; PETERSEN *et al.*, 2004).

Observações realizadas por Aquilina e colaboradores em 2013 em Hook Ridge não mostraram padrões de fauna característicos de ambientes hidrotermais com metabolismo quimiossintético, sugerindo que o fato seria devido as concentrações de sulfeto serem diferentes das encontradas em ambientes hidrotermais ativos.

3.5 Caracterização das comunidades microbianas empregando métodos independentes de cultivo

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

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

microbiana, uma vez que permite testar hipóteses em diversos níveis taxonômicos (LEMOS et al., 2011).

Diferentes técnicas e plataformas vêm sendo utilizadas desde os primórdios do sequenciamento na década dos 70's. O sequenciamento por adição de dideoxynucleotídeos marcados junto com eletroforese capilar foi desenvolvida por Sanger e colaboradores (1977). Quando empregada na ecologia microbiana, essa técnica permite o sequenciamento de centenas de fragmentos do gene rRNA 16S. Porém, o principal problema foi o custo e o trabalho necessário para gerar o número de sequências mínimas que conseguisse atingir resultados robustos.

Nos últimos 15 anos, diversas tecnologias de sequenciamento foram desenvolvidas. Devido ao grande número de *reads* gerados, essas técnicas foram denominadas sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing* - NGS) ou sequenciamento de alto rendimento (*high-throughput sequencing* - HTS) (SHENDURE;JI, 2008).

Entre algumas das tecnologias que tiveram um sucesso relativo estão a plataforma 454 (Roche) capaz de gerar por volta de 200mil sequências por corrida. As plataformas SOLiD (*Sequencing by Oligo Ligation Detection*) (Life Technologies) e Ion Torrent (Life Technologies) foram alternativas que apareceram no mercado, no entanto, um dos principais defeitos era o tamanho dos fragmentos gerados, pois enquanto o 454 gerava fragmentos de até 500pb, as plataformas SOLiD e Ion Torrent geravam *reads* de até no máximo 200pb. Recentemente, a plataforma Illumina se tornou líder entre as tecnologias estabelecidas de NGS, principalmente pelos equipamentos de alto desempenho (milhões de sequências geradas), por oferecer o menor custo por base sequenciada e maior qualidade de sequências (KOZICH et al., 2013; NELSON et al., 2014).

Na plataforma MiSeq da Illumina, é possível gerar cerca de 30 milhões de *reads* (denominação de sequências para esta plataforma) pareados com aproximadamente 300 pb cada. A plataforma MiSeq da Illumina é atualmente a mais utilizada para o sequenciamento de *amplicons* em ecologia microbiana (CAPORASO et al., 2012).

A metagenômica é uma derivação da genômica microbiana convencional, sem a necessidade de se obter culturas puras para sequenciamento, constituindo uma importante ferramenta para determinação de hipóteses a respeito das inter-relações dos membros da comunidade. O desenvolvimento destas investigações, aplicando conceitos teóricos em ecologia na área da microbiologia, foram possíveis atualmente graças à diminuição dos custos do sequenciamento e da evolução da bioinformática, a qual condiciona o processamento de um enorme número de dados (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012)

Métodos metagenômicos têm permitido vislumbrar o papel dos micro-organismos envolvidos na oxidação de enxofre, hidrogênio, metano e amônia em fontes hidrotermais, como exemplo sequências relacionadas a SUP05 (*Gammaproteobacteria*) e *Deltaproteobacteria*. Estudos realizados ao longo dos últimos cinco anos mostraram que representantes desses grupos são potencialmente espécies-chave no papel de absorção de ferro e oxidação de nitrito, respectivamente (ANANTHARAMAN *et al.*, 2013; DICK *et al.*, 2013).

3.6 Comunidades microbianas em fontes hidrotermais

Estudos de biogeografia das comunidades microbianas em fontes hidrotermais ativas do Oceano Pacífico Norte relataram alta abundância de sequências relacionadas aos grupos *Gammaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria* para Bacteria e para Archaea os grupos dominantes foram *Thermoplasmata* e Marine Group I (ANDERSON *et al.*, 2015).

No entanto, em fontes hidrotermais inativas do Oceano Índico, os grupos de Bacteria mais abundantemente encontrado foi *Alphaproteobacteria* e para Archaea o foi *Thaumarchaeota* (ZHANG *et al.*, 2016). Estudos em áreas geograficamente distintas tem demonstrado que não existem padrões distintos de comunidade microbiana em fontes hidrotermais e reforça a importância de realização a pesquisa nas fontes hidrotermais antárticas, devido às características geográficas junto como o isolamento físico devido às correntes de fundo oceânicas, propiciando ambientes únicos a serem estudados.

Sob condições anóxicas, a presença de grupos metanogênicos tem sido relatada, assim como organismos redutores de sulfato, pertencentes à classe *Deltaproteobacteria* (HIGASHI et al., 2004; FRANK et al., 2013, CAO et al., 2014) e arqueias anaeróbicas oxidadoras de metano (BRAZELTON et al., 2006).

Em ambientes com maiores concentrações de oxigênio, muitos estudos reportaram a presença do grupo *Epsilonproteobacteria*, cujo metabolismo tem sido descrito como quimiolitotrófico, capaz de oxidar hidrogênio e sulfeto (LANZÉN et al., 2011; URICH et al., 2014).

Dependendo da característica hidrotermal, a composição das comunidades microbianas pode mudar. No caso das comunidades de sub-superfície e fluidos difusos, onde as temperaturas podem atingir até 100° C, as comunidades são dominadas pelos grupos *Aquificales*, *Epsilonproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, assim como grupos de bactérias filamentosas oxidadoras de enxofre como *Beggiatoa* e *Arcobacter* ou *Zetaproteobacteria* em fluidos ricos em Ferro. (HOLDEN et al., 2003; MEYER et al., 2013).

As comunidades microbianas que habitam as plumas hidrotermais são compostas principalmente por organismos presentes na coluna d'água, com destaque para as sequências relacionadas ao SUP05 (*Gammaproteobacteria*), SAR324 (*Deltaproteobacteria*), SAR11 (*Alphaproteobacteria*) e Marine Group I archaea (DICK et al., 2010; GERMAN et al., 2010; SHEIK et al., 2015)

No caso das chaminés hidrotermais, cujas temperaturas podem atingir 407° C (KOSCHINSKY et al., 2008). A rápida mistura de altas temperaturas com água fria (2-4° C) cria gradientes de temperatura acentuados, onde os grupos dominantes geralmente são organismos termofílicos ou hipertermofílicos dos grupos *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, *Aquificae*, *Archaeoglobi*, *Thermococci*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* (ORCUTT et al., 2011; FLORES et al., 2012; REVEILLAUD et al., 2016).

Os micro-organismos termofílicos não são comumente encontrados na Antártica e quando presentes, estão associados aos sítios geotermiais. Os termofílicos formam

grupos filogenéticos que apresentam profunda ramificação e são intimamente relacionados a organismos ancestrais, como o LUCA (*last universal common ancestor*) com metabolismo quimiolitotrófico, os quais provavelmente surgiram em ambientes homólogos aos encontrados em fontes hidrotermais (WEISS *et al.*, 2016) sugerindo raízes termofílicas para a maioria das adaptações evolutivas em procariotos (BOITEAU & PASCAL, 2011).

Estudos recentes sugerem que temperaturas elevadas e ambientes oligotróficos, nos quais alguns termófilos podem ser encontrados, são semelhantes aos encontrados no início da vida na Terra durante o Éon Arqueano (4 bilhões a 2,5 bilhões de anos). Além disso, um melhor entendimento sobre as capacidades adaptativas destes microorganismos presentes em ambientes extremos, irá prover informações sobre questões centrais para as teorias de adaptação fisiológica e evolução microbiana (VICKERS, 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de Amostras ambientais no Estreito de Bransfield e Passagem de Drake

No Estreito de Bransfield (Figura 3), foram selecionados cinco pontos amostrais para coleta do sedimento marinho, denominados: HR6 (na fonte hidrotermal), HR4 (cerca de 2 km distante da fonte), BR1 (Ilha Bridgeman), 3S (Three Sisters) e AXE (The Axe). Na Passagem de Drake foi coletada uma amostra de mar profundo (DR1) representando uma amostra externa com diferenças influências dentro e fora da Antártica. As amostras foram coletadas durante 3a fase da OPERANTAR XXXIII com uso do guincho oceanográfico *box corer*. O apoio logístico foi oferecido pela Marinha do Brasil/SECIRM, como parte do Programa Antártico Brasileiro com auxílio do navio polar Almirante Maximiano (como parte do Projeto “Registro paleoclimático da transição (greenhouse-icehouse) Eoceno-Oligoceno na Antártica Ocidental” (PROANTAR-CNPq Proc. 55036/2009-7).

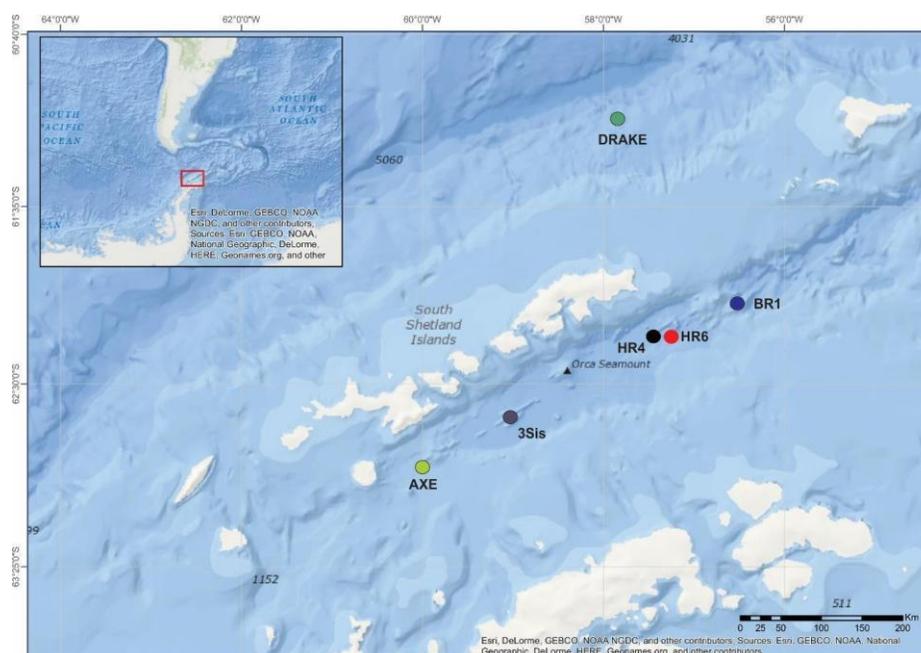


Figura 3 - Mapa do Estreito de Bransfield e Passagem de Drake mostrando a localização das amostras.

Em cada ponto de coleta, foram coletadas as camadas superficiais dos sedimentos (5cm) para extração de DNA. Para a determinação das características físico-químicas dos sedimentos (Granulometria, concentração de metais, Carbono Orgânico Total e Nitrogênio total), foram coletadas amostras separadas obtidas a partir do mesmo lançamento de *box-corer*. (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição das amostras coletadas no Estreito de Bransfield durante a OPERANTAR XXXIII.

SampleID	Prof (m)	Data	Long (W)	Lat (S)
3Sis	1188	22/jan/14	58 58.664	62 38.745
AXE	520	23/jan/14	59 55.675	62 52.201
Bridgeman (BR1)	707	12/dez/14	56 37.135	62 06.495
Drake (DR1)	3700	17/jan/14	57 53.035	61 04.474
HR4	1090	11/dez/14	57 16.474	62 11.479
HR6	1190	15/dez/14	57 18.257	62 11.897

4.2 Análises físico-químicas

Concentrações mineralógicas (Quartz, Feldspars, Illita, Clorite e Calcita) e concentrações totais de elementos traço (Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Zn, Br, Sr, Zr, Cr, Cu, V, Y, Ba) foram analisados com o difractometro Olympus® Benchtop XRD/XRF (BTX) usando radiação Co-K no laboratório de Geoprocessamento no Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. A identificação mineral foi realizada usando o software X Powder (Version 2010.01.15 PRO), que leva em consideração a base de dados do PDF-2 International Centre for Diffraction Data database. Concentrações de carbono orgânico total (TOC), nitrogênio total (TN) e carbonate (CaCO₃) foi calculada segundo Neves et al. (2018), usando o *isotope ratio*

mass spectrometer (EA-IRMS) no laboratório de química orgânica do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

4.3 Extração de DNA total

A extração de DNA genômico total das amostras coletadas durante a Operação Antártica XXXIII foi realizada utilizando o kit PowerSoil™ DNA (Mo Bio, USA), a partir de 0,3 g de cada amostra em quintuplicata, segundo o protocolo do fabricante. A integridade e concentração final de DNA foi avaliada, respectivamente, em eletroforese em gel de agarose 1% (v/v) preparado em tampão TAE 1X (Tris 0,04 M, ácido acético glacial 1M, EDTA 50 mM, em pH 8) e em fluorômetro Qubit 1.0 (Life Technologies, USA) com o kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, USA).

Para realizar as análises metagenômicas, utilizou-se uma estratégia diferente de extração de DNA descrita por Castro e colaboradores (2011) com algumas modificações.

