

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana

Caracterização de *Archaea* cultivadas a partir de amostras de um aquário de água doce

Mélodi Maciel da Costa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Cynthia Maria Kyaw

Brasília, Abril de 2018

Dedico essa dissertação em memória de meus avós Claudemiro e Teresinha, pessoas humildes que sabiam o valor da educação.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Cynthia Kyaw, por ter me recebido tão bem em seu laboratório, e por toda paciência que teve comigo durante todo esse processo. Admiro sua postura como professora e pesquisadora e sou muito grata por todos os conselhos sinceros, esses que me fizeram uma profissional melhor.

Agradeço aos meus pais, Ribeiro e Lourdes, pelo apoio constante na minha vida pessoal e acadêmica. Obrigada pelos “puxões de orelha”, e por me direcionar para o melhor caminho.

Agradeço a minha tia, Mirian, que me incentivou durante toda a minha formação acadêmica. Obrigada por acreditar em mim.

Agradeço a minha irmãzinha, Emili, por toda a companhia e carinho durante esses anos. O tempo que investi no mestrado só nos afastou fisicamente, mas sempre estaremos conectadas.

Agradeço a meu melhor amigo e noivo, Everton. Obrigada pelo apoio incondicional, pela paciência e por simplesmente me ouvir quando eu precisava.

Agradeço a todo pessoal do Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana e ao financiamento concedido a mim pela CAPES durante o período do mestrado, obrigada pela oportunidade.

Gostaria de agradecer a todos os membros do laboratório: Aline Belmok, Deborah Vasconcellos e Thiago Rodrigues. Eu agradeço a paciência e ajuda que me ofereceram tanto nos experimentos quanto nas reuniões. Obrigado por compartilharem o conhecimento de vocês comigo. De forma especial gostaria de agradecer a Aline Belmok, sempre muito gentil e prestativa as minhas dúvidas e anseios. Obrigada por tudo que me ensinou, desde procedimentos de bancada a análises de bioinformática e principalmente obrigada pela companhia.

Agradeço a todos do departamento de fitopatologia, obrigada pelos estudos em grupo. Em especial agradeço a Erica, pela amizade sincera e carinho.

Agradeço a Helena Ribeiro pelas culturas que disponibilizou para a realização desse trabalho.

Agradeço à Professora Sonia Bão, Ingrid e membros do laboratório de Microscopia da UnB, por toda a disponibilidade e ajuda na preparação de amostras para análises de microscopia.

Agradeço a minha grande amiga, Ana Fabrícia. Obrigada por me motivar a ingressar na Pós-graduação, e principalmente por valorizar meu lado artístico tão esquecido por mim mesma.

Agradeço a meu querido amigo, Maurício Rossato, que sempre me incentivou a fazer o mestrado e a confiar mais em mim mesma. Obrigada por me ajudar a estudar, e por me apresentar novos caminhos.

Agradeço ao meu querido amigo, Lucas, que sempre teve uma palavra amiga, você é um amigo em um milhão. Obrigada pelos alfajores sempre a mão.

Agradeço a minha amiga de escola Raquel, entramos no mesmo ano na UnB. Obrigada pela companhia no almoço, e por alegrar meu dia com seu bom humor.

Agradeço ao Dr Carlos Lopes e ao Dr Luciano Milhomens pela carta de recomendação, essa que me ajudou a ingressar na Pós-Graduação. Obrigada pelos conselhos, e pela confiança que depositaram em mim.

Agradeço a minha mestra de Taekwondo, Lucia Koboyashi, que sempre me orientou a buscar o equilíbrio e treinar os meus “pulinhos”. Obrigada por me ensinar essa arte marcial que amo, e que me ajudou a me concentrar nos trabalhos do mestrado.

Agradeço a Deus por essa experiência que me edificou como pessoa e como profissional. Obrigada pela sua constante presença na minha vida.

Lista de figuras e tabelas

Figura 1. Árvore filogenética universal, com os três Domínios da vida.	14
Figura 2. Árvore filogenética do Domínio <i>Archaea</i>	19
Figura 3. Ciclo do nitrogênio	22
Figura 4. Aspecto macroscópico dos tipos coloniais Kappa e Kappa C	35
Figura 5. Preparações coradas pelo método de Gram das colônias Kappa C, observadas ao microscópio óptico.....	35
Figura 6. Preparações coradas pelo método de Gram das colônias de Kappa C cultivadas em meios suplementados com NH ₄ Cl.....	36
Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura das amostras tipo colonial Kappa C....	37
Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura das amostras do tipo colonial Kappa C suplementado com NH ₄ Cl	37
Figura 9. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio dos produtos gerados na PCR utilizando os iniciadores relativos ao gene de rRNA 16S de <i>Archaea</i>	38
Figura 10. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio da extração de DNA plasmidial de clones aleatoriamente selecionados contendo o produto de PCR relativo ao gene de rRNA 16S de <i>Archaea</i>	40
Figura 11. Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene de rRNA 16S de <i>Archaea</i> detectadas no cultivo de Kappa C.	49
Figura 12. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio dos produtos gerados na PCR utilizando os iniciadores relativos ao gene de rRNA 16S de <i>Bacteria</i>	53
Figura 13. Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene de rRNA 16S de <i>Bacteria</i> detectada no cultivo	56
Tabela 1. Iniciadores específicos utilizados nas reações de PCR.....	30
Tabela 2. Condições utilizadas na PCR para a amplificação do gene de rRNA 16S e <i>amoA</i> de <i>Archaea</i>	30
Tabela 3. Condições utilizadas na PCR para a amplificação do gene de rRNA 16S de <i>Bacteria</i>	30
Tabela 4. Classificação taxonômica das sequências do gene de rRNA 16S de <i>Archaea</i> do tipo colonial Kappa C gerada pelo <i>Greengenes</i>	43

Tabela 5. Sequências do gene de rRNA 16S de isolados de <i>Archaea</i> utilizados na construção da árvore filogenética.	47
Tabela 6. Sequências do gene de rRNA 16S de <i>Bacteria</i> utilizados na construção da árvore filogenética.	55

Lista de abreviaturas

AmoA – gene codificador da subunidade alfa da enzima amônia monoxigenase

AOA – Archaeas oxidantes de amônia

AOB – Bactérias oxidantes de amônia

BSA – Albumina sérica bovina

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Desoxinucleotídeos 5'-trifosfato

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

g – Força gravitacional

h – Hora

IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kb – Kilobases

LSPN – *The List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*

M – Molar

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

min – Minutos

μ g – Micrograma

μ L – Microlitro

mL – Mililitro

μ M – Micromolar

mM – Milimolar

Mpb – Milhões de pares de base

NCBI – *US National Center of Biotechnology Information*

η g – Nanograma

OTU – Unidade taxonômica operacional

pb – Pares de bases

PCR – Reação de polimerização em cadeia

pH – Potencial hidrogeniônico

RDP – *Ribosomal Database Project*

RNase – Ribonuclease

rpm – rotações por minuto

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

SDS – Sódio dodecil sulfato

Tris – Tri (hidroximetil) aminometano

U – Unidade enzimática

V – Volume

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D galactopiranosídeo

°C – Graus Celsius

Sumário

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 Introdução.....	13
1.1 O Domínio <i>Archaea</i>	13
1.2 Filogenia de <i>Archaea</i>	15
1.3 Ubiquidade de <i>Archaea</i>	19
1.4 O filo <i>Thaumarchaeota</i> e as archaeas oxidantes de amônia.....	20
1.5 Importância do cultivo de microrganismos.....	23
2 Objetivos.....	26
2.1 Objetivos Gerais.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 Material e Métodos.....	27
3.1 Coleta das amostras.....	27
3.2 Confeção dos meios de cultura.....	27
3.3 Microscopia óptica das colônias Kappa C.....	27
3.3.1 Exame a fresco.....	27
3.3.2 Exame empregando a Coloração de Gram.....	28
3.3.3 Visualização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	28
3.4 Extração de DNA total das células.....	28
3.5 Ensaio de PCR.....	29
3.6 Purificação dos produtos de PCR e ligação dos fragmentos no vetor pGEM-T Easy.....	31
3.7 Preparação de células competentes <i>Escherichia coli</i> DH5α.....	31
3.8 Transformação por choque térmico.....	31
3.9 Seleção e estocagem dos clones recombinantes.....	32
3.10 Extração de DNA plasmidial por lise alcalina.....	32
3.11 Sequenciamento de DNA e análises de bioinformática.....	33

4	Resultados e Discussão	34
4.1	Cultivo de archaeas em meios artificiais	34
4.2	Caracterização morfológica do tipo colonial Kappa C	34
4.3	Análises Microscópicas das células presentes no tipo colonial Kappa C	35
4.3.1	Microscopia Óptica.....	35
4.3.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	36
4.4	Análises de filogenia molecular.....	38
4.4.1	Ensaio de PCR dirigidos ao gene de rRNA 16S de <i>Archaea</i>	38
4.4.2	Transformação células de <i>Escherichia coli</i> DH5 α e seleção de clones recombinantes.....	39
4.4.3	Extração de DNA plasmidial dos clones recombinantes.....	39
4.4.4	Análises de bioinformática	40
4.4.5	Análise filogenética do gene de rRNA 16S de <i>Archaea</i>	41
4.4.6	Análise filogenética empregando o gene <i>amoA</i>	46
4.5	Árvores filogenéticas	47
4.5.1	Árvore filogenética do rRNA 16S de <i>Archaea</i>	47
4.6	Análises de filogenia molecular de <i>Bacteria</i>	52
4.6.1	Ensaio de PCR dirigidos para o gene de rRNA 16S de <i>Bacteria</i>	52
4.6.2	Transformação células de <i>Escherichia coli</i> DH5 α e seleção de clones recombinantes.....	53
4.6.3	Extração de DNA plasmidial dos clones recombinantes.....	53
4.6.4	Análises de bioinformática	54
4.6.5	Análises filogenéticas do gene de RNA 16S de <i>Bacteria</i>	54
4.6.6	Árvore filogenética do gene de rRNA 16S de <i>Bacteria</i>	55
5	Conclusões	58
6	Perspectivas futuras	58
7	Referências Bibliográficas	59

Resumo

Em 1990, Woese e colaboradores classificaram os seres vivos em três domínios distintos: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*. Inicialmente, as archaeas foram relacionadas apenas a ambientes extremos como fontes termais, ambientes salinos, ácidos e anaeróbios. Posteriormente, com avanço das técnicas moleculares, foram detectadas archaeas em diversos ambientes não extremos como solos, sedimentos e ambientes aquáticos, revelando a ubiquidade desse domínio. No entanto, o cultivo laboratorial de archaeas não extremas ainda é pouco expressivo e muitos aspectos de sua biologia permanecem desconhecidos. Trabalhos prévios de nosso grupo resultaram na obtenção de culturas mistas de archaeas e bactérias, a partir de amostras de um aquário residencial de água doce. Diferentes tipos coloniais foram obtidos e, no presente trabalho, a cultura denominada Kappa C foi caracterizada. A manutenção dessa cultura foi realizada em meios confeccionados empregando-se a água do aquário acrescida de antibióticos e antifúngicos, com o objetivo de tornar o meio seletivo para archaeas. Paralelamente, foi adicionado cloreto de amônio em alguns meios de cultura, visando o enriquecimento de archaeas oxidantes amônia (AOA). Os microrganismos presentes no tipo colonial Kappa C foram caracterizados quanto à morfologia celular por diferentes técnicas de microscopia, revelando pequenas células cocóides e bacilos. As células presentes no cultivo foram submetidas à extração de DNA total para a realização de ensaios de PCR com os iniciadores específicos para o gene codificador de rRNA 16S de *Archaea*, *Bacteria*, assim como para o gene *amoA* de *Archaea*. Os resultados revelaram a presença de diversas sequências classificadas como archaeas metanogênicas, do filo *Euryarchaeota*. Foram também obtidas sequências classificadas como pertencentes aos grupos I.1b de *Thaumarchaeota*, capazes de oxidar amônia, e grupo I.1c, que ainda não possui representantes cultivados. Também foram identificadas sequências classificadas nos filios *Bathyarchaeota* e *Parvarchaeota*, que também não apresentam representantes cultivados até o momento. Apesar do uso de antibióticos de amplo espectro, as análises revelaram a presença de sequências de bactérias do gênero *Pandoraea*. Dessa forma foi revelado que o tipo colonial Kappa C consiste em uma co-cultura de diferentes archaeas e, pelo menos um gênero de bactéria.