Em tubos de 50 ml, foram misturados 10 g de sedimento com 15 ml de tampão de extração (Tris/HCl 100 mM, pH 8.0, Fosfato de Sódio 100 mM, EDTA 100 mM, pH 8.0, NaCl 1.5 M, CTAB 1% w/v) e submetidos a sucessivos ciclos de congelamento /descongelamento por 40 min. Após a última etapa de descongelamento, foram adicionados 4,5 ml de SDS 20% e 2,5 ml de Isotiocianato de Guanidina (5 M) em cada tubo e incubados por 2 h a 65 °C. Passado o tempo, os tubos foram centrifugados (5000 rpm, 10 °C durante 1 h) e o sobrenadante misturado com 12 ml de Clorofórmio/Álcool Isoamílico (24:1). O sobrenadante foi coletado depois de uma nova etapa de centrifugação (sob as mesmas condições anteriores) e foi precipitado com 20 ml de Isopropanol 70% (v/v) por 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 1 h 30 min a 5000 rpm e 10 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pellet foi ressuscitado em 500 µl de TE pH 8.0.

O DNA foi extraído com igual volume de tampão Tris-Fenol/Clorofórmio seguido de centrifugação a 1000 rpm por 10 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi misturado com igual volume de Clorofórmio/Ácido Isoamílico e centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante (DNA) foi transferido para um novo tubo e

estocado a -20 °C. A extração de DNA das amostras de sedimento foi realizada a partir de 10 g de sedimento em eletroforese em gel de agarose 1% (v/v) preparado em tampão TAE 1X (Tris 0,04 M, ácido acético glacial 1M, EDTA 50 mM, em pH 8) e em fluorômetro *Qubit* 1.0 (Life Technologies, USA) com o kit *Qubit® dsDNA HS Assay* (Life Technologies, USA).

Após a extração, o DNA genômico das amostras HR4 e HR6 foram sequenciados na plataforma *Illumina® HiSeq2000* no *Marine Biological Laboratory* da Universidade de Chicago – EUA, em colaboração com o Deep Carbon Observatory. As amostras BR1 e 3S foram sequenciadas na empresa *MrDNA* (Texas - EUA).

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

Os dados de sequenciamento do gene do rRNA 16S foram analisados através do Qiime (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (CAPORASO et al., 2010) e do pipeline do UPARSE (EDGAR, 2013). Primeiramente, os *reads* pareados foram montados por meio do software PEAR (ZHANG et al., 2014), utilizando um mínimo de sobreposição de 50 pb, mínimo de tamanho de 400 pb e mínimo Phred score de 30. Em seguida os reads montados foram filtrados quanto à sua qualidade através do comando `-fastq_filter` do USEARCH versão 9.2 (EDGAR, 2010), com um mínimo de erros esperados de 1.0 (`-fastq_maxee 1.0`). As sequências únicas foram selecionadas com o comando `-derep_fulllength` do USEARCH, com o intuito de selecionar somente as sequências únicas. As sequências únicas foram agrupadas em OTUs considerando uma similaridade de 97%, através do comando `-cluster_otus` do USEARCH. As sequências quiméricas foram filtradas através do comando `-uchime_ref` do USEARCH, utilizando como referência o banco de dados do RDP Classifier (WANG et al., 2007).

A tabela de OTUs foi construída por meio do comando `-usearch_global` do USEARCH e as OTUs foram classificadas taxonomicamente através do comando `assign_taxonomy.py` do Qiime, utilizando o banco de dados SILVA 132 (Quast et al, 2013).

Foram removidas as sequências assinaladas como cloroplastos e, em seguida, utilizou-se o comando `alpha_diversity.py` do Qiime para as análises de riqueza e alfa-

diversidade. A riqueza foi estimada pelo Chao1 e a alfa diversidade foi calculada pelos índices Simpson e Shannon. As sequências foram alinhadas através do comando `align_seqs.py` para a construção da árvore filogenética, utilizando o comando `make_phylogeny.py` do Qiime.

Com o objetivo de não subestimar os grupos taxonômicos com menor abundância, as OTUs foram normalizadas baseadas no método *Cumulative-Sum Scaling* (CSS) (Paulson et al., 2013). O comando `beta_diversity.py` foi utilizado para calcular a Beta-diversidade baseada no índice filogenético de UNIFRAC unweighted (qualitativo) (LOZUPONE et al., 2011).

Os gráficos e as análises estatísticas, incluindo os testes de hipótese, foram elaborados com auxílio do R versão 3.3.1 (R Development Core Team, 2008), utilizando os pacotes *ggplot2*, *vegan*, *qiimer*, *reshape2*, *circlize* e *flyr*.

4.5 Análise metagenômica

Os *reads* obtidos através da plataforma *Illumina HiSeq* para a análise do metagenoma foram inicialmente filtrados utilizando o *software SICKLE* (JOSHI;FASS, 2011), utilizando um mínimo de *Phred score* de 30. A qualidade das sequencias foi verificada no *software FASTQC*.

A classificação taxonômica, o perfil funcional e o alinhamento com a base de dados de proteínas do NCBI *non-redundant* das amostras foi realizado usando o *software Diamond v8.1* (BUCHFINK et al., 2015) com um *e-value* máximo de 1e-10 e um *score* mínimo de 50. O alinhamento resultante foi visualizado executando o algoritmo *lowest common ancestor* implementado no *software MEGAN 6* (HUSON et al., 2016), com um *score* mínimo de 50, empregando os parâmetros padrões. A classificação funcional foi realizada utilizando o arquivo taxonômico do NCBI e as bases de dados do SEED-*subsystems* e KEGG (*Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes*).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento

Em geral, todas as amostras apresentaram análises mineralógicas de concentrações semelhantes. As concentrações de illita, clorita e calcita apresentaram concentrações semelhantes entre todas as amostras. BR1 apresentou maiores valores de quartzo (21%) em comparação com todas as amostras (9-16%).

Concentrações de elementos traço em 3S, AXE1 e BR1 mostraram um padrão comum em todos os elementos, apenas Si foram maiores na amostra 3S. Amostras de sedimentos de Hook Ridge (HR4 e HR6) apresentaram composição geoquímica, mineralógica e oligoelementar similar (Tabela 2). Além disso, oligoelementos como Cu (223-2660 mg / kg), Cr (443-462 mg / kg) e Zr (586-623 mg / kg) apresentaram concentrações mais elevadas apenas nessas duas amostras, enquanto altas concentrações de Ba (2820 mg / kg), S (7260 mg / kg) e Zn (446 mg / kg) foram detectados apenas em HR6. Concentrações de carbono orgânico total foram maiores em 3S (0,365%), enquanto HR6 apresentou a menor concentração (0,078%).

5.2 Alfa diversidade

Em geral, os valores de diversidade alfa foram maiores para Bacteria quando comparados com Archaea (Tabela 3). O índice de ACE utilizado para riqueza variou de 2011.65 (HR6) a 4025.90 (BR1). O índice de diversidade de Simpson variou de 0,983 (HR6) a 0,996 (HR4). A maior diversidade de arqueas foi encontrada em HR6 e HR4, seguida de BR1, 3S e AXE1. O índice de diversidade alfa mostrou uma menor riqueza bacteriana na HR6 em comparação com as amostras sem ventilação, sugerindo que os ajustes geoquímicos têm um impacto nesta amostra. ZHANG et al. (2017) encontraram resultados semelhantes em Okinawa Trough, onde a distância das fontes hidrotermais ativas poderia ter influenciado a comunidade bacteriana.

Tabela 2 –Características mineralógicas e geoquímicas das amostras.

	3S	AXE	BR1	HR4	HR6
Localização	62.64 S 58.97 W	62.87 S 59.92 W	62.10 S 56.61 W	62.19 S 57.27 W	62.19 S 57.30 W
Data amostragem	22/jan/14	23/jan/14	12-Dec-14	11-Dec-14	15-Dec-14
Profundidade (m)	1188	520	707	1090	1190
Concentração elementos traço (mg/kg)					
Na	15.500	20.800	23.000	42.200	34.100
Mg	14.600	17.300	17.600	31.400	27.000
Al	53.500	61.900	64.800	128.000	110.000
Si	517.000	200.000	197.000	470.000	525.000
P	1.060	950	586	2.410	1.730
S	989	1.570	843	2.900	7.260
Cl	8.270	9.460	7.170	28.900	30.500
K	12.200	10.400	10.800	37.900	33.600
Ca	12.500	23.200	24.400	64.600	60.000
Ti	3.780	5.770	3.850	15.800	16.000
Mn	593	869	814	3.670	2.650
Fe	38.600	43.800	37.300	26.900	168.000
Zn	100	70	84	411	446
Br	110	84	50	542	348
Sr	171	256	236	1.160	968
Zr	93	133	93	586	623
Cr	>0.00906	>0.00906	153	443	462
Cu	>0.00463	>0.00463	101	243	2,66
V	>0.02061	>0.02061	>0.02061	0.0375	>0.02061
Y	>0.00307	>0.00307	>0.00307	>0.00307	89
Ba	>0.02988	>0.02988	>0.02988	>0.02988	2820
Mineralogia (%)					
Quartz	16	9	21	10	13.1
Feldspars	32	50	28	44	30.3
Illita	41	29	43	35	43.4
Clorita	8	8	6	9	9.1
Calcita	3	4	2	2	4
Espectrômetro de massas					
CaCO ₃ (%)	80.701	76.777	79.479	85.116	82.68
TOC (%)	0.365	0.135	0.087	0.127	0.078
TN (%)	0.163	0.137	0.069	0.215	0.074

Tabela 3 – Índices de Alfa-diversidade para cada amostra, incluindo o índice de riqueza *abundance-based coverage estimator* (ACE), índice de diversidade Simpson e o número total de OTUs.

Sample	<i>Bacteria</i>			<i>Archaea</i>		
	ACE	Simpson	OTUs	ACE	Simpson	OTUs
3S	3008.27	0.990	2912	61.90	0.974	61
AXE1	3036.69	0.992	2877	31.79	0.946	31
BR1	4025.90	0.994	3774	288.27	0.986	287
HR4	3975.24	0.996	3845	220.66	0.987	219
HR6	2011.65	0.983	1988	231.46	0.987	231

A riqueza de arqueias foi menor nas amostras 3S e AXE1, provavelmente relacionadas à concentração de matéria orgânica e alta prevalência do grupo Thaumarchaeota nessas amostras. Por outro lado, as amostras HR4, BR1 e HR6 apresentaram maiores valores de riqueza em arqueias, provavelmente devido a maiores concentrações de metais, conforme relatado por ZHANG et al (2016) no Southwest Indian Ridge.

5.3 Composição taxonômica das comunidades procarióticas dos sedimentos marinhos profundos do Estreito de Bransfield

Um total de 7.749 OTUs de Bacteria e 633 OTUs de Archaea foram obtidos a partir de 567.885 seqüências filtradas de qualidade (555.155 para Bacteria e 12.730 para Archaea) (Tabela 3), que foram classificadas em 56 e 12 filos bacteriano e archaea, respectivamente. No total, a abundância relativa bacteriana representou 97,7% e a abundância relativa de arqueas foi de 2,3% (Figuras 4 e 5). Além disso, a abundância relativa de arqueas variou entre 0,17% (AXE1) e 6,13% (HR6). Os filos bacterianos mais abundantes (> 0,1%) foram Proteobacteria (33,2%), Actinobactérias (22,1%), Chloroflexi (13,3%), Planctomicetos (7,0%), Verrucomicrobia (4,8%), Bacteroidetes (4,3%), Atribacteria (3,6%), Acidobacteria (2,2%), Aminicenantes (2,2%) e Campylobacteria (0,2%)

A comunidade microbiana de sedimentos de águas profundas influenciada pela atividade hidrotermal mostrou uma composição única, com Chloroflexi, Atribacteria, Proteobacteria, Aminicenantes e Aerophobetes como os filos mais abundantes. Dehalococcoidia foi a classe mais abundante no filo Chloroflexi, constituindo 17,9% da abundância relativa total em HR6. Estudos recentes mostraram que este grupo foi amplamente encontrado em diferentes sedimentos do fundo do mar, chaminés hidrotermais inativas e fluidos de crosta continental (SUZUKI et al., 2004, FRY et al., 2008, FLORES et al., 2012, CAMPBELL et al., 2013).

Proteobacteria foi o filo mais abundante em amostras não ventiladas, representadas pelas classes Gamma, Alpha e Deltaproteobacteria. Estudos prévios no Estreito de Bransfield, sedimentos de águas profundas de Iheya North e Iheya Ridge nos campos hidrotermais do Oceano Pacífico e cordilheira Sudoeste mostraram padrões semelhantes de classes bacterianas, sugerindo uma tendência em comunidades microbianas associadas à profundidade e configurações geoquímicas em sedimentos influenciados por fontes hidrotermais. atividade (XU et al., 2007; LIAO et al., 2011; ZHANG et al., 2015; ZHANG et al., 2016; BELL et al., 2017a).

Actinobacteria foi o segundo filo mais abundante em amostras não influenciadas por ventilação. A classe acidimicrobia foi o filotipo mais abundante desse filo e foi descrita em ambientes hidrotermais e polares (CHEN et al., 2016; ZENG et al., 2017). A maioria dos membros deste grupo é inculta e foi isolada de sítios geotérmicos (GOODFELLOW et al., 2012).

Woesearchaeota, o filo mais abundante neste estudo, foi recentemente proposto por Castelle et al. (2015), embora atualmente não exista representante cultivado. O metabolismo simbiótico e fermentativo foi proposto para Woesearchaeota através da análise de genomas seqüenciados pela técnica unicelular. Apesar dos avanços nas análises de dados genômicos e metagenômicos, a importância ecológica da Woesearchaeota ainda é desconhecida. Sequências deste filo disponíveis no banco de dados SILVA foram também obtidas de áreas com influência vulcânica em ambientes

marinhos (ROBERTSON et al., 2009; PACHIADAKI et al., 2011; CHOI et al., 2016) e não-marinhos (KAN et al., 2011; ORTIZ-ALVAREZ et al., 2016).

Candidatus Nitrosopumilus foi descrito como um grupo abundante em sedimentos do Mar de Weddell (GILLAN E DENNIS, 2007), e foi registrado em sedimentos ao longo de toda a costa ocidental da Antártida (LEARMAN et al., 2016). Os membros dessa família geralmente estão presentes em ambientes oligotróficos, desempenhando um papel importante nos processos de ciclagem de nitrogênio pela oxidação de amônia no metabolismo quimiolitotrófico (KÖNNEKE et al., 2005). A baixa abundância de *Nitrosopumilus* na amostra de HR6 pode estar relacionada com baixas concentrações de Nitrogênio total determinadas nesta amostra de sedimento.

Estudos na crista do arco posterior de Okinawa, no Pacífico Ocidental, mostraram uma maior abundância relativa de Chloroflexi em sedimentos influenciados pela atividade hidrotérmica, quando comparados a amostras de um respiradouro hidrotermal inativo (ZHANG et al., 2015). Resultados semelhantes foram relatados em amostras de sedimentos marinhos profundos de fontes hidrotermais inativas no Oceano Índico (ZHANG, 2016), o que corrobora com a detecção de Dehalococcoidia apenas em nossa amostra com influência hidrotérmica.

Como nenhum membro do Chloroflexi foi isolado de fontes hidrotermais profundas ou ativas até agora, pouco se sabe sobre seu metabolismo e papel ecológico. Estudos recentes utilizando a técnica unicelular em amostras de águas profundas mostraram que os grupos afiliados com Dehalococcoidetes apresentam metabolismo heterotrófico ou litotrófico associado a condições anaeróbias, e genes relacionados com uma potencial capacidade de degradação de compostos halogenados (KASTER et al. 2014; WASMUND et al., 2014; FULLERTON: MOYER, 2016). Além disso, novos estudos utilizando abordagens genômicas mostraram um metabolismo particularmente homoacetogênico realizado por Dehalococcoidetes usando a via Wood-Ljungdahl (WLP) (Sewell et al., 2017).

Além disso, estudos anteriores mostraram que os filos bacterianos Acetothermia, Aerophobetes e a classe Dehalococcoidia (Filo Chloroflexi) (Zhuang et al., 2014; Wang et al., 2016; Korzhenkov et al., 2018) e os filos de arqueas Aenigmarchaeota, Altiarchaeales, Hadesarchaea e Lokiarchaeota também possuem genes responsáveis pela síntese autotrófica de acetil-CoA através da via Wood-Ljungdahl (TAKAMI et al., 2012, BIRD et al., 2016; WANG et al., 2016 ADAM et al., 2018), sugerindo o importante papel das comunidades HR6 na produção primária quimiossintética. Esses filos foram anteriormente detectados em ambientes extremos, como fontes hidrotermais e fontes termais (RINKE et al. 2013, PROBST et al., 2014; SPANG et al., 2015 BAKER et al., 2016; ZAITSEVA et al., 2017).

Os mais abundantes filos de arqueias foram Woesearchaeota (anteriormente Euryarchaeota DHVEG-6) (70,7%), Thaumarchaeota (20,2%), Euryarchaeota (5,5%) e Diapherotrites (1,1%) (Figura 4).

Woesearchaeota foi o filo mais abundante de arqueias em todas as amostras, variando de 60% (HR6) a 80% em 3S. Thaumarchaeota foi o segundo filo de arqueias mais abundante nos sedimentos das profundezas do Estreito de Bransfield. A amostra BR1 apresentou a maior abundância relativa desse filo (31,73%), enquanto a amostra HR6 apresentou apenas 3,6%. As classes mais abundantes relativas neste filo foram Grupo Marinho I (17,9%), Grupo C3 (1,9%) e Grupo Bentônico Marinho A (0,4%).

A classe Marine Group I foi representada principalmente pela família Candidatus Nitrosopumilus. A amostra HR6 apresentou um perfil comunitário singular, quando comparado a todas as outras amostras do Estreito de Bransfield. A classificação taxonômica de HR6 mostrou o filo Chloroflexi (38,9%) como o mais abundante, seguido por Atribacteria (21,6%), Proteobacteria (14,3%), Aminicenantes (12,9%), Aerophobetes (5%), Actinobacteria (2,4%), TM6. (2,3%) e Acetothermia (1,3%). Para Archaea, o filo mais abundante foi Woesearchaeota (64,05%), seguido por Euryarchaeota (14,15%). Outros grupos de arqueas (ex. Diapherotrites, Aenigmarchaeota, Altiarchaeales, Hadesarchaea e Lokiarchaeota) foram detectados exclusivamente na amostra HR6.

Figura 4 – Abundância relativa dos filios mais abundantes de Bacteria (>0.1%) nas amostras de sedimento

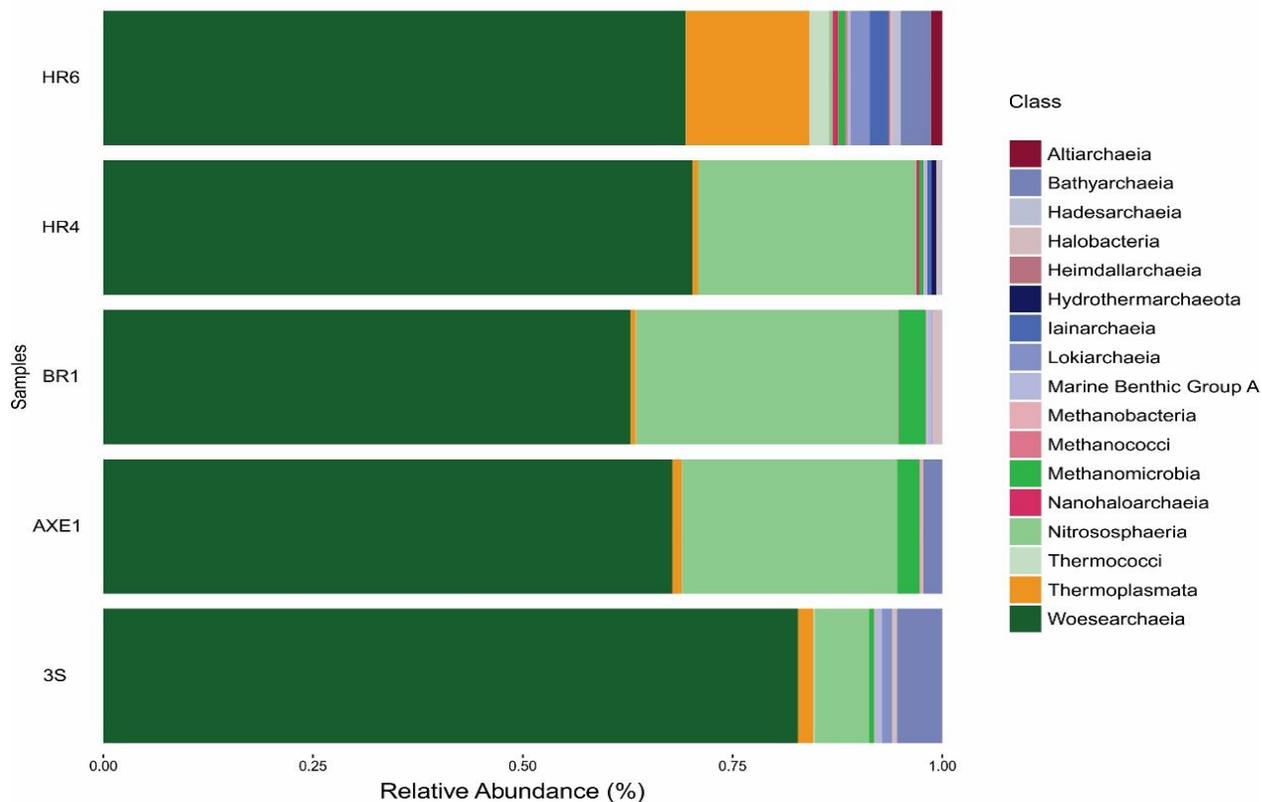
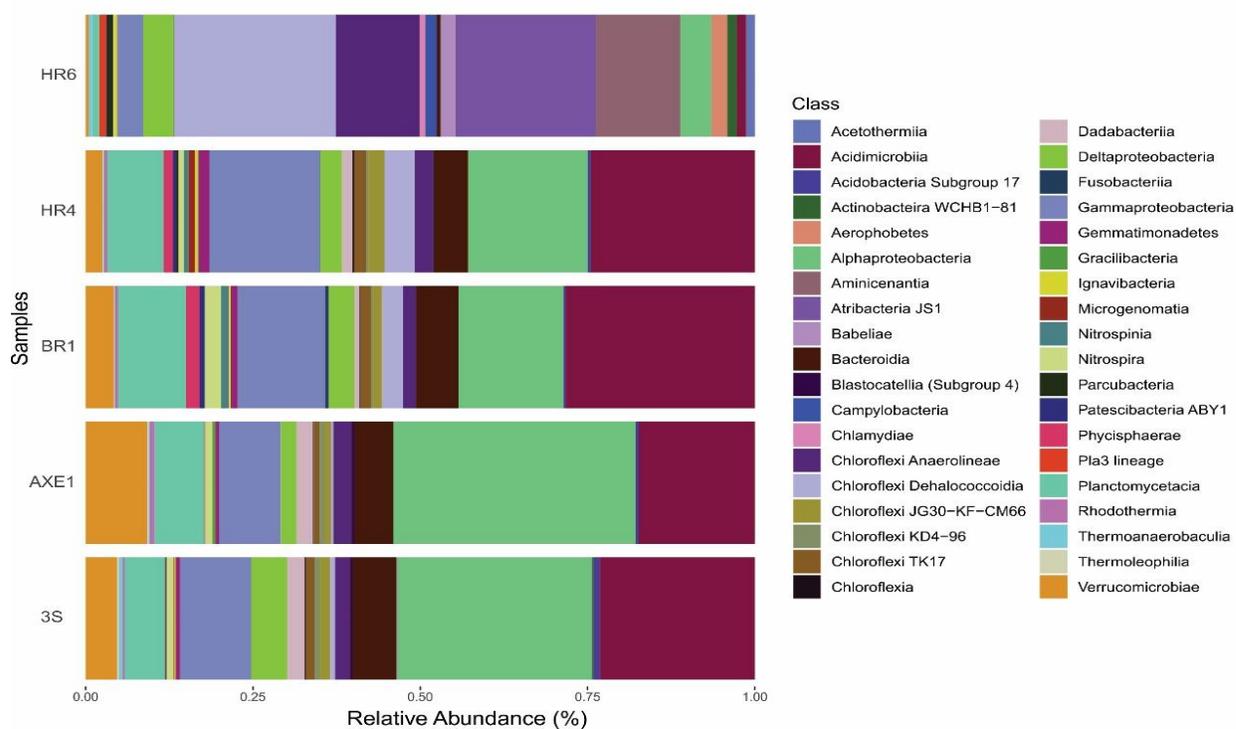


Figura 5 – Abundância relativa dos filios mais abundantes de Archaea (>0.1%) nas amostras de sedimento.



5.5 Beta-diversidade

A beta-diversidade de Bacteria e Archaea mostrou uma diferença entre as amostras de sedimento de águas profundas (Figura 6). No geral, as comunidades microbianas nas estações HR4 e BR1 foram agrupadas em um cluster, enquanto as amostras de 3S e AXE1 foram espalhadas em um ramo diferente.

A fim de identificar os principais determinantes ambientais da composição microbiana, as correlações de Spearman foram calculadas, e apenas valores significativos ($p < 0,05$) são discutidos. A maioria das OTUs bacterianas presentes em todas as amostras apresentaram correlações negativas com características geoquímicas nos sedimentos.

As OTUs bacterianas encontradas exclusivamente na amostra HR6, como OTU68, OTU85 e OTU139 (Chloroflexi; S085, Aminicenantes; uncultured e Ignavibacteriae; PHOS-HE36, respectivamente) apresentaram correlações positivas com Fe, Zn, Br, Sr, Si, Cr, Cu, Y e Ba (Figura 6a).

OTUs de arquea (OTU599 Thaumarchaeota; Grupo Marinho I e OTU57 Woesearchaeota; euryarchaeote não cultivado) encontradas em maior proporção nas amostras 3S, BR1 e AXE1 apresentaram correlação negativa com elementos traços.