Abstract

In 1990, Woese and contributors classified the organisms in three distinct domains: *Bacteria*, *Archaea* and *Eukarya*. Initially, archaeas were associated to extreme environments, like hot springs, saline, acid and anaerobic sites. With the advances in molecular approaches, archaeas were detected in several environments like soils, sediments, aquatic environments, revealing the ubiquity of this domain. On the other hand, the cultivation of non-extreme archaeas is still incipient and many aspects of their biology remain unknown. Previous works of our group resulted in the cultivation of mixed cultures of bacteria and archaea from a freshwater residential aquarium samples. Different colonial types were described, and in the present work the colonial type named Kappa C was further characterized. This culture was inoculated in culture media composed of the water of the aquarium added with antibiotics and antifungal agents in order to make the medium selective for archaeas. Some culture media were also added with ammonium chloride in order to enrich for ammonia oxidizing archaeas (AOAs). The morphology of Kappa C colonial type cells were characterized by different techniques of microscopy, revealing small coccoid and rod shaped cells. The cells present in the culture were submitted to total DNA extraction and PCR essays using specific primers directed to the rRNA 16S gene of *Archaea* and *Bacteria*, as well as the archaeal *amoA* gene. The results, revealed the presence of sequences of methanogenic archaeas, of the *Euryarchaeota* phylum. Sequences classified as belonging to groups I.1b of *Thaumarchaeota* were obtained, which are ammonia oxidizers, and I.1c group, which do not yet has cultured representatives. Sequences from the phyla *Bathyarchaeota* and *Parvarchaeota* were also identified, which also do not present cultivated representatives until now. Despite the use of broad spectra antibiotics, our analyses revealed the presence of bacterial sequences of the *Pandoraea* genus, revealing that the Kappa C colonial type consists of a co-culture of different archaeas and at least one genus of bacteria.

1 Introdução

1.1 O Domínio *Archaea*

Woese e Fox, em 1977, propuseram a divisão dos procariotos em dois grupos a partir de análises baseadas em comparações das sequências de RNA ribossomal 16S de diferentes organismos. O primeiro grupo foi denominado Eubactérias, composto pelas bactérias largamente conhecidas e o segundo foi nomeado Archaeobactérias, até então representadas pelas bactérias metanogênicas (Woese e Fox, 1977).

Os organismos metanogênicos são anaeróbicos e seu metabolismo envolve a redução de dióxido de carbono a metano. Supõe-se que esse fenótipo seria adequado às condições primitivas do planeta há três bilhões de anos, em que a atmosfera era composta basicamente por uma mistura de gases ricos em dióxido de carbono e hidrogênio (Oparin, 1938). Dessa forma, o nome “archaeobactéria” foi escolhido por conotar antiguidade, já que esses organismos aparentavam ser bem adaptados às condições primitivas do planeta, sugerindo que as archaeobactérias seriam ancestrais das bactérias (Woese e Fox, 1977).

Estudos posteriores identificaram novos fenótipos de archaeobactérias habitando ambientes altamente especializados (Woese *et al.*, 1978). Dessa forma, foram incluídas também como parte do grupo das archaeobactérias, as halófilas extremas, oxidantes de enxofre, termoacidófilas e hipertermófilas (Magrum *et al.*, 1978).

Em 1990, Woese e colaboradores propuseram um novo sistema de classificação, com acréscimo de uma unidade taxonômica superior a Reino, chamada Domínio. Dessa forma, a vida seria dividida em três grandes Domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*. Com a nova classificação, todos os organismos com organização celular eucariótica pertenceriam ao domínio *Eukarya*, as antes denominadas archaeobactérias foram renomeadas como *Archaea*, e as bactérias fariam parte do domínio *Bacteria*, com os três domínios descendendo de um único ancestral comum, como ilustrado na Figura 1.

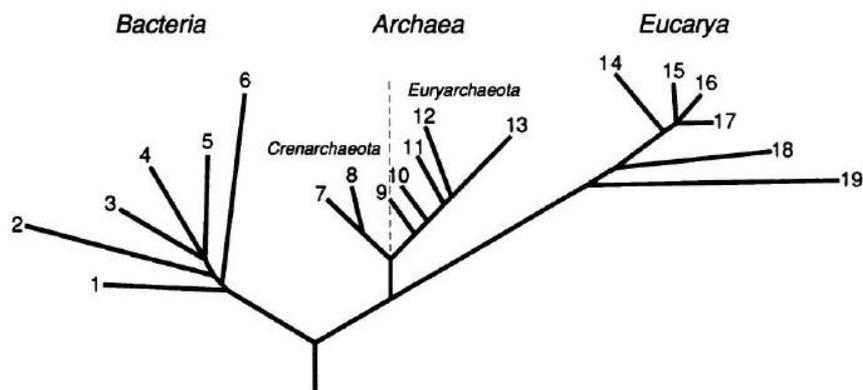


Figura 1. Árvore filogenética universal, com os três Domínios da vida. Os números dos ramos correspondem aos organismos, *Bacteria*: 1- Thermotogales, 2- Flavobactérias e organismos relacionados, 3- Cianobactérias, 4- Bactérias púrpuras, 5- Bactérias Gram-positivas, 6- Bactérias verdes e não sulfurosas, *Archaea*: Filo *Crenarchaeota*: 7- *Pyrodictium*, 8- *Thermoproteus*, Filo *Euryarchaeota*: 9- Thermococcales, 10- Methanococcales, 11- Methanobacteriales, 12- Methanomicrobiales, 13- Halófilos extremos, *Eucarya*: 14- Animais, 15- Ciliados, 16- Plantas verdes, 17- Fungos, 18- Flagelados, 19- Microsporídeos (Adaptado de Woese *et al.*, 1990).

As archaeas ora se assemelham com as bactérias, ora com os eucariotos, além de também possuírem características próprias, inexistentes nos outros domínios (Madigan *et al.*, 2010). Um exemplo de característica única das archaeas consiste nos lipídeos que compõem a membrana plasmática, compostos por cadeias laterais de hidrocarbonetos ramificados do tipo isopreno, que se ligam a moléculas de glicerol-1-fosfato por meio de ligações do tipo éter (Kates *et al.*, 1993). Além disso, essas membranas podem, especialmente em archaeas hipertermófilas, se organizar como monocamadas (Albers e Meyer, 2011).

A parede celular das archaeas também se diferencia da de bactérias, uma vez que em archaeas não foi detectada a presença de peptideoglicano, molécula assinatura de bactérias. Até o momento foram descritas variadas composições de parede celular em archaeas, tais como pseudo-peptídeglicano, heteropolissacarídeos, metacondroitina, halomucina dentre outras. Assim como em bactérias, a presença de uma camada superficial protéica cristalina, conhecida como camada S, é bastante comum em diversas espécies de archaeas (Albers e Meyer, 2011).

Como citado anteriormente, as archaeas partilham características tanto do domínio *Bacteria* quanto do domínio *Eukarya*. O cromossomo de *Archaea* assim como o de muitos membros de *Bacteria* é circular, e a replicação de ambos ocorre de forma bidirecional (Barry e Bell, 2006). Apesar disso, a maquinaria responsável por esse

processo apresenta-se como uma versão simplificada daquela de eucariotos (Ishino e Ishino, 2012). Assim como os eucariotos, as archaeas podem apresentar múltiplas origens de replicação (Barry e Bell, 2006).

No que diz respeito à tradução, bactérias e archaeas utilizam sequências Shine-Dalgarno para sinalizar a iniciação da tradução, um padrão inexistente em eucariotos. No entanto, archaeas e eucariotos inserem a metionina como primeiro aminoácido no processo de tradução, enquanto que as bactérias inserem a N-formilmietionina (Dennis, 1997).

O empacotamento de DNA das bactérias depende do superenovelamento realizado pela DNA girase. Já os eucariotos enovelam seu DNA em volta de proteínas chamadas histonas (Alberts *et al.*, 2004). Algumas archaeas possuem tanto o mecanismo da DNA girase para empacotar seu DNA quanto o de proteínas análogas a histonas (Bernander, 2000).

1.2 Filogenia de *Archaea*

No mesmo artigo que foi proposto o domínio *Archaea*, também foi feita a divisão desse grupo em dois filios distintos: *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*. O filo *Euryarchaeota* engloba indivíduos fenotipicamente heterogêneos, compreendendo organismos metanogênicos, halófilos, redutores de sulfato e alguns tipos de termófilos, enquanto o filo *Crenarchaeota* é composto principalmente por archaeas termófilas, mas também possui um grupo de organismos mesófilos classificados como grupo I de crenarchaeota (Woese *et al.*, 1990; DeLong, 1992).

No entanto, a subdivisão do domínio *Archaea* em apenas dois filios sofreu alterações com o avanço das técnicas independentes de cultivo, a partir da descrição de novas sequências do gene que codifica o rRNA 16S de diferentes amostras ambientais. Por meio de tal abordagem, novos filios vêm sendo propostos, muitos deles sem possuir representantes cultivados (Nunoura *et al.*, 2011; Kozubal *et al.*, 2012; Rinke *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2014; Castelle *et al.*, 2015).

O filo *Korarchaeota* foi proposto a partir de análises de sequências do gene de rRNA 16S, obtidas a partir de amostras de sedimento da *Obsidian Pool*, no Parque Nacional de Yellowstone, nos Estados Unidos. As análises revelaram que algumas sequências de DNA eram classificadas como pertencentes ao domínio *Archaea*, mas não se afiliavam aos filios *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota*, ramificando-se em uma

posição mais basal na árvore filogenética, anterior à separação desses dois filios (Barns *et al.*, 1996). Apesar de ainda não existir qualquer representante desse filo em cultura pura, o genoma completo de um organismo denominado “*Candidatus* Korarchaeum cryptofilum”, já foi sequenciado a partir de uma cultura de enriquecimento inoculada com sedimentos da *Obsidian pool* (Elkins *et al.*, 2008). Até o momento, membros desse filo foram encontrados apenas em ambientes com altas temperaturas como fontes termais terrestres (Auchtung *et al.*, 2006; Elkins *et al.*, 2008), fendas hidrotermais marinhas (Marteinsson *et al.*, 2001), lagoas hidrotermais (Rogers e Amend, 2005), sedimento (Teske *et al.*, 2002), podendo ser encontrados em ambientes que variam de 55 °C a 128 °C (Reigstad *et al.*, 2010).

O filo *Nanoarchaeota* (Huber *et al.*, 2002) foi proposto a partir do cultivo de um organismo hipertermófilo esférico, de apenas 400 nm de diâmetro, denominado *Nanoarchaeum equitans*. Essa nova archaea possui um genoma pequeno com apenas 0,5 Mb de tamanho, limitando sua capacidade para sintetizar muitos componentes celulares como lipídeos, aminoácidos e nucleotídeos (Waters *et al.*, 2003). Isolada a partir de fendas hidrotermais marinhas na Islândia, encontrava-se sempre associada à crenarchaeota *Ignicoccus hospitalis*, não apresentando crescimento em sua ausência. Em 2013, o genoma parcial de um novo membro desse filo, denominado *Nanobsidianus stetteri*, foi sequenciado a partir de amostras da *Obsidian Pool*. Essa nova espécie foi encontrada parasitando outra archaea do filo *Crenarchaeota*, da ordem *Sulfolobales*, não cultivada (Podar *et al.*, 2013).

Representantes do filo *Nanoarchaeota* são encontrados em diversos ambientes como fontes termais terrestres (Hohn *et al.*, 2002; Casanueva *et al.*, 2008), ambientes mesófilos hipersalinos (Casanueva *et al.*, 2008) e até em zonas fóticas da água de fendas hidrotermais (Clingenpeel *et al.*, 2013), sugerindo que esse filo abriga um largo espectro de temperaturas e ambientes geoquímicos (Munson-McGeet *et al.*, 2015).

Posteriormente, análises comparativas de proteínas ribossomais de organismos previamente classificados como membros do grupo I de crenarchaeotas mesófilas, sugeriram que tais archaeas deveriam formar um filo distinto, denominado *Thaumarchaeota* (Brochier-Armanet *et al.*, 2008). Esse filo é composto por archaeas predominantemente mesófilas e que desempenham papel no ciclo do nitrogênio, devido ao fato de alguns membros realizarem oxidação aeróbia de amônia.

A partir de um estudo de metagenômica de amostras coletadas em uma mina de ouro no Japão foi obtido o genoma completo de uma nova archaea, denominada

Candidatus Caldiarchaeum subterraneum. Foi detectado no genoma desse organismo um sistema de degradação protéica do tipo ubiquitina, semelhante ao encontrado em eucariotos. Devido a essa característica peculiar, tal organismo foi considerado como pertencente a um novo filo, denominado *Aigarchaeota* (Nunoura *et al.*, 2011). No entanto, essa proposta foi questionada, devido à presença de características de *Thaumarchaeota* no genoma de *C. subterraneum*, e por seu posicionamento próximo a *Thaumarchaeota* em análises comparativas de proteínas ribossomais (Brochier-Armanet *et al.*, 2011).

Embora alguns autores considerem *Aigarchaeota* pertencente ao filo *Thaumarchaeota*, outros propõem que seja um filo a parte, inclusive como membro de um superfilo chamado TACK. Esse novo táxon foi sugerido por Guy e Ettema (2011) e, de acordo com essa proposta, os integrantes do superfilo TACK que compreende os filios *Thaumarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Crenarchaeota* e *Korarchaeota*, compartilham características em comum com o domínio *Eukarya*, tais como a presença de ortólogos de genes de proteínas ribossomais e genes codificadores de proteínas envolvidas na etapa de alongação da transcrição.

Outros estudos realizados no Parque Nacional de Yellowstone, analisaram sequências do gene de rRNA 16S de comunidades microbianas de regiões com óxidos férricos, identificando archaeas ainda não descritas. Essas sequências não exibiam similaridade com qualquer grupo conhecido de *Archaea*, e assim, foram classificadas como um novo filo chamado *Geoarchaeota* (Kozubal *et al.*, 2012).

Em 2013, um extenso trabalho de sequenciamento genômico foi realizado a partir de células únicas (*single-cell genomics*) de archaeas e bactérias obtidas de diversos ambientes (Rinke *et al.*, 2013). A partir dessas análises foram propostos quatro novos filios de *Archaea*: *Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota* e *Nanohaloarchaeota*. Integrantes desses filios compartilhavam características únicas como células com tamanho e genoma diminutos, de 0,5 a 1,2 Mpb e, por essa razão, foi sugerido que os mesmos deveriam compor um superfilo monofilético denominado DPANN, juntamente com o filo *Nanoarchaeota* anteriormente descrito.

Em 2014, o superfilo TACK receberia mais um membro, o filo *Bathyarchaeota* (Meng *et al.*, 2014). Esse filo foi proposto por meio de análises filogenéticas de sequências do gene de rRNA 16S e de proteínas ribossomais obtidas em estuários e mangues na China. Por meio dessas análises, esse grupo foi considerado uma linhagem irmã de *Thaumarchaeota* e *Aigarchaeota* apresentando ramificação profunda na árvore

filogenética. Anteriormente esse filo era classificado como *Miscellaneous Crenarchaeotic Group*, devido ao seu posicionamento instável em árvores construídas a partir do gene de rRNA 16S (Pester *et al.*, 2011). Membros desse grupo possuem ampla distribuição em ambientes terrestres e principalmente em ambientes marinhos (Kubo *et al.*, 2012).

Em 2015, dois novos grupos foram incluídos no superfilo DPANN: O filo *Woesearchaeota* e o filo *Pacearchaeota*. Esses filios foram propostos a partir do sequenciamento de DNA obtidos de sedimentos e dos lençóis freáticos de um aquífero nos Estados Unidos. As análises das sequências desses organismos sugerem genomas de tamanho compatível com os integrantes do superfilo DPANN (Castelle *et al.*, 2015).

Em 2017, amostras de sedimentos aquáticos de diversos ambientes foram analisadas, revelando a existência de várias linhagens de archaeas não cultivadas que afiliaram-se de forma robusta com eucariotos, além de possuírem um repertório de genes que codificam proteínas assinatura de eucariotos. Essas linhagens que compõem os filios *Lokiarchaeota* (Spang *et al.*, 2015), *Thorarchaeota*, *Odinarchaeota* e *Heimdallarchaeota* foram classificados como um novo superfilo denominado Asgard (Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017).

Assim, a estrutura da árvore filogenética de *Archaea* sofreu e vem ainda sofrendo grandes mudanças desde a sua proposta inicial em 1990 (Woese *et al.*, 1990). Devido à descrição frequente de novas sequências de DNA em bancos de dados, vários filios foram propostos e acrescentados à árvore, como ilustrado abaixo (Figura 2).

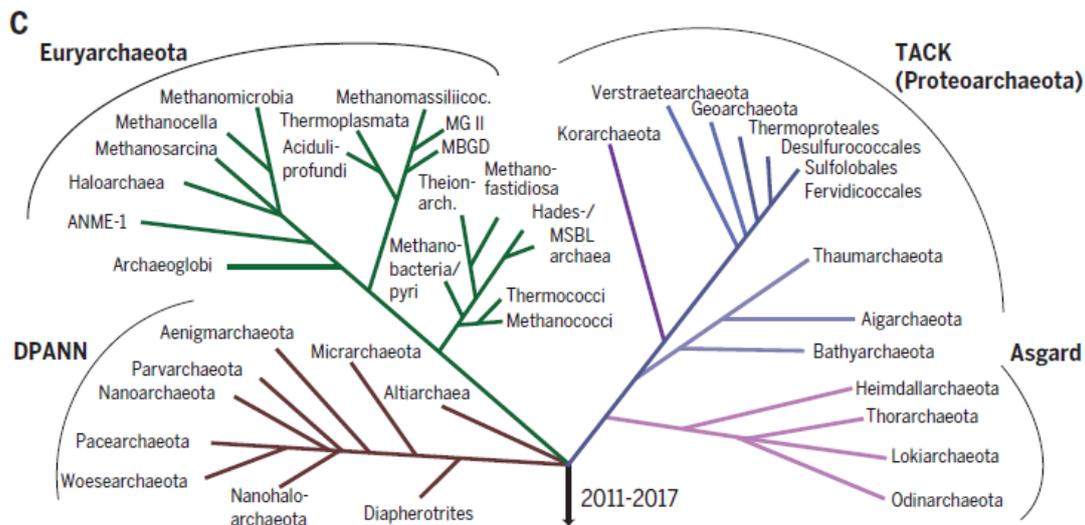


Figura 2. Árvore filogenética do Domínio *Archaea* (Spang *et al.*, 2017).

Apesar da grande quantidade de filis propostos nos últimos anos, de acordo com o site *The List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature- LPSN* (<http://www.bacterio.net/-classifphyta.html>—acessado em 09/02/2018), apenas cinco filis são aceitos: *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota*, *Nanoarchaeota* e *Thaumarchaeota*, sendo os únicos filis de *Archaea* que possuem representantes cultivados.

1.3 Ubiquidade de *Archaea*

Por um longo período acreditou-se que as archaeas eram restritas a ambientes inóspitos devido ao fato de os primeiros trabalhos terem sido realizados em ambientes extremos como fontes termais (Brock *et al.*, 1972), minas ácidas de carvão (Darland *et al.*, 1970), ambientes com altas temperaturas, extremos de pH ou salinidade e ausência de oxigênio (Balch *et al.*, 1979; Fiala e Stetter, 1986; Mathrani *et al.*, 1988). No entanto, o uso de abordagens moleculares para o estudo de comunidades microbianas contribuiu para a detecção de archaeas em ambientes não extremos. Assim, em 1992 foi identificada a presença de membros do filo *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota* em águas marinhas (DeLong, 1992). Posteriormente, DeLong e colaboradores (1994), a partir da detecção de archaeas em águas costeiras da Antártida confirmaram a ubiquidade desse domínio.

Nos anos seguintes, diversos trabalhos relataram a presença de archaeas em diferentes ambientes como solos (Ochsenreiter *et al.*, 2003; Timonen e Bomberg, 2009;

Bates *et al.*, 2011), sedimento (Beman e Francis, 2006; Pester *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2014), plantas (Chelius e Triplett, 2001; Simon *et al.*, 2005) lagoas de água doce (Vissers *et al.*, 2009; Auguet *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2014), ecossistemas marinhos (Könneke *et al.*, 2005; Wuchter *et al.*, 2006; Teske e Sorensen, 2008), aquários residenciais (Urakawa *et al.*, 2008; Sauder *et al.*, 2011) ambientes poluídos (Damashek *et al.*, 2015), estações de tratamento de esgoto (Gray *et al.*, 2002) e até em diversas parte do corpo humano como a vagina (Belay *et al.*, 1990) e o trato intestinal (Hoffmann *et al.*, 2013). Por essa razão, considera-se que a distribuição do domínio *Archaea* seja equivalente àquela do domínio *Bacteria*.

1.4 O filo *Thaumarchaeota* e as archaeas oxidantes de amônia

As primeiras sequências de DNA de archaeas de ambientes não extremos foram detectadas a partir de análises de plâncton marinho. Essas archaeas foram classificadas em três grupos: Grupo I, composto por crenarchaeotas mesófilas e os grupos II e III com membros do filo *Euryarchaeota* (DeLong, 1992; DeLong, 1998).

A partir do sequenciamento do genoma de *Cenarchaeum symbiosum*, uma archaea marinha encontrada em tecidos de uma esponja (Preston *et al.*, 1996) e também por meio de análises comparativas de proteínas ribossomais, as sequências classificadas como Grupo I se agrupariam, formando um novo filo denominado *Thaumarchaeota* (Brochier-Armanet *et al.*, 2008).

O primeiro isolado cultivado desse grupo foi um organismo oxidante de amônia nomeado *Nitrosopumilus maritimus*, isolado a partir de um aquário marinho (Könneke *et al.*, 2005). Essa descoberta levou a novas pesquisas de enriquecimento de culturas e estudos moleculares, evidenciando a ubiquidade desses organismos nos ambientes marinhos (Hatzenpichler *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2010; Blainey *et al.*, 2011). Além de isolados marinhos, esse filo é distribuído entre os principais ambientes mesófilos como água doce (Auguet *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2014), aquário (Urakawa *et al.*, 2008; Sauder *et al.*, 2011; Bartelme *et al.*, 2017), solo (Tourna *et al.*, 2011; Lehtovirta-Morley *et al.*, 2011; Stempfhuber *et al.*, 2014;), sedimento (Beman e Francis, 2006; Pester *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2014) e até sistemas termais (Weidler *et al.*, 2007; De La torre *et al.*, 2008; Bohorquez *et al.*, 2012) sendo então composto por organismos mesófilos e termófilos.