OTUs únicas (OTU1966 Diapherotrites: Candidatus Iainarchaeum; OTU1585 Hadesarchaea: Archaea não cultivada; OTU1550 Woesearchaeota (DHVEG-8); Archaeon não cultivado) obtidas da amostra HR6 mostraram correlações positivas com todos os elementos geoquímicos, e foram particularmente maiores com Ba, Cu e Y. O TOC e V mostraram correlações negativas para a maioria das OTUs únicas na HR6, provavelmente devido aos menores valores de TOC encontrados nesta amostra, e também nenhum V foi detectado nesta amostra de sedimento (Figura 8).

Os resultados da diversidade beta mostraram uma clara diferença entre o perfil bacteriano e de arqueias HR6 comparado com as outras amostras. Correlações estatísticas com metais podem sugerir adaptação microbiana a condições geoquímicas

específicas (ZHANG et al., 2016). No nosso caso, a prevalência de filotipos relacionados à atividade quimiossintética e tolerância a metais pesados (Cu, V e Y) HR6 pode sugerir um ambiente influenciado pela atividade hidrotermal em seu passado recente. Esses metais são membros finais em fontes potenciais de energia para quimioautotrofos de águas profundas (DING et al., 2017), sugerindo uma influência geoquímica que impulsiona uma composição específica da comunidade microbiana nessa área.

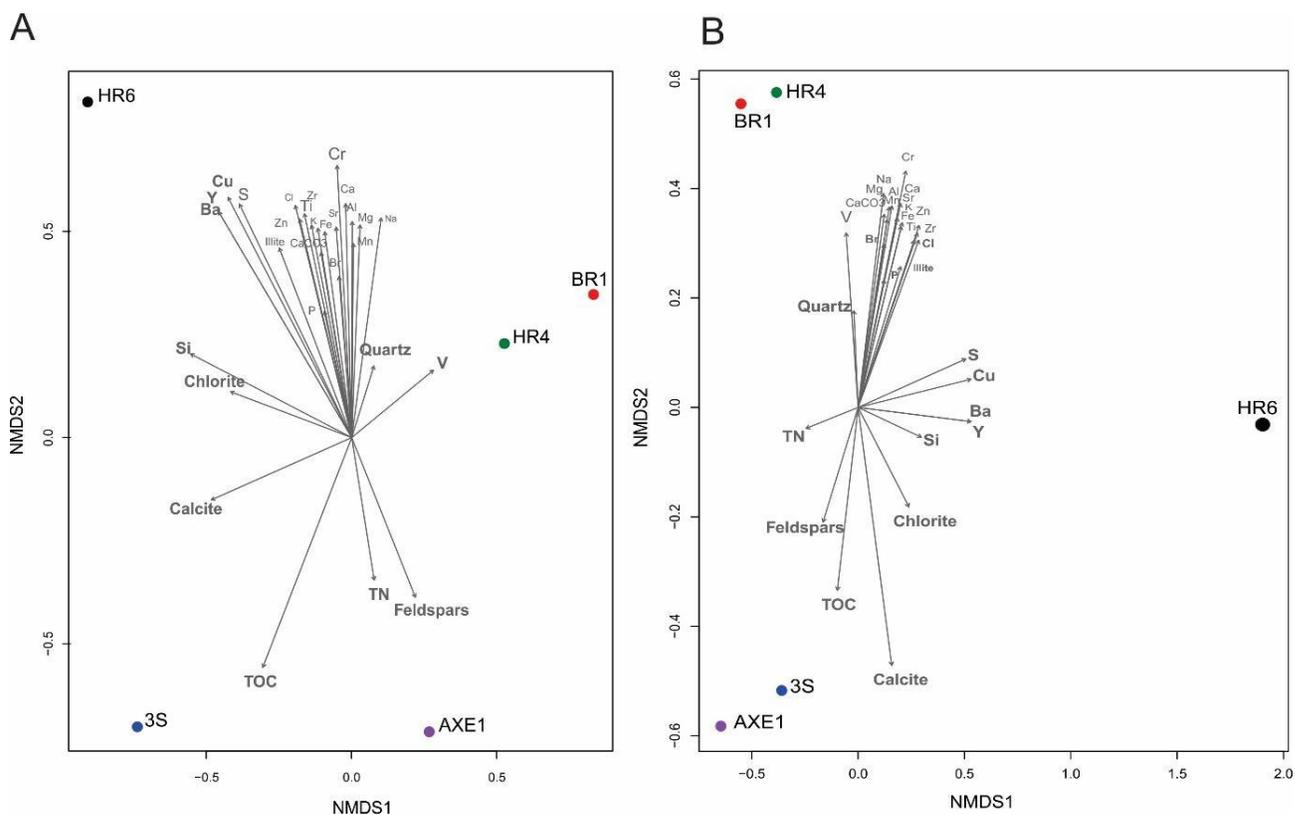


Figura 6 - Non-metric multidimensional scaling (nMDS) ordination based on weighted UniFrac distance, with plotting of environmental parameters for bacterial (A) and archaeal (B) communities.

6 Perfil Metagenômico Das Comunidades Microbianas Em Hook-Ridge, Estreito De Bransfield, Península Antártica

6.1 Classificação taxonômica dos genes funcionais

Os perfis taxonômicos obtidos através das classificações com o melhor *e-value* foi realizado empregando a base de dados do NCBI. É importante destacar que essa análise não é baseada no gene 16S rRNA, mas na classificação taxonômica das sequências de proteínas depositadas na base de dados.

De acordo com o *heatmap* da figura 10, não houve grupos abundantes comuns em todas as amostras. As classes *Nitrospira*, *Cyanobacteria*, *Cytophagia*, *Actinobacteria*, *Verucomicrobiae* e *Dadabacteria* foram detectados nas amostras HR6, 3S e HR4. No entanto, na amostra BR1, a abundância relativa desses grupos foi menor.

De modo geral, a grande maioria dos grupos detectados no metagenoma, foram também detectados pelo sequenciamento do gene RNAr 16S. Cabe ressaltar a presença do Filo Firmicutes (Bacilli), nas amostras HR4 e HR6. Alguns gêneros foram classificados como *Bacillus*, *Geobacillus* e *Lysinibacillus*.

Este resultado demonstra a importância dos métodos independentes de amplificação nos estudos de ecologia microbiana, principalmente em ambientes extremos onde a estrutura das comunidades procarióticas é desconhecida. Também é importante destacar a influência do método de extração de DNA, pois dependendo do protocolo, diferentes grupos de microrganismos podem ser subestimados, como no caso dos formadores de esporos.

A amostra HR6, observou-se um perfil taxonômico bem específico, assim como nos resultados do sequenciamento do gene RNAr 16S. Grupos como *Atribacteria*, *Bathyarchaeota*, *Lokiarchaeota*, *Dehalococcoida*, *Epsilonproteobacteria*, *Ignavibacteria* entre outros, foram detectados exclusivamente na amostra HR6.

Em contrapartida, alguns grupos como *Gammaproteobacteria*, *Flavobacteria*, *Nitrosopumilales*, *Planctomycetes*, etc., foram mais abundantes nas amostras BR1, HR4 e 3S

5.3.2 Classificação dos genes funcionais

A análise funcional do metabolismo geral das sequências foi realizada usando a base de dados SEED-*subsystems*, pois mostrou uma maior quantidade de sequências identificadas em todas as amostras.

Na anotação pela base de dados SEED, os *reads* são classificados segundo funções específicas na célula. Na categoria 1, as sequências são divididas em 28 categorias diferentes. O perfil funcional das amostras é apresentado na figura 10.

O perfil funcional exibiu uma separação das amostras de acordo com a atividade hidrotermal. As amostras HR4 e HR6 apresentaram perfis mais parecidos, enquanto que as amostras BR1 e 3S apresentaram maior relação entre elas.

Na amostra HR6 nota-se uma maior abundância de genes envolvidos com o metabolismo de compostos aromáticos, metabolismo de proteínas e metabolismo de acetona. Na amostra HR4, genes relacionados com elementos transponíveis, fagos, motilidade, quimiotaxia e metabolismo de nucleotídeos foram os mais abundantes.

Nas amostras BR1 e 3S, os metabolismos de nitrogênio, regulação transcricional, respiração e autotrofia foram os mais abundantes. Cabe destacar que os genes anotados na base de dados SEED, consideram os genes de autotrofia classificados no grupo de fotossíntese e genes eucariotos.

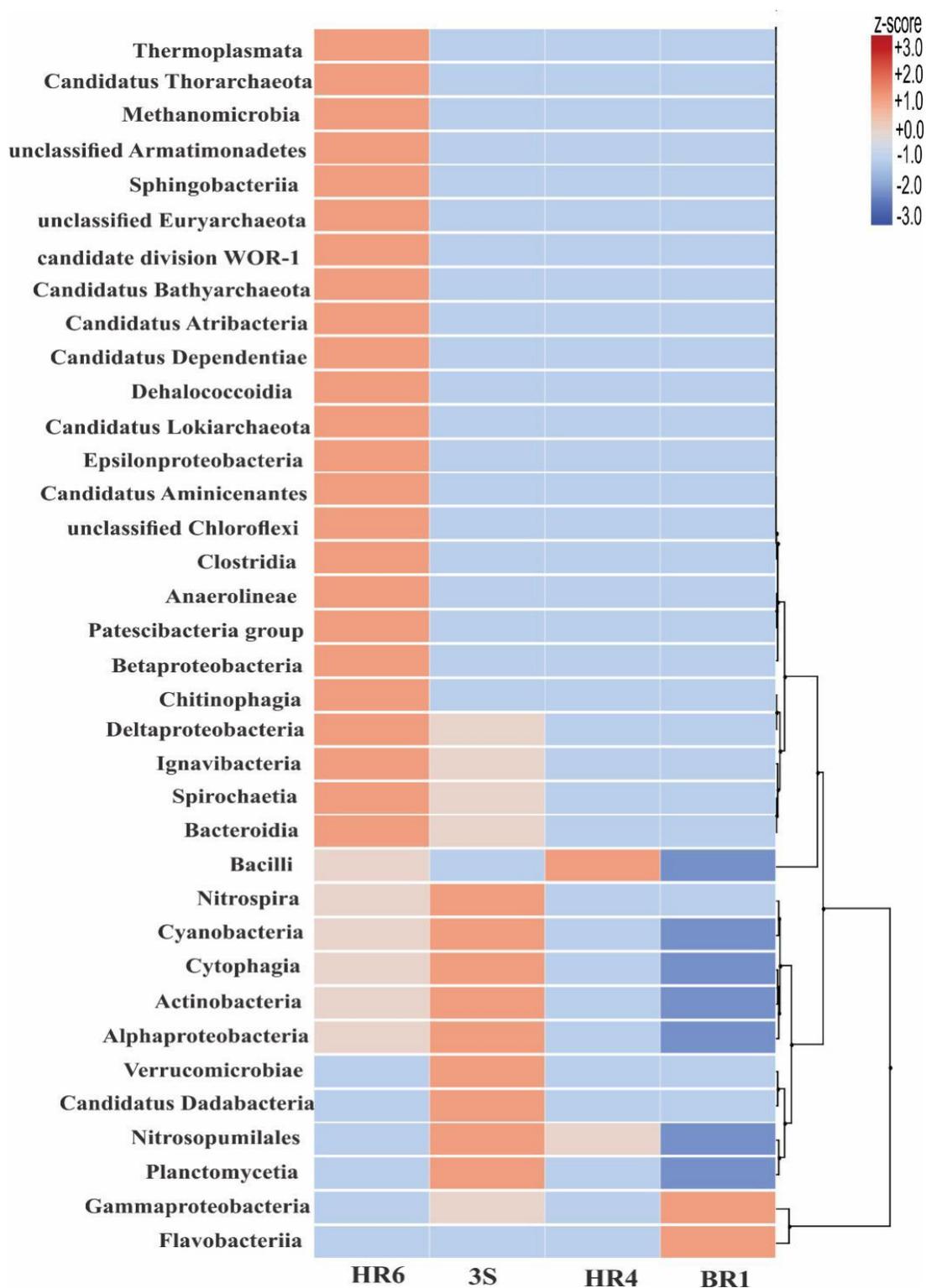


Figura 9 – Heatmap exibindo os grupos taxonômicos das amostras de sedimento do Estreito de Bransfield.