O filo *Thaumarchaeota* foi dividido em três grupos, I.1a, I.1b e I.1c, de acordo com o posicionamento das sequências do gene de rRNA 16S nas árvores filogenéticas (DeLong *et al.*, 1998). O grupo I.1a compreende organismos isolados predominantemente de ambientes marinhos, tais como *Nitrosopumilus maritimus*, mas também de solo, como *Nitrososphaera devanaterre* (Lehtorvita-Morley *et al.*, 2011). *Nitrososphaera viennensis* e *Candidatus Nitrososphaera gargensis* (Hatzenpichler *et al.*, 2008; Tourna *et al.*, 2011), organismos presentes em diferentes tipos de solos, pertencem ao grupo I.1b, que é composto principalmente por organismos de tais habitats (Bintrim *et al.*, 1997), enquanto organismos classificados no grupo I.1c são comumente encontrados em solos ácidos, no entanto ainda não apresentam nenhum representante cultivado (Jurgens *et al.*, 1997).

Todos os representantes cultivados do grupo I.1a e I.1b são oxidantes de amônia, enquanto o grupo I.1c aparentemente não está relacionado com esse tipo de metabolismo. Além disso, pouco se sabe sobre a fisiologia dos organismos desse grupo (Weber *et al.*, 2015).

O filo *Thaumarchaeota* compreende todas as archaeas oxidantes de amônia descritas até o momento. Dessa forma, sua importância ecológica vem sendo crescentemente reconhecida (Pester *et al.*, 2011). Os estudos com membros desse filo evidenciaram a importância de alguns representantes nos ciclos biogeoquímicos, principalmente no ciclo do nitrogênio, tanto em ambientes aquáticos quanto em ambientes terrestres (Sauder *et al.*, 2011; Hatzenpichler, 2012).

O nitrogênio, um importante macronutriente, está presente em abundância na atmosfera como gás nitrogênio (N_2). No entanto, a maioria dos seres vivos não consegue fixá-lo sob essa forma. Apenas determinadas espécies de microrganismos conseguem transformar o nitrogênio presente na atmosfera em compostos nitrogenados assimiláveis. Essa assimilação chama-se fixação, que consiste na primeira etapa do ciclo do nitrogênio, onde o N_2 presente na atmosfera é convertido em amônia (NH_3). A segunda etapa é a nitrificação, dividida em duas partes: na primeira, a amônia (NH_3) é oxidada a nitrito (NO_2^-) por organismos oxidantes de amônia. Na segunda etapa; o nitrito (NO_2^-) é oxidado a nitrato (NO_3^-) por organismos oxidantes de nitrito. Na terceira etapa chamada desnitrificação, o nitrato é novamente convertido a N_2 , como ilustrado na Figura 3. Também existe uma etapa paralela no ciclo denominada anamox, onde a amônia (NH_3) é oxidada diretamente a N_2 (Nelson e Cox, 2011).

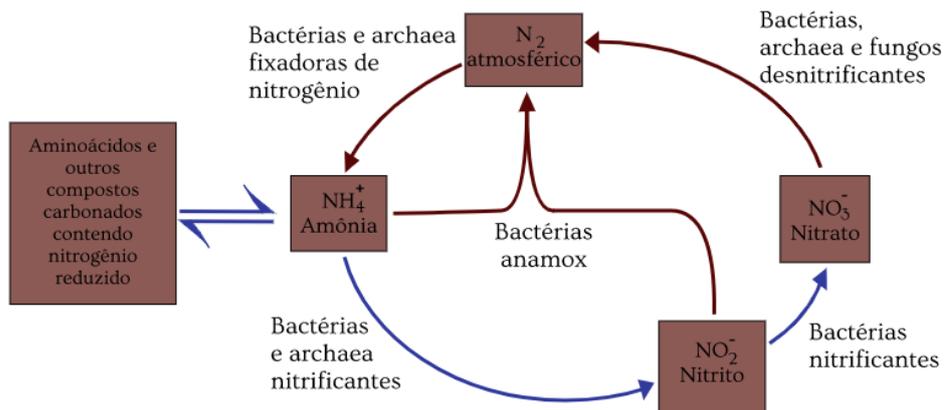


Figura 3. Ciclo do nitrogênio (Adaptado de Nelson e Cox, 2011).

Anteriormente, acreditava-se que apenas bactérias (também descritas como AOB) eram capazes de oxidar amônia. No entanto, após o isolamento e sequenciamento do genoma de *Nitrosopumilus maritimus*, verificou-se que as archaeas também eram capazes de realizar tal atividade (Könneke *et al.*, 2005). Além disso, algumas archaeas também participam de outras etapas do ciclo como a fixação de nitrogênio atmosférico (Leigh, 2000) e processos de desnitrificação (Offre *et al.*, 2013), revelando a importância ecológica desses microrganismos na natureza. Desde então vários estudos identificaram archaeas oxidantes de amônia (AOA) em diversos ambientes, como solos (Ying *et al.*, 2010; Tourna *et al.*, 2011; Stempfhuber *et al.*, 2014), águas marinhas (Könneke *et al.*, 2005; Wuchter *et al.*, 2006), ambientes de água doce (Vissers *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2013), aquários (Urakawa *et al.*, 2008; Sauder *et al.*, 2011; Bartelme *et al.*, 2017) e até fontes termais (Weidler *et al.*, 2007; Hatzenpichler *et al.*, 2008).

Além disso, trabalhos recentes relataram a predominância de AOAs em relação a AOBs em alguns ambientes, como solos (Nicol *et al.*, 2008) e ambientes aquáticos (Hong *et al.*, 2013), evidenciando que as AOAs possuem um importante papel no ciclo do nitrogênio.

As técnicas independentes de cultivo são amplamente utilizadas em estudos que abordam a distribuição e abundância de AOAs em diferentes ambientes. O gene *amoA* codifica a subunidade alfa da enzima amônia monooxigenase, responsável pela oxidação de amônia a nitrito. Esse gene é amplamente utilizado como marcador filogenético nesses estudos (Pester *et al.*, 2012). Apesar de várias pesquisas estarem sendo feitas nessa área, existem poucos representantes cultivados de AOAs em meios artificiais para estudos mais detalhados. Até o momento apenas três espécies de AOAs foram obtidas

em culturas puras, sendo a maioria das linhagens descritas mantidas na forma de co-cultivo de archaeas e bactérias (Könneke *et al.*, 2005; De la Torre *et al.*, 2008; Hatzenpichler *et al.*, 2008; Tourna *et al.*, 2011; Lehtovirta-Morley *et al.*, 2014).

1.5 Importância do cultivo de microrganismos

O conhecimento sobre a diversidade microbiana é limitado, visto que somente uma pequena fração dos microrganismos é rotineiramente cultivada em meios artificiais (Ward *et al.*, 1992; Amann *et al.*, 1995). A discrepância entre o número de microrganismos visualizados ao microscópio e o número de microrganismos cultivados em meios artificiais é chamado de “grande anomalia da contagem em placa” (Staley e Konopka, 1985). Esse termo é utilizado para descrever a grande diferença que existe entre a diversidade microbiana de amostras naturais observadas ao microscópio, comparada com o que se consegue cultivar em laboratório.

O estudo dos microrganismos permaneceu por um longo tempo limitado, já que a única forma de análise era por meio do cultivo em meios artificiais. Posteriormente, técnicas independentes de cultivo começaram a ser utilizadas em pesquisas de comunidades microbianas, possibilitando o acesso a microrganismos sem a necessidade do cultivo. A partir disso, inúmeras pesquisas ambientais foram realizadas, revelando uma diversidade muito grande de organismos na natureza (Rinke *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2014; Castelle *et al.*, 2015; Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017).

Apesar dos grandes avanços obtidos no conhecimento sobre a ecologia e filogenética microbiana, a obtenção de culturas microbianas em meios artificiais ainda é essencial para o entendimento mais profundo de características importantes dos microrganismos tais como, nutrição, bioquímica, entre outras. No entanto, existem muitos problemas a serem superados, de forma que o estabelecimento de culturas laboratoriais ainda ocorre de forma extremamente lenta (Alain e Querellou, 2009; Leigh *et al.*, 2011).

Grande parte dos isolados de archaeas obtidos com sucesso em meios artificiais, pertencem a espécies extremófilas, encontradas em condições ambientais inóspitas como fendas hidrotermais, lagoas hipersalinas ou fontes sulfurosas (DeLong, 2003). Poucos seres vivos conseguem sobreviver nessas condições, o que reduz a quantidade de organismos que poderiam ser contaminantes no cultivo.

Porém, o cultivo de archaeas de ambientes não extremos ainda é um desafio. Um dos motivos é a enorme carência de informações a respeito desses organismos, que ainda hoje possuem pouquíssimos relatos na literatura (Könneke *et al.*, 2005; Simon *et al.*, 2005; Tourna *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012; Lehtorvita-Morley *et al.*, 2014). Outro motivo é a alta complexidade microbiana em ambientes não extremos, o que dificulta a obtenção de uma cultura pura, muitas vezes sendo obtidos co-cultivos entre archaeas e bactérias (De la Torre *et al.*, 2008; Hatzenpichler *et al.*, 2008; Lebedeva *et al.*, 2013). Dessa forma, técnicas para eliminar a população bacteriana estão sendo utilizadas, tais como a aplicação de antimicrobianos com alvos moleculares específicos para o domínio *Bacteria* (Park *et al.*, 2010; Blainey *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2011).

Existem algumas abordagens que são utilizadas para cultivo de organismos coletados de amostras naturais. Uma delas consiste no preparo de meios de cultura que mimetizem o ambiente da amostra original (Kaeberlein *et al.*, 2002; Connon e Giovannoni, 2002; Könneke *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2010). As câmaras de difusão são um exemplo desse tipo de abordagem para cultivo de organismos aquáticos. Esse dispositivo consiste na montagem de dois anéis metálicos um sobre o outro, que contem membranas em seu interior com poros que permitem a troca de nutrientes, mas não a passagem de microrganismos. O inóculo é inserido entre as membranas desse sistema sendo posteriormente introduzido em um aquário com sedimento e água do mesmo local da amostra (Kaeberlein *et al.*, 2002). Outra abordagem para cultivo de microrganismos de ambientes aquáticos consiste em filtrar a água do ambiente em que a amostra foi retirada e utilizá-la como meio de cultivo (Könneke *et al.*, 2005).

Na natureza muitos microrganismos terrestres e aquáticos vivem na presença de pequenas concentrações de nutrientes e, por essa razão, sua transferência para meios laboratoriais ricos em nutrientes pode causar um impacto metabólico, inibindo seu crescimento (Watve *et al.*, 2000). Nesse sentido, foi revelada a importância de se conservar as condições naturais do ambiente de onde a amostra foi retirada para se estabelecer um cultivo laboratorial de sucesso.

A dissertação de mestrado de Ribeiro (2015), desenvolvida no laboratório de *Archaea* da UnB, descreveu a obtenção de co-cultivos de archaeas e bactérias a partir de amostras de um aquário residencial de água doce. Os diferentes tipos coloniais foram denominados com letras gregas, sendo que o tipo colonial Kappa possuía variantes macroscópicas que não foram caracterizadas quanto à morfologia ou filogenia

molecular. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização dos organismos presentes no tipo colonial Kappa C.