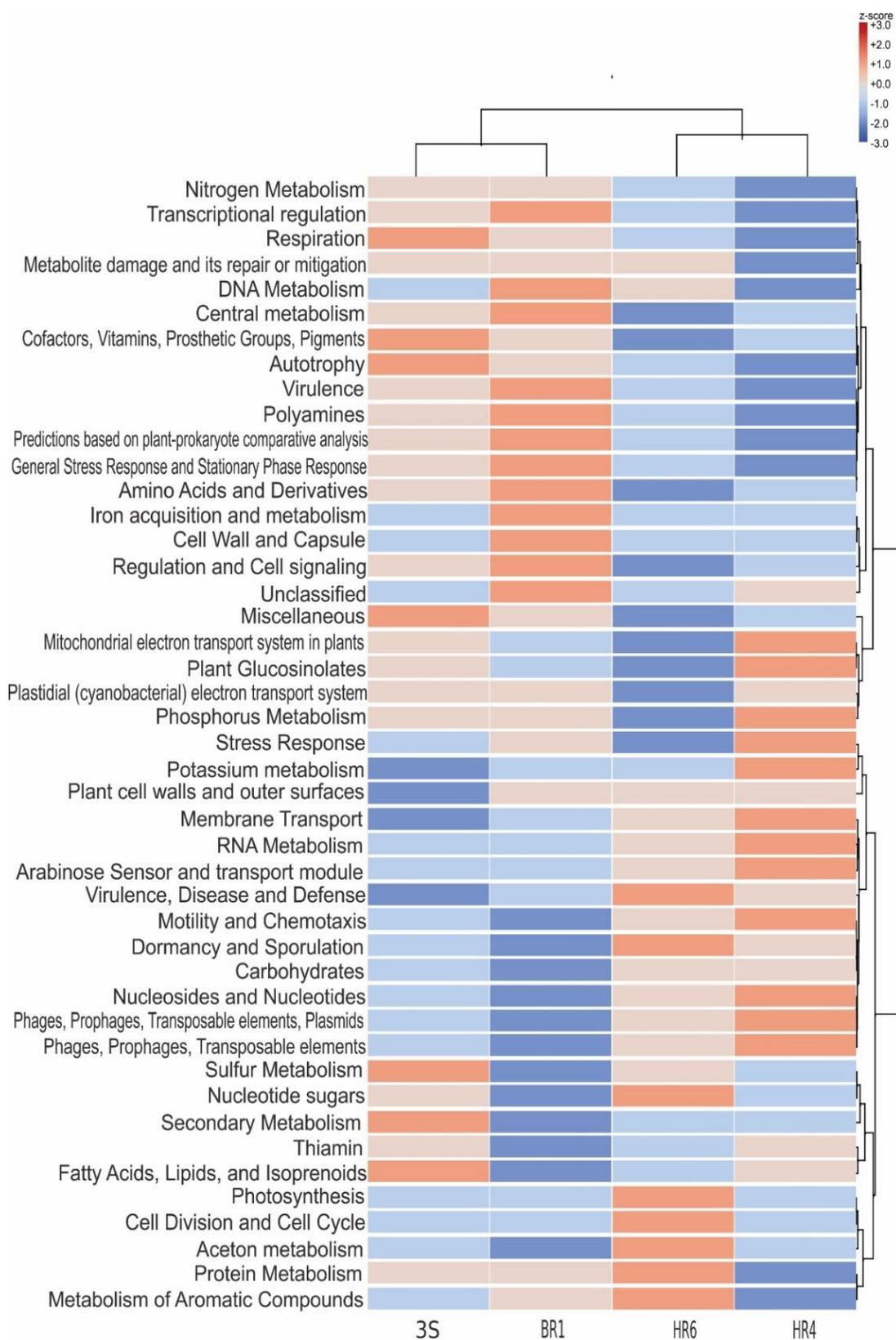


Figura 10 – Heatmap exibindo o perfil funcional das amostras de sedimento do Estreito de Bransfield baseado no nível 1 do SEED-subsystems.

5.3.3 Fixação de Carbono

A fixação é um processo biossintético fundamental dos micro-organismos nas fontes hidrotermais para assimilar carbono inorgânico em matéria orgânica. Dados disponíveis sugerem que os ciclos de Calvin-Benson-Bassham (CBB) e o ciclo redutor dos ácidos tricarboxílicos (rTCA) são as vias metabólicas predominantes em ambientes hidrotermais (NAKAGAWA: TAKAI, 2008; CAMPBELL et al., 2006; SIEVERT et al., 2008)

A presença dos genes que codificam as enzimas chave da via redutora dos ácidos tricarboxílicos foram encontradas em todas as amostras. A enzima ATP citrato liase(*acI*) apresentou uma maior proporção na amostra HR6. A prevalência desse gene na amostra com atividade hidrotermal pode estar associada à presença de *Epsilonproteobacteria* exclusivamente nessa amostra.

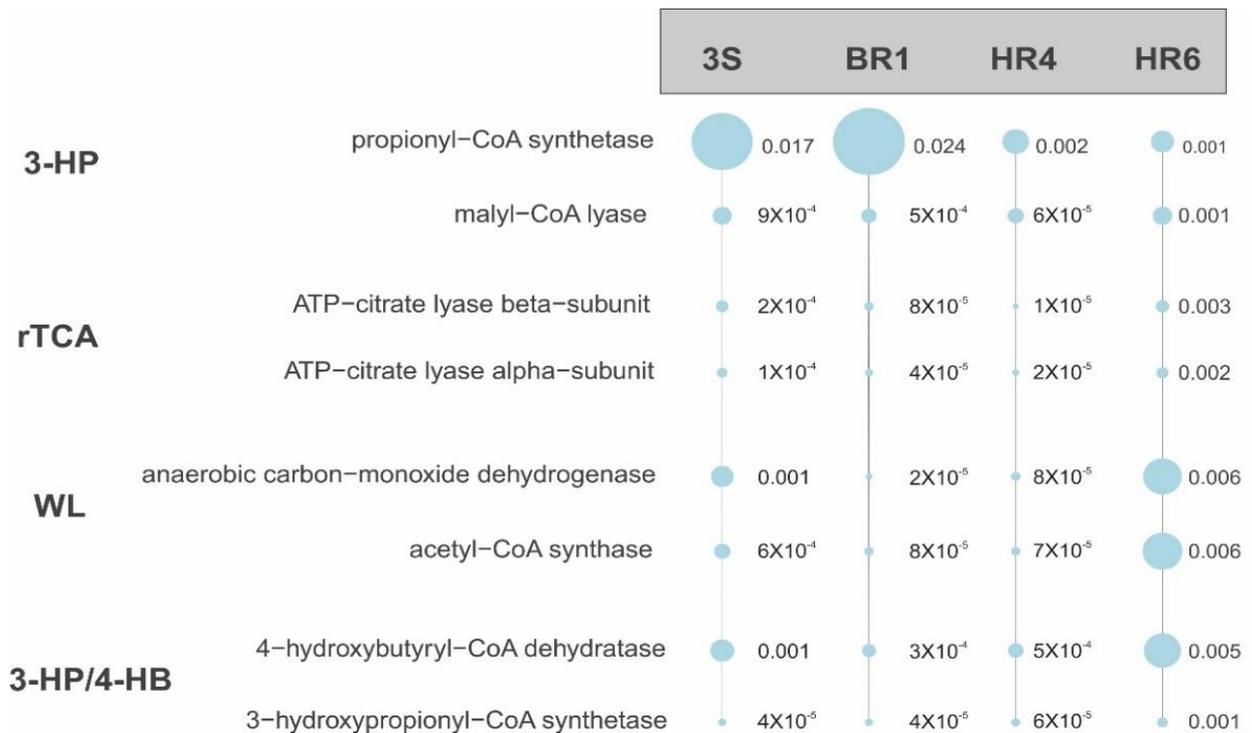


Figura 11 – Proporção dos genes chave que codificam as proteínas envolvidas com a fixação de carbono. Cada bolha representa a abundância relativa do gene comparado com o número total de genes analisados no metagenoma

As sequências do gene *acI* presentes nas amostras 3S, BR1 e HR4 foram associadas ao grupo *Nitrospira*. O ciclo rTCA pode ser uma vantagem em ambientes

energeticamente limitados devido a seu menor requerimento de ATP e equivalentes redutores quando comparados com outras vias metabólicas (HUGER; SIEVERT, 2011)

As enzimas propionil-CoA sintetase (*prpE*) e malil-CoA liase (*mcl*) são enzimas importantes no ciclo 3-hidroxiopropionato (3-HP). A *prpE* apresentou uma maior proporção nas amostras 3S e BR1. Apesar dessa alta abundância, esse gene também faz parte do metabolismo do propionato, sendo um intermediário no metabolismo de aminoácidos. As sequências desse gene apresentaram foram associadas a membros da classe *Bacilli*.

No entanto, a enzima *mcl* foi mais abundante nas amostras HR4 e HR6, sendo que as sequências foram classificadas como *Gammaproteobacteria* e *Alphaproteobacteria*, grupos previamente descritos (ZARZYCKI et al., 2009; HUGLER; SIEVERT, 2011; WANG; SONG, 2016). Apesar da presença desses genes, um fato interessante foi a ausência da enzima malonil-CoA redutase, considerada como a principal enzima do ciclo 3-HP. Isso sugere que não há comunidades microbianas ativas nas amostras, capazes de fixar carbono inorgânico usando essa via metabólica (CERQUEIRA et al., 2018)

O ciclo 3-hidroxiopropionato/4-hidroxiбутирато (3-HP/4-HB) é principalmente conhecido por ser realizado pelos membros termoacidofílicos autotróficos do filo *Thaumarchaeota* (HUGLER; SIEVERT, 2011). A principal enzima desse ciclo, 4-hidroxiбутирил-CoA desidratase (*abfD*) foi detectada em maior proporção na amostra HR6, cuja classificação taxonômica foi relacionada com a classe *Nitrososphaeria*.

Esse grupo de quimiolitautotróficos aeróbios são conhecidos pela capacidade de oxidar amônia e de obter energia através da via 3HP-4-HB (HERBOLD et al, 2015).

O ciclo redutivo Acetil-CoA ou Wood-Ljungdahl (WL) é considerado um mecanismo muito importante de fixação de CO₂ sob condições anaeróbicas e redutoras nos domínios *Bacteria* e *Archaea* (HUGLER; SIEVERT, 2011). Genes marcadores desta via metabólica foram detectados em todas as amostras. Os genes *carbon monoxide hydrogenase (cdhA)* e acetil CoA sintase (*acsB*) apresentaram uma maior proporção na amostra HR6.

O principal gene desta via é o *cdhA* que está envolvido tanto na oxidação de CO e na redução de sulfato quanto na redução de CO₂ a acetato (acetogênese) ou metano (metanogênese) (WU et al., 2005; KING: WEBER, 2007). As sequencias desses genes foram classificadas nos grupos *Deltaproteobacteria* (redutores de sulfato) e *Thermoplasmata*, apresentando resultados similares com trabalhos realizados no *Mid Atlantic Ridge* (CERQUEIRA et al, 2018).

Apesar de ser uma das vias metabólicas mais estudadas e amplamente distribuídas em ambientes hidrotermais e quimiossintéticos, as enzimas chave do ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB) não foram identificadas em nenhuma das amostras neste estudo.

5.3.4 Metabolismo do enxofre

A oxidação do enxofre foi relatada como a via metabólica dominante para o crescimento quimiolitoautotrófico em ambientes hidrotermais onde o ácido sulfídrico é o principal doador de elétrons utilizado pelos organismos que realizam quimiossíntese (REINTHALER et al., 2010; ANANTHARAMAN et al., 2013).

Neste trabalho foram detectados genes envolvidos com diversas vias metabólicas do enxofre, incluindo os da oxidação desassimilatória do sulfeto a enxofre elementar, o sistema oxidativo SOX, responsável pela oxidação do tiosulfato e a redução desassimilatória reversa de sulfito encarregada da oxidação do enxofre a sulfato (figura 12)

A oxidação de sulfeto é levada a cabo principalmente por duas flavoproteínas: sulfeto quinona-reductase (*sqr*) e pela flavocitocromo-S sulfeto deshidrogenase (*fccAB*). Essas enzimas são encarregadas de oxidar o sulfeto em polisulfeto e são responsáveis por começar o fluxo de elétrons do sulfeto até a cadeia transportadora. A sulfeto quinona-reductase foi encontrada em todas as amostras, no entanto a flavocitocromo-S sulfeto deshidrogenase não foi detectada na amostra BR1 e a proporção dessa enzima nas outras amostras foi mínima. A identidade taxonômica das sequencias está associada a *Epsilonproteobacteria*, organismos oxidadores do enxofre.



Figura 12 – Proporção dos genes chave que codificam as proteínas envolvidas com o metabolismo do enxofre.

Os genes que compõem o sistema multienzimático SOX encarregado da oxidação do tiosulfato até sulfato foram detectados em todas as amostras. O primeiro estágio da oxidação do tiosulfato até enxofre elementar, envolve o complexo SOX (soxABXYZ).

Todas as enzimas do complexo SOX foram detectadas nas amostras, no entanto, em baixa proporção. As sequências desses genes foram relacionadas taxonomicamente com o gênero *Sulforovum*. Esses resultados coincidem com trabalhos anteriores onde foi proposto esse tipo de metabolismo realizado por membros quimiolitotróficos de mar profundo pertencentes ao grupo *Epsilonproteobacteria* (YAMAMOTO: TAKAI, 2011). Em contrapartida, os genes soxCD, encarregados de completar a oxidação do enxofre em sulfato, não foram encontrados, sugerindo uma oxidação parcial do enxofre.

A oxidação de compostos de enxofre nos sedimentos do estreito de Bransfield parece ser feita através da via da redução de sulfato reversa, assim como já foi relatado em diferentes ambientes hidrotermais (XIE et al., 2011; WANG: SUN, 2016; OULAS et al., 2016). Os genes envolvidos nesta via metabólica produzem as enzimas tiosulfato sulfurtransferase (*tst*), que oxida tiosulfato em sulfito (SO_3^{-2}), o complexo desassimilatório sulfito reductase reverso (*dsrAB*) responsáveis pela oxidação do enxofre elementar em sulfito, adenilsulfate reductase (*aprAB*) e sulfate adeniltransferase, responsáveis pela oxidação de sulfito em sulfato (MEYER: KUEVER, 2007).