2 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

- Caracterizar os organismos que compõem o tipo colonial Kappa C, obtido a partir de uma amostra de aquário residencial de água doce.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a morfologia dos tipos celulares presentes na colônia Kappa C, por diferentes técnicas de microscopia;
- Caracterizar filogeneticamente os organismos presentes nas colônias por meio de PCR específicas para o gene que codifica o rRNA 16S de *Archaea* e *Bacteria*;
- Analisar a presença de archaeas oxidantes de amônia na colônia, por meio de ensaios de PCR dirigidos ao gene *amoA*;

3 Material e Métodos

3.1 Coleta das amostras

A coleta das amostras foi realizada por Ribeiro (2015), a partir de um aquário residencial de água doce de aproximadamente 20 anos. A amostra coletada consistiu em uma mistura composta pela água circulante, sedimento próximo às plantas, fragmentos de membrana de pré-filtração e esferas porosas com 1 cm de diâmetro. Todos esses elementos foram acondicionados em um frasco plástico imediatamente enviado para laboratório e mantido sob refrigeração, até a inoculação em meios de cultura.

3.2 Confeção dos meios de cultura

O meio de cultura sólido foi preparado adicionando-se ágar à água do aquário, para a concentração final de 1,5% e pH 7,2 sendo o meio então autoclavado. Os agentes antimicrobianos estreptomicina (50 µg/mL), ampicilina (150 µg/mL), clorafenicol (20 µg/mL) e itraconazol (0,25 µg/mL) foram adicionados ao meio visando torná-lo seletivo para archaeas. As colônias foram repicadas e mantidas em estufa a 28 °C para crescimento por períodos variáveis de tempo.

Paralelamente, o tipo colonial Kappa C foi repicado em um meio de cultura suplementado com cloreto de amônio (NH₄Cl) estéril, na concentração final de 2 mM, visando o enriquecimento de archaeas oxidantes de amônia (AOA). Foram utilizados os mesmos antibióticos citados anteriormente, sendo as culturas mantidas a 28 °C para crescimento.

3.3 Microscopia óptica das colônias Kappa C

3.3.1 Exame a fresco

Alíquotas do tipo colonial Kappa C foram coletadas com auxílio de uma alça de platina e depositadas em lâminas de microscopia contendo 10 µL de água destilada. Em seguida, foram analisadas a fresco por microscopia óptica, empregando-se o recurso de contraste de fase. Observou-se o tamanho, a morfologia e a motilidade das células.

3.3.2 Exame empregando a Coloração de Gram

Inicialmente, alíquotas das culturas do tipo colonial Kappa C e do tipo colonial Kappa C cultivado em meio suplementado com NH₄Cl foram coletadas do meio de cultura sólido com auxílio de uma alça de platina e depositadas em lâminas histológicas de vidro contendo PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂PO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM). Os esfregaços foram secos, fixados no fogo, sendo submetidos ao protocolo padrão de coloração de Gram. As lâminas foram analisadas e fotografadas em aumento de 1000X no microscópio de luz Axiolab (Zeiss, Alemanha) cedido gentilmente pela professora Marlene Teixeira de Souza.

3.3.3 Visualização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A preparação, assim como as análises das amostras do tipo colonial Kappa C e do tipo colonial Kappa C suplementado com NH₄Cl, foram realizadas no laboratório de microscopia da Universidade de Brasília, coordenado pela professora Sônia Nair Bão. Inicialmente as colônias foram coletadas e ressuspensas em tampão PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂PO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM), sendo fixadas com o fixador Karnovsky 0.1 M (paraformaldeído 2%, Glutaraldeído 2%, sacarose 1%, cloreto de cálcio 0,005 M em meio tamponado com cacodilato de sódio 0,1 M) durante 4 h à temperatura ambiente. O fixador foi removido das amostras por meio de duas lavagens com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e, em seguida, as amostras foram depositadas em lamínulas recobertas por poli-L-lisina (0,01%). Posteriormente foi realizada a pós-fixação com tetróxido de ósmio (1%) por 30 min. As amostras foram lavadas com água destilada, e desidratadas em acetona 50, 70, 90 e 100% respectivamente, permanecendo durante 5 min em cada concentração. O material foi seco ao ponto crítico de CO₂ pelo equipamento Balzers CPD 030 (*Balzers Union AG*) e, em seguida, foi feita a metalização com vapores de ouro no metalizador Balzers SCD050. As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-7001F (JEOL Ltd., Tóquio, Japão) a 15,0kV.

3.4 Extração de DNA total das células (Adaptado de Tourna *et al.*, 2010)

Alíquotas do tipo colonial Kappa C e do tipo colonial Kappa C suplementado com cloreto de amônio, foram transferidas para tubos tipo *ependorf* estéreis, contendo

472 µL de Tampão TE (Tris-HCl 25 mM, pH 8; EDTA 10 mM) e, em seguida, foram adicionados a cada tubo 3 µL de Proteinase K (20 mg/mL), 5 µL de RNase (10 mg/mL) e 15 µL de SDS 20%, sendo os sistemas incubados em estufa a 37 °C por 1 h. Após esse período adicionou-se 500 µL de clorofane (25 V fenol: 24 V clorofórmio: 1 V álcool iso-amílico) a cada tubo, os quais foram agitados por várias vezes e então centrifugados a 7000 g por 3 min. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, ao qual foram adicionados 500 µL de clorofil (24 V clorofórmio: 1 V álcool iso-amílico). Os tubos foram então agitados e centrifugados sob as mesmas condições, sendo a fase aquosa transferida para um novo tubo ao qual adicionou-se NaCl para a concentração final de 0,3 M e 2,5 V de Etanol 100%, a fim de promover a precipitação do DNA. Os tubos foram incubados a -20 °C por uma noite e então submetidos à centrifugação de 12000 g por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 500 µL de etanol 70%, sendo os tubos novamente centrifugados, sob as mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o sedimento seco à temperatura ambiente. O DNA foi então ressuspenso em volumes de 50 a 100 µL de água destilada.

A qualidade e concentração dos DNAs extraídos foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio.

3.5 Ensaios de PCR

O DNA total extraído das colônias do tipo colonial Kappa C e Kappa C suplementado com NH₄Cl foi submetido a ensaios de PCR empregando-se dois pares de iniciadores específicos para o domínio *Archaea*: 109F e 915R (Whitehead e Cotta, 1999) dirigidos ao gene de rRNA 16S e ArchamoaF e ArchamoaR para o gene da subunidade alfa da enzima amônia monoxigenase (*amoA*) (Francis *et al.*, 2005). Com o objetivo de verificar a presença de bactérias no tipo colonial Kappa C, também foram realizados experimentos de PCR com os iniciadores 27F e 1492R, específicos para o gene de rRNA 16S do Domínio *Bacteria* (Weisburg *et al.*, 1991). As seqüências dos iniciadores assim como o tamanho dos fragmentos de DNA esperados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores específicos utilizados nas reações de PCR.

Iniciadores	Sequência	Fragmento esperado
109f	5'-ACK GCT CAG TAA CAC GT-3'	825 pb
915r	5'-GTC CTC CCC CGC CAA TTCT-3'	
ArchamoAf	5'-STA ATG GTC TGG CTT AGA CG-3'	635 pb
ArchamoAr	5'-GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT-3'	
27f	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTG AG-3'	1465 pb
1492r	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	

S: guanina ou citosina; K: guanina ou timina.

Os sistemas de PCR foram confeccionados em um volume final de 30 μ L, contendo os reagentes nas seguintes concentrações finais: 1X de tampão de reação (Invitrogen), 1,5 mM de $MgCl_2$; 0,4 μ g de soro-albumina bovina (BSA); 0,5 μ M de cada iniciador; 0,2 mM de dNTPs e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Os ensaios de PCR foram realizados no termociclador *Applied Biosystem*[®] (2720 ThermalCycler) e as condições de ciclagem utilizadas estão descritas na Tabela 2 e 3.

Tabela 2. Condições utilizadas na PCR para a amplificação do gene de rRNA 16S e *amoA* de *Archaea*.

	109f /915r	ArchamoAf/ amoAr
1	Desnaturação a 94 °C/2 min	Desnaturação a 95 °C/5 min
2	Desnaturação a 94 °C/1 min	Desnaturação a 95 °C/45seg
3	Anelamento a 57 °C/1 min	Anelamento a 53 °C/1 min
4	Extensão a 72 °C/2 min	Extensão a 72 °C/1min
5	Repetição dos passos 2 a 4/29 vezes	Repetição dos passos 2 a 4/29 vezes
6	Extensão final a 72 °C/5 min	Extensão final a 72 °C/10 min
7	Manutenção da temperatura a 4 °C	Manutenção da temperatura a 4 °C

Tabela 3. Condições utilizadas na PCR para a amplificação do gene de rRNA 16S de *Bacteria*.

	27f/ 1492r
1	Desnaturação a 94 °C/5 min
2	Desnaturação a 94 °C/1 min
3	Anelamento a 55 °C/1 min
4	Extensão a 72 °C/2 min
5	Repetição dos passos 2 a 4 por 29 vezes
6	Extensão final a 72 °C/10 min
7	Manutenção a 4 °C

A eficiência da amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. O tamanho dos fragmentos gerados foi avaliado com auxílio do marcador de massa molecular *1kb Plus DNA ladder* (Invitrogen).

3.6 Purificação dos produtos de PCR e ligação dos fragmentos no vetor pGEM-T Easy

Os produtos amplificados foram purificados utilizando-se o Kit *GeneJET PCR Purification* (Thermoscientific), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente os fragmentos foram ligados ao vetor pGEM-T Easy® (Promega) na proporção de 3:1 de inserto-vetor, de acordo com as instruções do fabricante. Os sistemas de ligação foram mantidos por 1 h à temperatura ambiente, sendo armazenados a 4 °C até o momento da transformação de células de *Escherichia coli* DH5α.

3.7 Preparação de células competentes *Escherichia coli* DH5α (Adaptado de Maranhão, 2016)

As células de *E. coli* DH5α foram inoculadas em 5 mL de meio Luria Bertani (5 g extrato de levedura, 10g NaCl, 10 g peptona de caseína, 1,5% de ágar para 1 litro de meio) e incubadas a 37 °C por uma noite. Em seguida, 300 µL da cultura foram inoculados em 30 mL de meio LB, incubados sob agitação de 200 rpm a 37 °C até a cultura atingir densidade óptica (OD₆₀₀) entre 0,2 e 0,3. Após esse procedimento, as células foram centrifugadas a 1800 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 15 mL de solução de cloreto de cálcio 100 mM gelado e as células foram mantidas no gelo por 30 min. Após esse período, as células foram centrifugadas a 1000 g por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado, e adicionou-se 1 mL de cloreto de cálcio 100 mM gelado. As células foram ressuspensionadas e novamente mantidas no gelo por 30 min.

3.8 Transformação por choque térmico (Adaptado de Maranhão, 2016)

Alíquotas de 100 µL das células competentes de *E. coli* foram transferidas para tubos de hemólise já contendo 5 µL dos sistemas de ligação, sendo incubadas em gelo por 30 min e posteriormente submetidas ao choque térmico em banho 37 °C por 5 min. Após o choque térmico, foi adicionado 1 mL de meio LB a cada tubo, sendo todos os sistemas incubados por 1 h em estufa a 37 °C. Posteriormente, quantidades variáveis de cada sistema (50 a 200 µL) foram semeadas em placas com meio LB sólido suplementado com ampicilina (150 µg/mL), Xgal (0,00625%) e IPTG (0,25 mM), com

auxílio de pérolas de vidro. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C de 16 a 24 h, até a observação de colônias brancas ou azuis.

3.9 Seleção e estocagem dos clones recombinantes

Colônias brancas foram coletadas com o auxílio de palitos de madeira estéreis e inoculadas em 5 mL de meio LB líquido suplementado com ampicilina (150 µg/mL), sendo então incubadas em estufa a 37 °C por uma noite. Alíquotas de cada colônia branca foram estocadas em tubos tipo *Eppendorf* contendo glicerol a concentração final de 35% sendo mantidas a -20 °C.

3.10 Extração de DNA plasmidial por lise alcalina (Adaptado de Maranhão e Moraes, 2016)

Cerca de 2 mL de cada cultura recombinante foram transferidos para tubos tipo *epppendorf* e centrifugados a 12000 g por 2 min. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspenso em 100 µL de solução I (glicose 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM) e mantido por 5 min à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de solução II (SDS 1%; NaOH, 2 M) a cada tubo, sendo os sistemas homogeneizados delicadamente e incubados por 5 min em gelo. Em seguida adicionou-se 150 µL de solução III (acetato de potássio 3 M, ácido acético glacial 2 M, pH 4,8) a cada tubo, seguido de homogeneização e incubação por 5 min em gelo. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 12000 g por 5 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos, e foram adicionados 5 µL de RNase A (10 mg/mL) a cada tubo, incubando-se a 37 °C durante 1 h em estufa. Após a incubação, um volume de clorofane foi adicionado a cada tubo, homogeneizado-se os tubos. Estes foram então centrifugados a 7000 g por 3 min a 4 °C. A fase aquosa do sobrenadante foi transferida para outro tubo *epppendorf* e um volume igual de clorofil foi adicionado. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 7000 g por 3 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram então transferidos para outro tubo e foi adicionado NaCl para a concentração final de 0,3 M. Posteriormente, adicionou-se 2,5 volumes de etanol 100% gelado, homogeneizando bastante. Os tubos foram estocados a -20 °C por 24 h e após esse período foram centrifugados a 12000 g por 25 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e 500 µL de etanol 70% gelado foram adicionados às amostras. Os tubos

foram novamente centrifugados nas mesmas condições anteriores. Ao final do processo, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados invertidos para secagem do sedimento à temperatura ambiente. Os sedimentos foram ressuspensos com 50 µL de água destilada e estocados a -20 °C.

A qualidade e concentração dos diferentes DNAs plasmidiais foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, usando-se como referência o marcador de massa molecular *High DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

3.11 Sequenciamento de DNA e análises de bioinformática

Foram selecionados 58 clones recombinantes do tipo colonial Kappa C, que tiveram o DNA sequenciado pela empresa Macrogen, empregando-se o iniciador 109F (Whitehead e Cotta, 1999). Também foram enviados outros 38 clones do mesmo tipo colonial, empregando-se o iniciador 27F (Weisburg *et al.*, 1991). As sequências de DNA que apresentavam PHRED com qualidade superior a 20 em mais de 250 nucleotídeos foram utilizadas nas análises posteriores de bioinformática.

As sequências de qualidade foram então comparadas com sequências de DNA depositadas no banco de dados do NCBI (*US National Center of Biotechnology Information*), através da ferramenta BLAST, a fim de se confirmar que as mesmas consistiam em fragmentos do gene de rRNA 16S de *Archaea* ou *Bacteria*. Em seguida, as sequências foram submetidas a alinhamentos múltiplos, empregando-se o programa ClustalX (Larkin *et al.*, 2007) e editadas manualmente, com o auxílio do programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Finalmente, as sequências foram classificadas com base no banco de dados taxonômico do *Greengenes* (DeSantis *et al.*, 2006), utilizando-se o programa Mothur (Schloss *et al.*, 2009).

Utilizando as sequências do gene de rRNA 16S das amostras Kappa C foi construída uma árvore filogenética. As sequências representativas em nível de espécie (3% de dissimilaridade) obtidas pelo programa Mothur foram comparadas com sequências do banco de dados do NCBI por meio da ferramenta BLAST, sendo aquelas com alto grau de identidade incluídas na árvore. A árvore foi confeccionada empregando-se o programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011), pelo método de *Neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987), com teste de *bootstrap* de 1000 repetições (Felsenstein, 1985).

4 Resultados e Discussão

Embora um tipo colonial denominado Kappa tenha sido inicialmente detectado por Ribeiro (2015), o mesmo apresentou variantes morfológicas que não foram posteriormente caracterizadas, seja quanto à morfologia ou filogenia molecular baseada no gene codificador do rRNA 16S. Por essa razão, nesse trabalho foi realizada uma análise mais detalhada do tipo colonial denominado Kappa C.

4.1 Cultivo de archaeas em meios artificiais

A metodologia para o cultivo do tipo colonial Kappa C foi baseada no uso de um meio de cultura cuja composição procurava mimetizar as condições nutricionais similares às aquelas encontradas no ambiente de onde a amostra se encontrava originalmente, abordagem utilizada com sucesso no cultivo de archaeas nitrificantes (Könneke *et al.*, 2005). Neste trabalho, os meios de cultura foram preparados a partir da água do aquário filtrada e/ou autoclavada. Agentes antimicrobianos foram adicionados de forma contínua para evitar ou minimizar a proliferação de células bacterianas e contaminação por fungos no meio de cultura.

4.2 Caracterização morfológica do tipo colonial Kappa C

Enquanto o tipo colonial Kappa inicialmente descrito por Ribeiro (2015) consiste em colônias arredondadas, transparentes, com aspecto aquoso ou mucoide, os variantes Kappa C apresentavam-se como pequenas colônias redondas opacas, esbranquiçadas, de bordos lisos, com aspecto brilhante (Figura 4A e B).

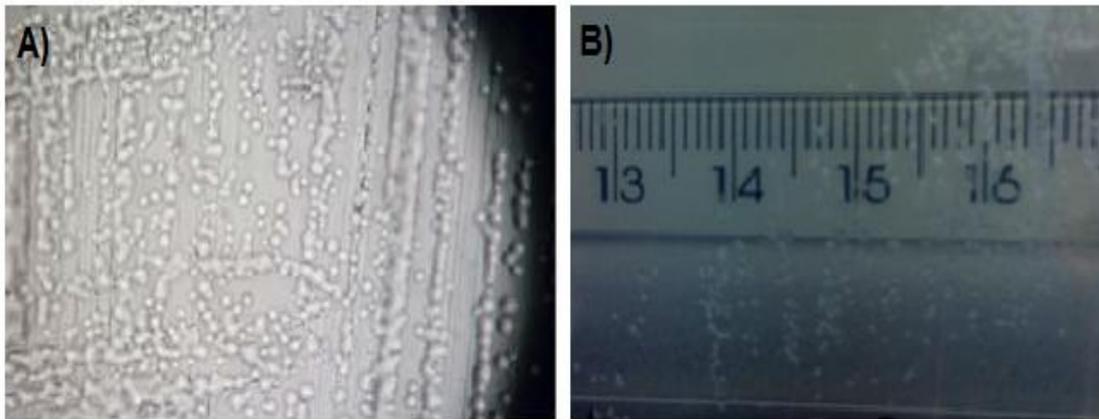


Figura 4. Aspecto macroscópico dos tipos coloniais Kappa (A) e Kappa C (B). A imagem A foi obtida em microscópio óptico comum, com aumento de 400X (Adaptado de Ribeiro, 2015).

4.3 Análises Microscópicas das células presentes no tipo colonial Kappa C

4.3.1 Microscopia Óptica

As análises a fresco, por microscopia de contraste de fase revelaram diminutas células cocóides móveis e imóveis, além de formas bacilares imóveis (Figura 5). A amostra Kappa C corada pelo método de Gram revelou a presença de cocos e bacilos Gram negativos. As células cocóides eram de difícil visualização, apresentando diâmetro próximo a 1 μm . Em alguns campos foram observados cocos isolados ou em pequenas cadeias e bacilos de tamanhos variados (Figura 5A). Em alguns campos as células cocóides pareciam estar aderidas aos bacilos (Figura 5B).

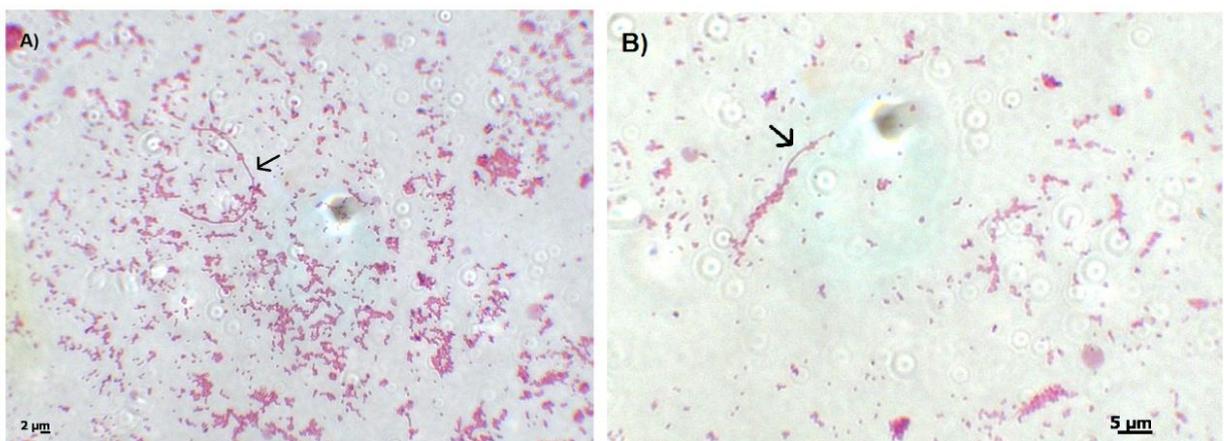


Figura 5. Preparações coradas pelo método de Gram das colônias Kappa C, observadas ao microscópio óptico com aumento de 1000X. **A.** Células cocóides e um grande bacilo. **B.** Cocos aderidos a um bacilo (seta).

Quando inoculadas em meios suplementados com NH_4Cl , as células do tipo colonial Kappa C também coravam-se como Gram negativas, apresentando igualmente morfologias cocóides e bacilares, de difícil visualização. Em alguns campos analisados havia a prevalência de células isoladas (Figura 6A), enquanto em outros foram observados aglomerados de células formando arranjos lineares (Figura 6B).

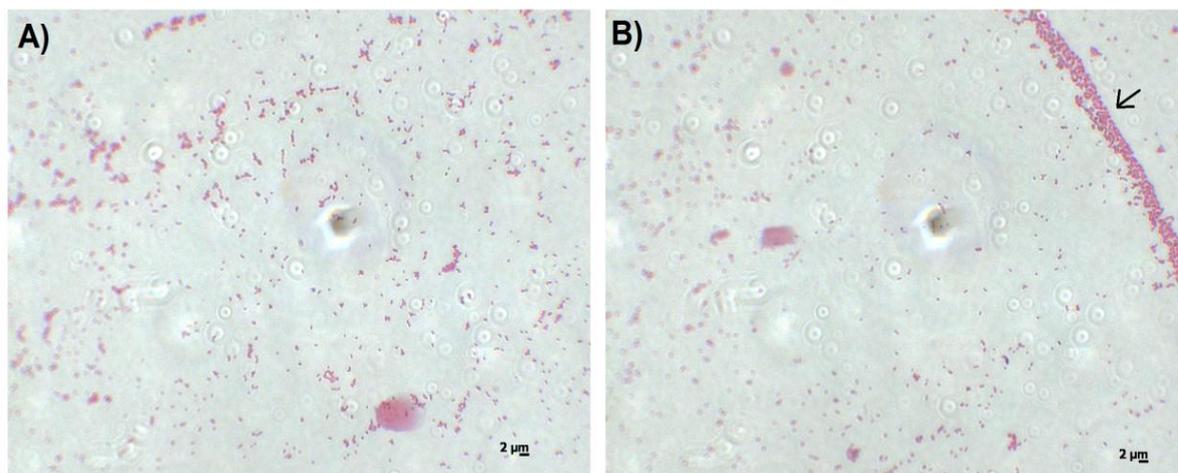


Figura 6. Preparações coradas pelo método de Gram das colônias de Kappa C cultivadas em meios suplementados com NH_4Cl , observadas ao microscópio óptico com aumento de 1000X. **A.** Células cocóides isoladas. **B.** Células cocóides formando arranjos lineares (seta).