A utilização da via redutora de sulfato reversa em vez do complexo SOX em ambientes hidrotermais foi previamente reportado por NAKAGAWA 2008 e YAMAMOTO, 2011, podendo explicar a alta abundancia desses genes não só na amostra HR6 como nas outras amostras, em menor proporção.

A via dissimilatória redutora de sulfato, realizada por procariotos redutores de sulfato, utiliza as mesmas enzimas reversíveis: sulfato adeniltransferase (*sat*), adenililsulfato reductase (*apr*) e o complexo desassimilatorio sulfito reductase. Esses dados sugerem que o metabolismo do enxofre predominante nas amostras do estreito de Bransfield, especificamente em HR6 é realizado por processos reversos de oxidação de sulfito em sulfeto e da mesma maneira, sugere que as vias metabólicas oxidadoras do enxofre são a fonte de energia mais representativa, que serve de suporte à quimiolitotrofia nesses sedimentos antárticos.

5.3.5 Metabolismo do nitrogênio

O ciclo do nitrogênio tem sido previamente descrito como um dos atores principais no estabelecimento de ambientes geoquímicos em fontes hidrotermais. Dinitrogênio (N_2) é a forma de nitrogênio mais abundante na água do marmas só pode ser metabolizada pelos micro-organismos fixadores de Nitrogênio (LAM;COWEN: JONES, 2004). Compostos nitrogenados inorgânicos (ex. nitrato e nitrito) são dois dos aceptores de elétrons do metabolismo quimiolitotrofico em fontes hidrotermais (OULAS et al., 2016; NAKAGAWA; TAKAI, 2008).

Os resultados das principais vias metabólicas do nitrogênio mostraram uma maior proporção de genes relacionados com processos de desnitrificação, metabolismo de glutamina e oxidação de amônia respectivamente (Figura 13).

O processo de desnitrificação envolve a redução sucessiva de nitrato (NO_3) em nitrito (NO_2), óxido nítrico (NO), óxido nítrico (N_2O) e dinitrogênio (N_2) pelas enzimas nitrato reductase (*narGH* ou *napA*), nitrito reductase (*nirK*), óxido nítrico reductase (*norB*) e óxido nítrico reductase (*nosZ*) respectivamente (STEIN, 2011).

A grande maioria dos genes marcadores dessas enzimas foram identificados em todas as amostras, no entanto, a abundância relativa dos genes envolvidos com o processo de desnitrificação foi maior nas amostras 3S e BR1. As sequências desses genes foram classificadas taxonomicamente nos grupos Planctomycetes, Epsilonproteobacteria, Ignavibacteria, Bacilli e Cytophagia e coincidem com resultados de diversos estudos em sedimentos marinhos e fontes hidrotermais (ABIN: HOLLIBAUGH, 2016; HIRAS et al., 2016; DING et al., 2017; STORESUND et al., 2018)

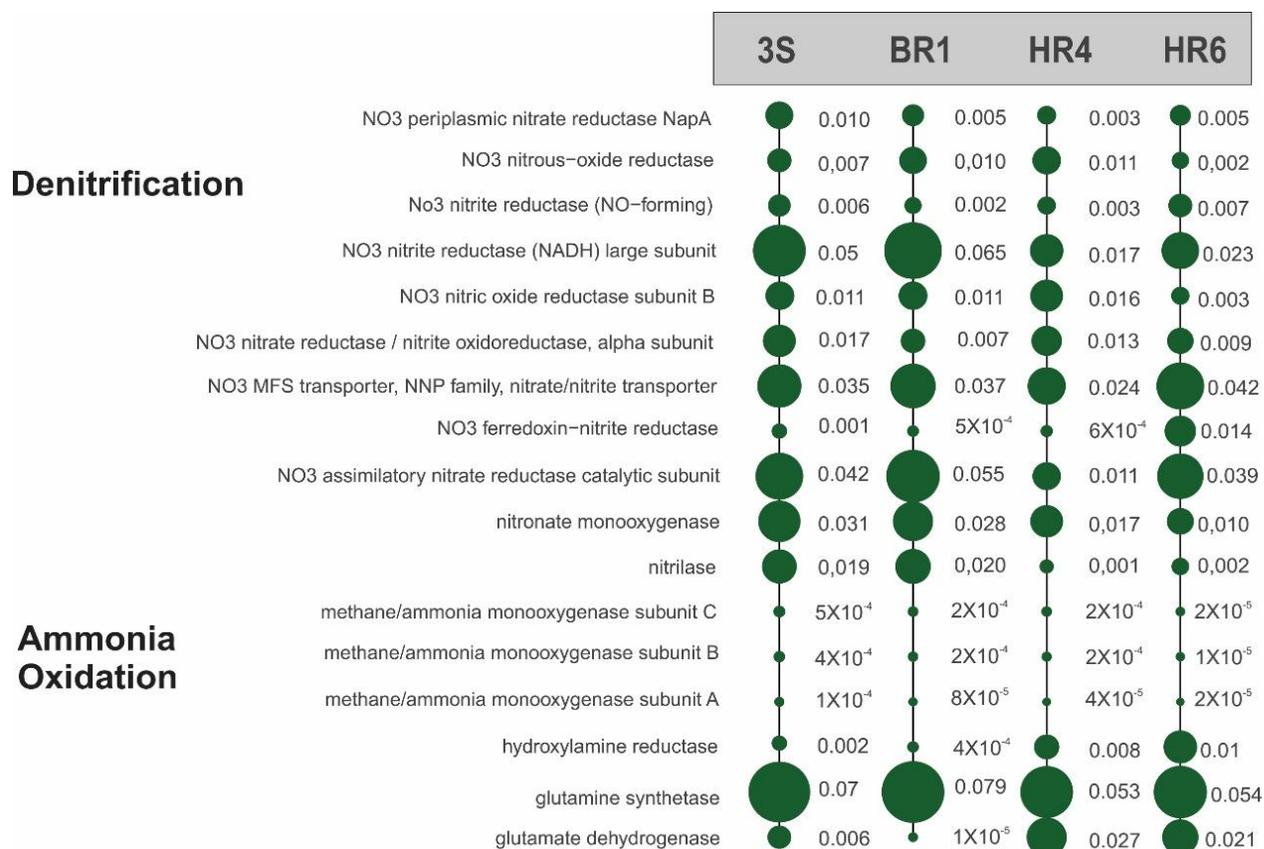


Figura 13 – Proporção dos genes chave que codificam as proteínas envolvidas com o metabolismo do nitrogênio.

Apesar do baixo número de sequências do gene *amoA* (amônia monooxigenase) encontradas nas amostras, membros dos grupos *Nitrosopumilus* e *Nitrosospira* talvez sejam os principais oxidadores de amônia em HR6. Esses taxa são membros comuns em ambientes marinhos profundos, sendo importantes no ciclo do nitrogênio e já foram encontrados em ambientes hidrotermais (ROUSELL et al., 2011; CERQUEIRA et al., 2018).

Além da oxidação aeróbica de amônia, foram detectados genes na relacionados com a oxidação anaeróbica de amônia, especificamente hidroxilamina oxidoreductase. Esses genes foram mais abundantes nas amostras HR6 e HR4 respectivamente, apresentando taxonomia relacionada com Planctomycetes. Membros desse grupo já foram reportados em fontes hidrotermais (BRYNE et al., 2009). Apesar do baixo número de sequências relacionadas com esse gene, a presença desse tipo de proteínas sugere que a hidroxilamina pode ser um intermediário para grupos microbianos que utilizam amônia como doador de elétrons.

Genes relacionados com o metabolismo de glutamina apresentaram uma alta abundância em todas as amostras. Glutamina sintetase e glutamato dehidrogenase são enzimas que catalisam a formação de glutamato, que posteriormente fará parte do metabolismo de aminoácidos. Sequências relacionadas aos grupos de Firmicutes (*Bacillus*), Gammaproteobacteria (*Psychrobacter*) e Alphaproteobacteria (*Sulfitobacter*) foram detectados nas amostras, todos eles, conhecidos por realizarem metabolismo heterotrófico (CREPEU et al., 2011).

6 CONCLUSÕES

Diante os resultados apresentados neste trabalho fica claro que os ambientes hidrotermais no Estreito de Bransfield possuem uma versatilidade metabólica enorme. Os perfis taxonômicos e funcionais das comunidades microbianas associadas a exsudações geotermiais apresentaram características polivalentes, diferentes das amostras sem influência hidrotermal, desta maneira conclui-se:

- A amostra HR6 (amostra coletada na área potencialmente com influência hidrotermal) apresentou um perfil de comunidade diferente das outras amostras estudadas. Análises de abundância relativa mostraram grupos taxonômicos específicos já relatados em outras áreas hidrotermais ativas, fora da Antártica e com metabolismo quimiolitotrófico e apresentou filotipos de *Archaea* descritos pela primeira vez no oceano austral.
- O nosso estudo confirma que os sedimentos do Estreito de Bransfield abrigam comunidades microbianas com metabolismo quimiolitotrófico.
- O processo de oxidação de enxofre é altamente distribuído ao longo das camadas superficiais dos sedimentos do Estreito de Bransfield
- A denitrificação assimilatória foi o metabolismo quimiossintético mais abundante, nas amostras sem influência hidrotermal.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstram a importância de se estudar a região de Hook-Ridge com mais profundidade.

Devido às dificuldades logísticas de traslado, coleta e processamento *in situ* das amostras, é necessário planejar e utilizar novas estratégias para obter novos resultados.

O uso de veículos submersíveis, como por exemplo ROV (Remotely Operated underwater Vehicle) e HOV (Human Occupied Vehicle), capazes de coletar em locais específicos possibilitaria uma seleção mais acurada do tipo de amostra, seja testemunhos de sedimento ou amostra de rocha basáltica para realizar análises mais precisas.

Baseado nos resultados do metagenoma, a possibilidade de realizar cultivos de microrganismos quimiolitotróficos fica mais próxima, pois diante uma preleção dos organismos alvo, será possível desenhar uma estratégia para enriquecer, isolar e identificar organismos que potencialmente podem ser modelos no estudo da origem da vida no planeta e com um potencial biotecnológico incalculável.

REFERÊNCIAS*

ABIN, Christopher A.; HOLLIBAUGH, James T. Draft genome sequence for the type strain *Vulcanibacillus modesticaldus* BR, a strictly anaerobic, moderately thermophilic, and nitrate-reducing bacterium isolated from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. **Genome Announc.**, v. 4, n. 6, p. e01246-16, 2016.

AMANN, Rudolf I.; LUDWIG, Wolfgang; SCHLEIFER, Karl-Heinz. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

ANANTHARAMAN, Karthik et al. Evidence for hydrogen oxidation and metabolic plasticity in widespread deep-sea sulfur-oxidizing bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 1, p. 330-335, 2013.

ANANTHARAMAN, Karthik; BREIER, John A.; DICK, Gregory J. Metagenomic resolution of microbial functions in deep-sea hydrothermal plumes across the Eastern Lau Spreading Center. **The ISME journal**, v. 10, n. 1, p. 225, 2016.

ANDERSON, R. E.; SOGIN, M. L.; BAROSS, J. A. Biogeography and ecology of the rare and abundant microbial lineages in deep-sea hydrothermal vents. **FEMS microbiology ecology**, 91(1), 1-11, 2015.

AQUILINA, Alfred et al. Geochemical and visual indicators of hydrothermal fluid flow through a sediment-hosted volcanic ridge in the Central Bransfield Basin (Antarctica). **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54686, 2013.

BACH, Wolfgang et al. Energy in the dark: fuel for life in the deep ocean and beyond. **Eos, Transactions American Geophysical Union**, v. 87, n. 7, p. 73-78, 2006.

* De acordo com:

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

BAKER, Brett J. et al. Genomic inference of the metabolism of cosmopolitan subsurface Archaea, Hadesarchaea. **Nature microbiology**, v. 1, n. 3, p. 16002, 2016.

BELL, James B.; WOULDSON, Clare; VAN OEUVELEN, Dick. Hydrothermal activity, functional diversity and chemoautotrophy are major drivers of seafloor carbon cycling. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 12025, 2017.

BIRD, Jordan T. et al. Culture independent genomic comparisons reveal environmental adaptations for Altiarchaeales. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1221, 2016.

BOHRMANN, Gerhard et al. Hydrothermal activity at Hook Ridge in the central Bransfield basin, Antarctica. **Geo-marine letters**, v. 18, n. 4, p. 277-284, 1998.

BOITEAU, L. & PASCAL, R. Energy sources, self-organization, and the origin of life. **Origins of Life and Evolution of Biospheres**, 41(1), 23-33, 2011.

BOWLER, Chris; VARDI, Assaf; ALLEN, Andrew E. Oceanographic and biogeochemical insights from diatom genomes. **Annual review of marine science**, v. 2, p. 333-365, 2010.

BRAZELTON, William J. et al. Archaea and bacteria with surprising microdiversity show shifts in dominance over 1,000-year time scales in hydrothermal chimneys. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 4, p. 1612-1617, 2010.

BUCHFINK, Benjamin; XIE, Chao; HUSON, Daniel H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature methods**, v. 12, n. 1, p. 59, 2015.

BUTTERFIELD, D. A. et al. Seafloor eruptions and evolution of hydrothermal fluid chemistry. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 355, n. 1723, p. 369-386, 1997.

QUAST, Christian et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012.

CAMPBELL, Barbara J. et al. Diffuse flow environments within basalt-and sediment-based hydrothermal vent ecosystems harbor specialized microbial communities. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 182, 2013.

CAMPBELL, Barbara J. et al. The versatile ϵ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 458, 2006.

CAO, Huiluo et al. Microbial sulfur cycle in two hydrothermal chimneys on the Southwest Indian Ridge. **MBio**, v. 5, n. 1, p. e00980-13, 2014.

CAPORASO, J. Gregory et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335, 2010.

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

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

CASTELLE, Cindy J. et al. Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. **Current biology**, v. 25, n. 6, p. 690-701, 2015.

CASTRO, A. P. DE et al. Construction and validation of two metagenomic DNA libraries from Cerrado soil with high clay content. **Biotechnology letters**, v. 33, n. 11, p. 2169–75, 2011

CERQUEIRA, Teresa et al. Sediment microbial diversity of three deep-sea hydrothermal vents southwest of the Azores. **Microbial ecology**, v. 74, n. 2, p. 332-349, 2017.

CERQUEIRA, Teresa et al. Metagenomic Signatures of Microbial Communities in Deep-Sea Hydrothermal Sediments of Azores Vent Fields. **Microbial ecology**, p. 1-17, 2018.

CHOI, Heebok et al. Microbial community composition in the marine sediments of Jeju Island: next-generation sequencing surveys. **J Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 883-890, 2016.

CORLISS, John B. Oasis of life in the cold abyss. **Nat Geographic Mag**, v. 152, p. 440-453, 1977.

CRÉPEAU, Valentin et al. Diversity and function in microbial mats from the Lucky Strike hydrothermal vent field. **FEMS microbiology ecology**, v. 76, n. 3, p. 524-540, 2011.

DAHLMANN A.; WALLMANN K.; SAHLING H.; SARTHOU G.; BOHRMANN G.; PETERSEN S.; CHIN C. S.; KLINKHAMMER G. P. Hot vents in an ice-cold ocean: indications for phase separation at the southernmost area of hydrothermal activity, Bransfield Strait, Antarctica. **Earth Planet. Sci. Lett.** 193, 381–394, 2001

DEMASTER, D. J.; HARDEN, S. L.; NITTROUER, C. A. Rates of Holocene sedimentation on the western continental shelf of the Antarctic Peninsula. **US Antarctic Journal**, v. 23, p. 94-96, 1988.

DICK, Gregory J. et al. The microbiology of deep-sea hydrothermal vent plumes: ecological and biogeographic linkages to seafloor and water column habitats. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 124, 2013.

DICK, Gregory J. The microbiomes of deep-sea hydrothermal vents: distributed globally, shaped locally. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1, 2019.

DICK, Gregory J.; TEBO, Bradley M. Microbial diversity and biogeochemistry of the Guaymas Basin deep-sea hydrothermal plume. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 1334-1347, 2010.

DING, Jian et al. Microbial community structure of deep-sea hydrothermal vents on the ultraslow spreading Southwest Indian ridge. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1012, 2017.

DUNNE, John P.; SARMIENTO, Jorge L.; GNANADESIKAN, Anand. A synthesis of global particle export from the surface ocean and cycling through the ocean interior and on the seafloor. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 21, n. 4, 2007.

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

FABRES J.; CALAFAT A.; CANALS M.; BARCENA M. A; FLORES J. A. Bransfield Basin fine-grained sediments: late-Holocene sedimentary processes and Antarctic oceanographic conditions. **The Holocene**. 10, 703–718, 2000.

FIELD, Christopher B. et al. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. **science**, v. 281, n. 5374, p. 237-240, 1998.

FLORES, G. E.; SHAKYA, M.; MENEGHIN, J.; YANG, Z. K.; SEEWALD, J. S.; GEOFF WHEAT, C.; PODAR, M.; REYSENBACH, A. L. Interfield variability in the microbial communities of hydrothermal vent deposits from a backarc basin. **Geobiology**, 10(4), 333-346. 2012.

FLORES, Gilberto E. et al. Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 8, p. 2158-2171, 2011.

FRANK, Kiana L. et al. Characterizing the distribution and rates of microbial sulfate reduction at Middle Valley hydrothermal vents. **The ISME journal**, v. 7, n. 7, p. 1391, 2013.

FRETZDORFF S. AND SMELLIE J. L. Electron microprobe characterization of ash layers in sediments from the central Bransfield basin (Antarctic Peninsula): evidence for at least two volcanic sources. **Antarct. Sci.** 14, 412–421, 2002

FRY, John C. et al. Prokaryotic biodiversity and activity in the deep subseafloor biosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 2, p. 181-196, 2008.

FULLERTON, Heather; MOYER, Craig L. Comparative single-cell genomics of Chloroflexi from the Okinawa Trough deep-subsurface biosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 82, n. 10, p. 3000-3008, 2016.

GERMAN, Christopher R. et al. Diverse styles of submarine venting on the ultraslow spreading Mid-Cayman Rise. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 32, p. 14020-14025, 2010.

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

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

HERBOLD CW, LEBEDEVA E, PALATINSZKY M, WAGNER M (2015) Candidatus Nitrosotenuis. **Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria**. John Wiley & Sons, Ltd

HIGASHI, Yousuke et al. Microbial diversity in hydrothermal surface to subsurface environments of Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, using a catheter-type in situ growth chamber. **FEMS microbiology ecology**, v. 47, n. 3, p. 327-336, 2004.

HILL, Tom CJ et al. Using ecological diversity measures with bacterial communities. **FEMS microbiology ecology**, v. 43, n. 1, p. 1-11, 2003.

HIRAS, Jennifer et al. Refining the phylum Chlorobi by resolving the phylogeny and metabolic potential of the representative of a deeply branching, uncultivated lineage. **The ISME journal**, v. 10, n. 4, p. 833, 2016.

HOLDEN, James F.; ADAMS, Michael WW. Microbe–metal interactions in marine hydrothermal environments. **Current opinion in chemical biology**, v. 7, n. 2, p. 160-165, 2003.

HOWE, John A. et al. Recent deep-water sedimentation, trace metal and radioisotope geochemistry across the Southern Ocean and Northern Weddell Sea, Antarctica. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 54, n. 16-17, p. 1652-1681, 2007.

HÜGLER, Michael; SIEVERT, Stefan M. Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. **Annual review of marine science**, v. 3, p. 261-289, 2011.

HUSON, Daniel H. et al. MEGAN community edition-interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. **PLoS computational biology**, v. 12, n. 6, p. e1004957, 2016.

IINO, Takao et al. Candidatus Methanogranum caenicola: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of Methanomassiliicoccaceae fam. nov. and Methanomassiliicoccales ord. nov., for a methanogenic lineage of the class Thermoplasmata. **Microbes and environments**, p. ME12189, 2013.

JANNASCH, Holger W.; MOTTTL, Michael J. Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. **Science**, v. 229, n. 4715, p. 717-725, 1985.

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

KAN, Jinjun et al. Archaea in yellowstone lake. **The ISME journal**, v. 5, n. 11, p. 1784, 2011.

KASTER, Anne-Kristin et al. Single cell genomic study of Dehalococcoidetes species from deep-sea sediments of the Peruvian Margin. **The ISME journal**, v. 8, n. 9, p. 1831, 2014.

KAWAGUCCI, Shinsuke et al. Geochemical origin of hydrothermal fluid methane in sediment-associated fields and its relevance to the geographical distribution of whole hydrothermal circulation. **Chemical Geology**, v. 339, p. 213-225, 2013.

KILIAS, Stephanos P. et al. New insights into hydrothermal vent processes in the unique shallow-submarine arc-volcano, Kolumbo (Santorini), Greece. **Scientific reports**, v. 3, p. 2421, 2013.

KING, Gary M.; WEBER, Carolyn F. Distribution, diversity and ecology of aerobic CO-oxidizing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 107, 2007.

KLINKHAMMER G. P.; CHIN C. S.; KELLER R. A.; DAHLMANN A.; SAHLING H.; SARTHOUS G.; PETERSEN S.; SMITH F.; WILSON C. Discovery of new hydrothermal vent sites in Bransfield Strait, Antarctica. **Earth Planet. Sci. Lett.** 193, 395–407, 2001.

KONHAUSER, Kurt O. **Introduction to geomicrobiology**. John Wiley & Sons, 2009.

KÖNNEKE, Martin et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature**, v. 437, n. 7058, p. 543, 2005.

KOSCHINSKY, Andrea et al. Hydrothermal venting at pressure-temperature conditions above the critical point of seawater, 5 S on the Mid-Atlantic Ridge. **Geology**, v. 36, n. 8, p. 615-618, 2008.

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

KRISTALL, Brian et al. Growth history of a diffusely venting sulfide structure from the Juan de Fuca Ridge: A petrological and geochemical study. **Geochemistry, Geophysics, Geosystems**, v. 7, n. 7, 2006.

LAM, Phyllis; COWEN, James P.; JONES, Ronald D. Autotrophic ammonia oxidation in a deep-sea hydrothermal plume. **FEMS microbiology ecology**, v. 47, n. 2, p. 191-206, 2004.

LANZÉN, Anders et al. Exploring the composition and diversity of microbial communities at the Jan Mayen hydrothermal vent field using RNA and DNA. **FEMS microbiology ecology**, v. 77, n. 3, p. 577-589, 2011.

LEARMAN, Deric R. et al. Biogeochemical and microbial variation across 5500 km of Antarctic surface sediment implicates organic matter as a driver of benthic community structure. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 284, 2016.

LEMOS, L. N. et al. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 1, p. 42–51, 2011.

LEVER, Mark A.; TESKE, Andreas P. Diversity of methane-cycling archaea in hydrothermal sediment investigated by general and group-specific PCR primers. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 81, n. 4, p. 1426-1441, 2015.

LIAO, Li et al. Microbial diversity in deep-sea sediment from the cobalt-rich crust deposit region in the Pacific Ocean. **FEMS microbiology ecology**, v. 78, n. 3, p. 565-585, 2011.

MARSH, Leigh et al. In hot and cold water: differential life-history traits are key to success in contrasting thermal deep-sea environments. **Journal of Animal Ecology**, v. 84, n. 4, p. 898-913, 2015.

MASZENAN, A. M. et al. *Defluvicoccus vanus* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-negative coccus/coccobacillus in the 'Alphaproteobacteria' from activated sludge.

International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 55, n. 5, p. 2105-2111, 2005.

MEYER, Birte; KUEVER, Jan. Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate reductase-encoding genes (aprBA) among sulfur-oxidizing prokaryotes. **Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 3478-3498, 2007.

MEYER, Julie L. et al. Microbiological characterization of post-eruption "snowblower" vents at Axial Seamount, Juan de Fuca Ridge. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 153, 2013.

MIDDELBURG, Jack J. Chemoautotrophy in the ocean. **Geophysical Research Letters**, v. 38, n. 24, 2011.

MILLARD, Andrew D.; PEARCE, David; ZWIRGLMAIER, Katrin. Biogeography of bacteriophages at four hydrothermal vent sites in the Antarctic based on g23 sequence diversity. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 7, p. fnw043, 2016.

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

NAKAGAWA, Satoshi; TAKAI, Ken. Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance. **FEMS microbiology ecology**, v. 65, n. 1, p. 1-14, 2008.

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

NIEMANN, Helge et al. Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 854, 2006.

NUNOURA, Takuro et al. Archaeal diversity and distribution along thermal and geochemical gradients in hydrothermal sediments at the Yonaguni Knoll IV hydrothermal

field in the Southern Okinawa Trough. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 4, p. 1198-1211, 2010.

OKSANEN, Jari et al. Vegan: community ecology package. R package version 1.17-4. <http://cran.r-project.org>. **Acesso em**, v. 23, p. 2010, 2010.

ORCUTT, Beth N. et al. Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 75, n. 2, p. 361-422, 2011.

ORTIZ-ALVAREZ, Rudiger; CASAMAYOR, Emilio O. High occurrence of Pacearchaeota and Woesearchaeota (A rchaea superphylum DPANN) in the surface waters of oligotrophic high-altitude lakes. **Environmental microbiology reports**, v. 8, n. 2, p. 210-217, 2016.

OULAS, Anastasis et al. Metagenomic investigation of the geologically unique Hellenic Volcanic Arc reveals a distinctive ecosystem with unexpected physiology. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 4, p. 1122-1136, 2016.

PACHIADAKI, Maria G. et al. Diversity and spatial distribution of prokaryotic communities along a sediment vertical profile of a deep-sea mud volcano. **Microbial ecology**, v. 62, n. 3, p. 655-668, 2011.

PARADA, Alma E.; NEEDHAM, David M.; FUHRMAN, Jed A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1403-1414, 2016.

PAULSON, Joseph N. et al. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. **Nature methods**, v. 10, n. 12, p. 1200, 2013.