Embora a coloração de Gram seja amplamente utilizada na caracterização inicial de bactérias, devido às diferenças na composição e estrutura da parede celular, o mesmo não é possível quando se analisa amostras de archaeas devido à enorme variedade de paredes celulares existentes no domínio *Archaea* (Albers e Meyer, 2011). Assim, tal coloração é utilizada apenas como metodologia auxiliar na descrição de células de archaeas.

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram analisadas amostras do tipo colonial Kappa C e Kappa C suplementado com NH_4Cl . Assim como observado à microscopia óptica, as células presentes na amostra Kappa C apresentavam morfologia cocóide ou bacilar, de tamanho inferior ou próximo a 1 μm (Figura 7A), sendo que em algumas células bacilares foi observada a presença de projeções celulares de função desconhecida, talvez envolvidas na conexão intercelular (Figura 7B).

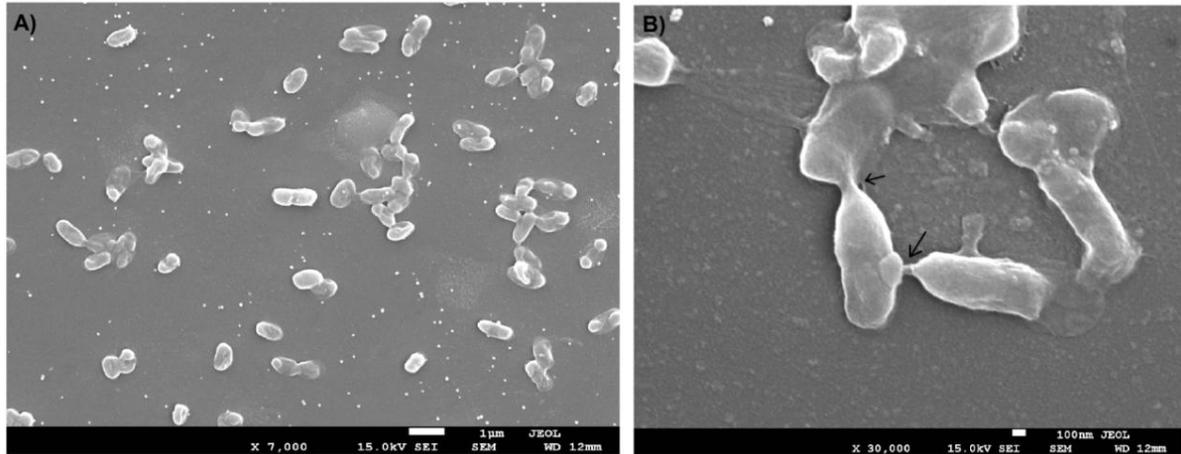


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura das amostras do tipo colonial Kappa C. **A.** Células cocóides diminutas e bacilos com comprimento próximo a 1 µm. **B.** Presença de projeções de composição e natureza desconhecidas, provavelmente envolvidas na conexão intercelular.

Nas preparações do tipo colonial Kappa C cultivado em meio suplementado com NH_4Cl , observou-se a presença de células cocóides isoladas ou em aglomerados (Figura 8A). Também foi identificada a presença de projeções celulares nas formas bacilares nessas amostras (Figura 8B).

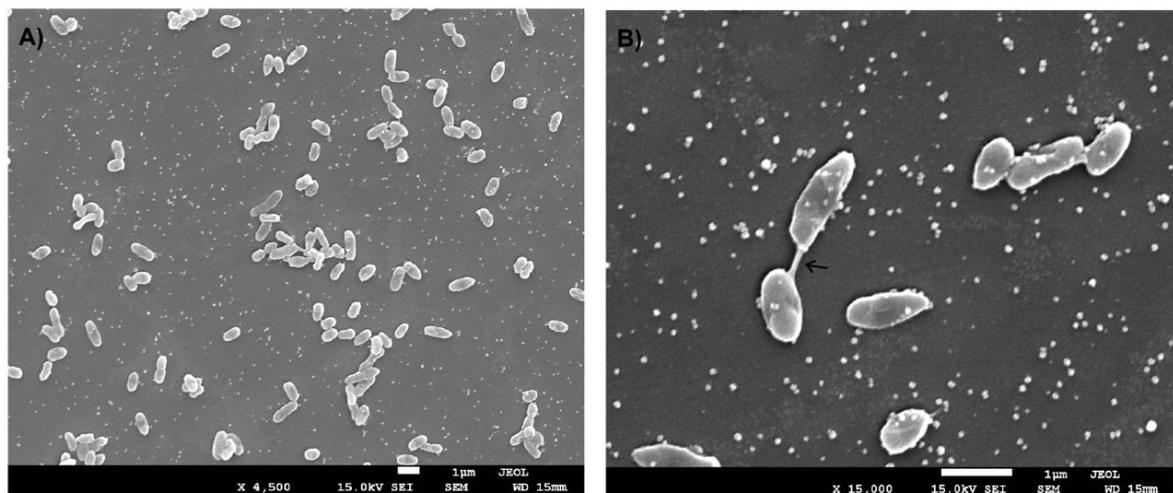


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura das amostras do tipo colonial Kappa C suplementado com NH_4Cl . **A.** Células cocóides e bacilares. **B.** Presença de projeções de composição e natureza desconhecidas, provavelmente envolvidas na conexão intercelular.

Tanto a microscopia óptica quanto a microscopia eletrônica de varredura, revelaram dois tipos morfológicos, sugerindo a presença de mais de um organismo nessas colônias. As análises microscópicas também revelaram não haver diferenças

significativas entre as células presentes no tipo colonial Kappa C e Kappa C suplementado com NH₄Cl.

4.4 Análises de filogenia molecular

Com o objetivo de melhor caracterizar as archaeas e bactérias presentes no cultivo, foram realizadas análises de filogenia molecular utilizando o DNA extraído do cultivo de Kappa C e Kappa C suplementado com NH₄Cl. Ensaios de PCR foram realizados empregando os iniciadores dirigidos aos genes de rRNA 16S de *Archaea*, *Bacteria* e também para o gene *amoA*. No entanto, apenas os amplicons relativos ao gene de rRNA 16S de *Archaea* e *Bacteria* geraram clones recombinantes após a transformação. Dessa forma, não foi possível realizar análises de filogenia para o gene *amoA*.

4.4.1 Ensaios de PCR dirigidos ao gene de rRNA 16S de *Archaea*

Tendo em vista que o DNA extraído do tipo colonial Kappa C se encontrava muito concentrado, foram preparadas diluições seriadas de 1:5, 1:10 e 1:20, sendo utilizado 1 µL de cada diluição nos sistemas de reação contendo 30 µL e os iniciadores 109F/915R. A Figura 9 revela que houve amplificação de fragmentos de DNA com tamanho esperado de 850 pb em todas as amostras.

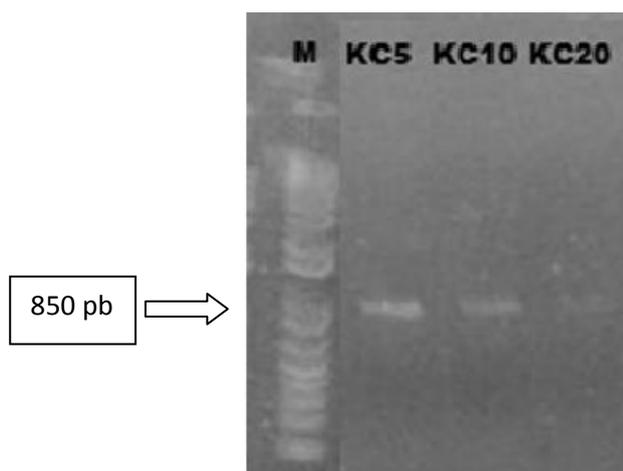


Figura 9. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio dos produtos gerados na PCR utilizando-se os iniciadores 109F e 915R. **KC5:** DNA diluído 1:5, **KC10:** DNA diluído 1:10 e **KC20:** DNA diluído 1:20. **M:** Marcador de massa molecular *1kb Plus DNA ladder* (Invitrogen).

Como os diferentes sistemas de amplificação consistiam da mesma amostra de DNA molde, os amplicons foram reunidos em um único tubo e posteriormente purificados.

4.4.2 Transformação células de *Escherichia coli* DH5 α e seleção de clones recombinantes

Os amplicons resultantes dos ensaios de PCR dirigidos ao gene de rRNA 16S de *Archaea* foram purificados utilizando-se o Kit *GeneJET PCR Purification* (Thermoscientific) de acordo com as instruções do fabricante e ligados ao vetor pGEM-T Easy® (Promega). Em seguida foram utilizados na transformação por choque térmico de células de *E.coli* DH5 α . Foram obtidos 97 clones recombinantes os quais foram submetidos ao procedimento de extração de DNA plasmidial, sendo posteriormente estocados em glicerol 35% a -20 °C.

4.4.3 Extração de DNA plasmidial dos clones recombinantes

O DNA plasmidial dos clones recombinantes foi extraído pelo método de lise alcalina, sendo a eficiência do procedimento avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (Figura 10). Dos 97 clones recombinantes relativos ao gene de rRNA 16S de *Archaea*, apenas 58 apresentaram boa qualidade para o sequenciamento.

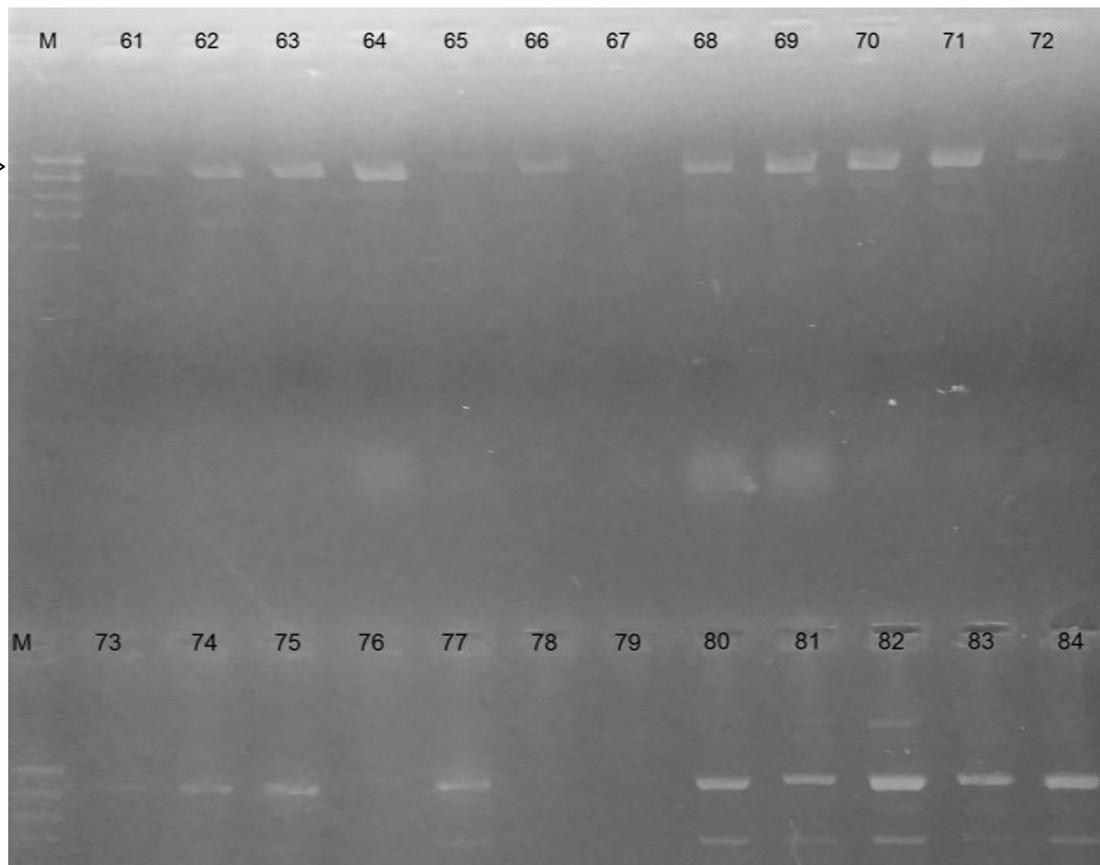


Figura 10. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio da extração de DNA plasmidial de clones aleatoriamente selecionados contendo o produto de PCR relativo ao gene de rRNA 16S de *Archaea*. **M:** Marcador de massa molecular *High Mass Ladder* (Invitrogen). Os números referem-se aos clones recombinantes.