PETERSEN, S.; HERZIG, P. M.; SCHWARZ-SCHAMPERA, U.; HANNINGTON, M. D.; JONASSON, I. R. Hydrothermal precipitates associated with bimodal volcanism in the Central Bransfield Strait, Antarctica. **Mineralium Deposita**, 39(3), 358-379, 2004

PRIETO, María José et al. Structure and geodynamic evolution of the Central Bransfield Basin (NW Antarctica) from seismic reflection data. **Marine Geology**, v. 149, n. 1-4, p. 17-38, 1998.

PROBST, Alexander J.; BANFIELD, Jillian F. Homologous recombination and transposon propagation shape the population structure of an organism from the deep subsurface with minimal metabolism. **Genome biology and evolution**, v. 10, n. 4, p. 1115-1119, 2018.

PROBST, Alexander J. et al. Biology of a widespread uncultivated archaeon that contributes to carbon fixation in the subsurface. **Nature communications**, v. 5, p. 5497, 2014.

RAGON, Marie et al. Microbial diversity in the deep-subsurface hydrothermal aquifer feeding the giant gypsum crystal-bearing Naica Mine, Mexico. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 37, 2013.

RAVEN, John A. Contributions of anoxygenic and oxygenic phototrophy and chemolithotrophy to carbon and oxygen fluxes in aquatic environments. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 56, n. 2-3, p. 177-192, 2009.

REINTHALER, Thomas; VAN AKEN, Hendrik M.; HERNDL, Gerhard J. Major contribution of autotrophy to microbial carbon cycling in the deep North Atlantic's interior. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 57, n. 16, p. 1572-1580, 2010.

REVEILLAUD, Julie et al. Subseafloor microbial communities in hydrogen-rich vent fluids from hydrothermal systems along the Mid-Cayman Rise. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 6, p. 1970-1987, 2016.

REYSENBACH, Anna-Louise; SHOCK, Everett. Merging genomes with geochemistry in hydrothermal ecosystems. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1077-1082, 2002.

RINKE, Christian et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, v. 499, n. 7459, p. 431, 2013.

ROBERTSON, Charles E. et al. Diversity and stratification of archaea in a hypersaline microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 75, n. 7, p. 1801-1810, 2009.

ROGERS, Alex D. et al. The discovery of new deep-sea hydrothermal vent communities in the Southern Ocean and implications for biogeography. **PLoS biology**, v. 10, n. 1, p. e1001234, 2012.

ROUSSEL, Erwan G. et al. Comparison of microbial communities associated with three Atlantic ultramafic hydrothermal systems. **FEMS microbiology ecology**, v. 77, n. 3, p. 647-665, 2011.

RUFF, S. Emil et al. Global dispersion and local diversification of the methane seep microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 13, p. 4015-4020, 2015.

SAHLING, Heiko et al. The physicochemical habitat of *Sclerolium* sp. at Hook Ridge hydrothermal vent, Bransfield Strait, Antarctica. **Limnology and Oceanography**, v. 50, n. 2, p. 598-606, 2005.

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

SCANLAN, David J. et al. Ecological genomics of marine picocyanobacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 73, n. 2, p. 249-299, 2009.

SCHLOSSER, P.; SUESS, E.; BAYER, R.; RHEIN, M. ^3He in the Bransfield Strait waters: indication for local injection from back-arc rifting. **Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers**, 35(12), 1919-1935, 1988

SEWELL, Holly L.; KASTER, Anne-Kristin; SPORMANN, Alfred M. Homoacetogenesis in deep-sea chloroflexi, as inferred by single-cell genomics, provides a link to reductive dehalogenation in terrestrial Dehalococcoidetes. **MBio**, v. 8, n. 6, p. e02022-17, 2017.

SHEIK, Cody S. et al. Spatially resolved sampling reveals dynamic microbial communities in rising hydrothermal plumes across a back-arc basin. **The ISME journal**, v. 9, n. 6, p. 1434, 2015.

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

SIEVERT, Stefan M. et al. Sulfur oxidation at deep-sea hydrothermal vents. In: **Microbial Sulfur Metabolism**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p. 238-258.

SPANG, Anja et al. Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. **Nature**, v. 521, n. 7551, p. 173, 2015.

STEIN, Lisa Y. Heterotrophic nitrification and nitrifier denitrification. In: **Nitrification**. American Society of Microbiology, 2011. p. 95-114.

STORESUND, Julia Endresen et al. Diversity patterns and isolation of Planctomycetes associated with metalliferous deposits from hydrothermal vent fields along the Valu Fa Ridge (SW Pacific). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 6, p. 841-858, 2018.

SUESS, E.; FISK, M.; KADKO, D. Thermal interaction between back-arc volcanism and basin sediments in the Bransfield Strait, Antarctica. **Ant. J. US**, 22, 46-49, 1987

SUZUKI, Yohey et al. Microbial diversity in inactive chimney structures from deep-sea hydrothermal systems. **Microbial Ecology**, v. 47, n. 2, p. 186-196, 2004.

SWAN, Brandon K. et al. Potential for chemolithoautotrophy among ubiquitous bacteria lineages in the dark ocean. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1296-1300, 2011.

TAKAMI, Hideto et al. A deeply branching thermophilic bacterium with an ancient acetyl-CoA pathway dominates a subsurface ecosystem. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e30559, 2012.

TESKE, Andreas et al. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 4, p. 1994-2007, 2002.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 2, n. 1, p. 3, 2012.

TIVEY, Margaret Kingston. Generation of seafloor hydrothermal vent fluids and associated mineral deposits. **Oceanography**, v. 20, n. 1, p. 50-65, 2007.

URICH, Tim et al. Microbial community structure and functioning in marine sediments associated with diffuse hydrothermal venting assessed by integrated meta-omics. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 9, p. 2699-2710, 2014.

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

VISHNIVETSKAYA, Tatiana A. et al. Microbial communities involved in biological ammonium removal from coal combustion wastewaters. **Microbial ecology**, v. 66, n. 1, p. 49-59, 2013.

WANG, Hai-liang; SUN, Li. Comparative metagenomic analysis of the microbial communities in the surroundings of Iheya north and Iheya ridge hydrothermal fields reveals insights into the survival strategy of microorganisms in deep-sea environments. **Journal of Marine Systems**, v. 180, p. 102-111, 2018.

WANG, Yong et al. Draft genome of an Aerophobetes bacterium reveals a facultative lifestyle in deep-sea anaerobic sediments. **Science bulletin**, v. 61, n. 15, p. 1176-1186, 2016.

WASMUND, Kenneth et al. Genome sequencing of a single cell of the widely distributed marine subsurface Dehalococcoidia, phylum Chloroflexi. **The ISME journal**, v. 8, n. 2, p. 383, 2014.

WHITICAR, M. J.; SUESS, E.; WEHNER, H. Thermogenic hydrocarbons in surface sediments of the Bransfield Strait, Antarctic Peninsula. **Nature**, v. 314, n. 6006, p. 87, 1985.

WU, Martin et al. Life in hot carbon monoxide: the complete genome sequence of Carboxydothemus hydrogenoformans Z-2901. **PLoS genetics**, v. 1, n. 5, p. e65, 2005.

XIE, Wei et al. Comparative metagenomics of microbial communities inhabiting deep-sea hydrothermal vent chimneys with contrasting chemistries. **The ISME journal**, v. 5, n. 3, p. 414, 2011.

XU, Meixiang et al. Construction and preliminary analysis of a metagenomic library from a deep-sea sediment of east Pacific Nodule Province. **FEMS microbiology ecology**, v. 62, n. 3, p. 233-241, 2007.

YAMAMOTO, Masahiro; TAKAI, Ken. Sulfur metabolisms in epsilon-and gamma-Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 192, 2011.

ZAITSEVA, Svetlana V. et al. Distribution of Acetothermia-dominated microbial communities in alkaline hot springs of Baikal Rift Zone. **PeerJ Preprints**, v. 5, p. e3492v1, 2017.

ZARZYCKI, Jan et al. Identifying the missing steps of the autotrophic 3-hydroxypropionate CO₂ fixation cycle in *Chloroflexus aurantiacus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 50, p. 21317-21322, 2009.

ZHANG, Jiajie et al. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. **Bioinformatics**, v. 30, n. 5, p. 614-620, 2013.

ZHANG, Jian et al. Microbial diversity in the deep-sea sediments of Iheya North and Iheya Ridge, Okinawa Trough. **Microbiological research**, v. 177, p. 43-52, 2015.

ZHANG, L.; KANG, M.; XU, J.; XU, J.; SHUAI, Y.; ZHOU, X.; MA, K. Bacterial and archaeal communities in the deep-sea sediments of inactive hydrothermal vents in the Southwest India Ridge. **Scientific reports**, 6, 2016

ANEXOS

ANEXO A – Lista de publicações, trabalhos apresentados em eventos científicos e colaborações

BENDIA, AMANDA G. ; SIGNORI, CAMILA N. ; **FRANCO, DIEGO C.** ; DUARTE, RUBENS T. D. ; BOHANNAN, BRENDAN J. M. ; PELLIZARI, VIVIAN H. . A Mosaic of Geothermal and Marine Features Shapes Microbial Community Structure on Deception Island Volcano, Antarctica. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 3389, 2018.

FRANCO, DIEGO C.; SIGNORI, CAMILA N. ; DUARTE, RUBENS T. D. ; NAKAYAMA, CRISTINA R. ; CAMPOS, LÚCIA S. ; PELLIZARI, VIVIAN H. . High Prevalence of Gammaproteobacteria in the Sediments of Admiralty Bay and North Bransfield Basin, Northwestern Antarctic Peninsula. *Frontiers in Microbiology (Online)*, v. 08, p. 153, 2017.

CHEQUE, LUCIANA ; PIRES, JOSE ; COELHO, CAROLINA ; SABADINI, ELISAMARA ; **CASTILLO, DIEGO** ; ALVES, ROGERIO ; ARAUJO, MIRIAN ; CRAPEZ, CARLOS . Response of mangrove propagules to the presence of oil and hydrocarbon degrading bacteria during an experimental oil spill. *Latin American Journal of Aquatic Research*, v. 45, p. 814-821, 2017.

MEJIAS CARPIO, ISIS E. ; **FRANCO, DIEGO CASTILLO** ; ZANOLI SATO, MARIA INÊS ; SAKATA, SOLANGE ; PELLIZARI, VIVIAN H. ; SECKLER FERREIRA FILHO, SIDNEY ; FRIGI RODRIGUES, DEBORA . Biostimulation of metal-resistant microbial consortium to remove zinc from contaminated environments. *Science of the Total Environment*, v. 550, p. 670-675, 2016.

MORAES, PAULA CARPINTERO DE ; **FRANCO, DIEGO CASTILLO** ; PELLIZARI, VIVIAN HELENA ; SUMIDA, PAULO YUKIO GOMES . Effect of plankton-derived organic matter on the microbial community of coastal marine sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 461, p. 257-266, 2014.

FRANCO, DIEGO C.; BENDIA, AMANDA G. ; SIGNORI, CAMILA N. ; SIEVERT, S. M. ; DULEBA, W. ; PELLIZARI, VIVIAN H. . Metagenomics reveals potential for dark carbon fixation at Hook Ridge, Bransfield Strait, Antarctica. In: 17th International Symposium on Microbial Ecology, 2018, Leipzig. ISME17 - Abstract Book, 2018.

BENDIA, A. G. ; SIGNORI, CAMILA N. ; **FRANCO, D. C.** ; Duarte, R.T.D. ; BOHANNAN, B. ; PELLIZARI, VIVIAN HELENA . Chronicles of Ice and Fire: Archaeal Communities from an Active Antarctic Volcano.. In: 29 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu. Anais do 29 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017.

PERES, F. V. ; **FRANCO, D. C.** ; SIGNORI, CAMILA N. ; SUMIDA, PAULO YUKIO GOMES ; NAKAYAMA, C. R. ; PELLIZARI, VIVIAN HELENA . Sunken organic and synthetic substrates in the deep

southwestern Atlantic harbor distinct bacterial communities. In: SAME15 ? 15th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, 2017, Zagreb. SAME15 ? 15th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, 2017.

FRANCO, D. C.; SIGNORI, CAMILA N. ; DULEBA, W. ; PELLIZARI, V. H. . Deep-sea sediment microbial communities at Hook Ridge hydrothermal vent in the Bransfield Strait, Northwestern Antarctic Peninsula. In: 6th International Symposium on Chemosynthesis-Based Ecosystems (CBE6), 2017, Woods Hole. CBE6-Abstract_book, 2017.

BENDIA, A. G. ; TORRES-BALLESTEROS, A. M. ; **FRANCO, D. C.** ; Duarte, R.T.D. ; PELLIZARI, VIVIAN HELENA . Hot microbes in Antarctica: geothermal activity drives taxonomic and functional diversity in Deception Island. In: 16th International Symposium on Microbial Ecology - ISME, 2016, Montreal. International Symposium on Microbial Ecology - ISME, 2016, 2016.

FRANCO, D. C.; Duarte, R.T.D. ; NAKAYAMA, C. R. ; CAMPOS, L. ; PELLIZARI, V. H. . Microbial diversity and community composition across depth gradient in marine sediments from Admiralty Bay, King George Island and Bransfield Strait, Antarctica. In: The 6 th Polar and Alpine Microbiology Conference, 2015, Ceske Budejovice. The 6 th Polar and Alpine Microbiology Conference Books of Abstracts, 2015.