4.4.4 Análises de bioinformática

Foram enviados para o sequenciamento 58 DNAs plasmidiais dos clones recombinantes contendo o fragmento de DNA relativo ao gene de rRNA 16S de *Archaea*. Os DNAs foram submetidos ao sequenciamento automático pelo método de Sanger, realizado pela empresa Macrogen, na Coréia do Sul, empregando o iniciador 109F. Dentre as amostras enviadas, 56 seqüências de *Archaea* apresentaram PHRED (Ewing *et al.*, 1998) superior a 20 para mais de 250 pares de bases, sendo duas seqüências de *Archaea* excluídas. As seqüências selecionadas foram submetidas a alinhamentos múltiplos por meio do programa ClustalX (Larkin *et al.*, 2007), e posteriormente editadas com o auxílio do programa BioEdit.

4.4.5 Análises filogenéticas do gene de rRNA 16S de *Archaea*

Análises filogenéticas baseadas no gene de rRNA 16S são largamente utilizadas em diversos estudos envolvendo a caracterização de microrganismos (Pruesse *et al.*, 2007; Peplies *et al.*, 2008), havendo diferentes bancos de dados taxonômicos utilizados para a classificação de sequências de DNA microbianas (McDonald *et al.*, 2012).

O banco de dados *Greengenes*, muito utilizado em análises filogenéticas, possibilita a classificação taxonômica por meio da comparação das sequências obtidas em um estudo com múltiplas sequências de genes, tais como o gene codificador do rRNA 16S de *Archaea* e *Bacteria*. Tal banco de dados baseia-se em uma classificação taxonômica proposta por curadores independentes tais como o NCBI e *Ribosomal Database Project* (RDP).

No entanto, o aumento do número de sequências de DNA depositadas em bancos de dados tem gerado problemas na taxonomia de alguns microrganismos, principalmente aqueles do domínio *Archaea*. O crescente depósito de sequências de DNA de amostras não cultivadas, pouco conhecidas e estudadas, muitas vezes resulta em incongruências em relação à nomenclatura, já que diferentes autores podem adotar diferentes nomes para os mesmos grupos. Dessa forma, as informações ecológicas e fisiológicas são muitas vezes encobertas pela falta de consenso na classificação (Auguet *et al.*, 2010). Outro problema consiste na proposição de novas taxa, baseados algumas vezes, em um único genoma, ou em poucas amostras de DNA, que não acrescentam muitas informações a respeito da taxonomia desses grupos.

Apesar disso, o banco de dados *Greengenes*, ainda se mostra muito útil, facilitando a classificação de organismos ao utilizar uma combinação de diferentes bancos de dados (DeSantis *et al.*, 2006). Por essa razão, tal banco foi escolhido para as análises das sequências relativas ao gene codificador do rRNA 16S obtidas nesse trabalho.

Das 56 sequências analisadas, 53 apresentaram 100% de identidade com o domínio *Archaea*. Das sequências remanescentes, duas apresentaram identidade inferior a 90% com o domínio *Archaea* e uma apresentou 100% de identidade com o domínio *Bacteria* e, por esse motivo, foram excluídas das análises.

Os iniciadores 21F/958R são largamente utilizados para o domínio *Archaea* e considerados eficientes em estudos de diversidade. Os iniciadores 109F/915R também são amplamente empregados na literatura, sendo o par escolhido para a realização deste

trabalho. Apesar disso, foi observada a amplificação de sequências de DNA classificadas como pertencentes ao domínio *Bacteria* com o uso desses iniciadores, revelando que os mesmos podem não ser ideais para uma primeira análise filogenética.

A Tabela 4 apresenta a classificação taxonômica das sequências que revelaram 100% de identidade com o domínio *Archaea* em todos os níveis taxonômicos apresentados.

Tabela 4. Classificação taxonômica das sequências do gene de rRNA 16S de *Archaea* do tipo colonial Kappa C gerada pelo *Greengenes*.

Nº sequências	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
2	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanoregulaceae</i>	<i>CandidatusMethanoregula</i>
1	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanospirillaceae</i>	<i>Methanospirillum</i>
2	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosaetaceae</i>	<i>Methanosaeta</i>
2	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i>
9	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanocellales</i>	<i>Methanocellaceae</i>	<i>Methanocella</i>
3	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>
5	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Termoplasmata</i>	E2	<i>Methanomassilicoccaceae</i>	<i>Methanomassiliicoccus</i>
6	<i>Crenarchaeota</i>	MBGA	NRP-J	Não classificado	Não classificado
7	<i>Crenarchaeota</i>	<i>Thaumarchaeota</i>	<i>Nitrososphaerales</i>	<i>Nitrososphaeraceae</i>	<i>CandidatusNitrososphaera</i>
5	<i>Crenarchaeota</i>	MCG	pGrFC 26	Não classificado	Não classificado
3	<i>Crenarchaeota</i>	MCG	Não classificado	Não classificado	Não classificado
2	<i>Parvarchaeota</i>	<i>Parvarchaea</i>	YLA114	Não classificado	Não classificado
6	<i>Parvarchaeota</i>	<i>Parvarchaea</i>	WCHD3-30	Não classificado	Não classificado

As análises revelaram sequências pertencentes aos filós *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* e *Parvarchaeota*. No entanto, vale ressaltar que o banco de dados do *Greengenes* ainda considera o filo *Thaumarchaeota* como uma classe do filo *Crenarchaeota*.

Das 53 sequências de DNA analisadas, 24 foram classificadas como pertencentes ao filo *Euryarchaeota*, agrupadas em sete diferentes gêneros de archaeas metanogênicas, como indicado na Tabela 4.

A presença de archaeas metanogênicas não era esperada, visto que estas são organismos anaeróbios e todas as culturas deste trabalho foram armazenadas na presença de oxigênio. Vale ressaltar, no entanto, que algumas espécies de archaeas metanogênicas exibem diferentes graus de tolerância ao oxigênio. Assim, uma hipótese que poderia explicar sua detecção seria a formação de microambientes, com diferentes tensões de O₂ em uma mesma colônia, criando condições de anaerobiose ou microaerofilia em seu interior, o que permitiria a sobrevivências dessas archaeas.

Um recente trabalho relatou a co-ocorrência de archaeas metanogênicas dos gêneros *Methanosaeta*, *Methanoregula* e *Methanocella*, com organismos do filo *Bathyarchaeota* em ambientes terrestres (Xiang *et al.*, 2017). Esses gêneros também foram identificados pelo *Greengenes* no presente trabalho, talvez de forma similar ao descrito, apesar de não haver relatos da presença concomitantes desses dois filós em aquários.

Por outro lado, é extremamente questionável a detecção de sete diferentes gêneros de archaeas metanogênicas em uma mesma colônia. Tendo em vista que as análises filogenéticas foram realizadas a partir de sequências de DNA contendo aproximadamente 650 nucleotídeos, que abrange apenas quatro regiões variáveis do gene codificador do rRNA 16S, pode-se supor que a diversidade observada seria menor caso sequências mais extensas fossem utilizadas.

Seis sequências foram classificadas como pertencentes ao filo *Crenarchaeota*, similares às sequências definidas pelo critério de similaridadeno grau de “ordem” NRP-J. Como mencionado anteriormente, o filo *Thaumarchaeota* ainda não é considerado pelo *Greengenes*, e os organismos atualmente afiliados a ordem NRP-J são classificados como pertencentes ao grupo I.1c de *Thaumarchaeota* (Swanson e Sliwinski, 2013). Esse grupo é amplamente distribuído em solos ácidos, mas pouco se sabe sobre suas características fisiológicas e biológicas (Bomberg, 2016) já que ainda não possuem representantes cultivados.

Sete sequências apresentaram 100% de identidade com o gênero *Candidatus Nitrososphaera*. Esse gênero possui dois representantes cultivados, *Nitrososphaera viennensis* e *Candidatus Nitrososphaera gargensis* ambos pertencentes ao grupo I.1b de *Thaumarchaeota*. Vários estudos apontaram o grupo I.1b como dominante em diferentes tipos de solo (Brintim *et al.*, 1997; Auguet *et al.*, 2010; Bates *et al.*, 2011) no entanto, existem relatos da presença do gênero *Nitrososphaera* em ambientes aquáticos como aquários (Bartelme *et al.*, 2017). Esse gênero pode ser encontrado em ambientes mesófilos mas também em locais termófilos moderados a 45 °C. Os membros cultivados *Candidatus Nitrososphaera Gargensis* e *Nitrososphaera viennensis* são aeróbios e possuem células cocóides irregulares isoladas ou em aglomerados (Tourna *et al.*, 2011; Hatzenpichler *et al.*, 2008; Stieglmeier *et al.*, 2014). As análises de microscopia realizadas no trabalho revelaram células cocóides isoladas e em aglomerados no tipo colonial Kappa C, sugerindo a possível presença de membros do grupo I.1b no cultivo.

Oito sequências foram classificadas como *Miscellaneous Crenarchaeotic Group* (MCG). Esse grupo, composto apenas por sequências de DNA oriundas de organismos não cultivados, foi recentemente classificado como um novo filo denominado *Bathyarchaeota* (Meng *et al.*, 2014). Membros desse filo são encontrados nos mais diversos habitats, incluindo ambientes terrestres, marinhos, locais quentes e frios, ambientes subterrâneos e até anóxicos (Biddle *et al.*, 2006; Teske, 2006; Teske e Sørensen, 2008; Kubo *et al.*, 2012; Xiang *et al.*, 2017). Está ampla distribuição e abundância sugere que esses microrganismos possuem importante função nos ciclos biogeoquímicos. No entanto, a inexistência de representantes cultivados impede o entendimento das propriedades fisiológicas dessas archaeas, assim como sua função ecológica (Meng *et al.*, 2014). Até o momento não há relatos de membros desse grupo em aquários.

Oito sequências foram classificadas como pertencentes ao filo *Parvarchaeota*. Esse filo, proposto recentemente por Rink e colaboradores (2013), não possui representantes cultivados, sendo composto apenas por sequências de DNA de amostras ambientais. Apesar do genoma diminuto, esses microrganismos contribuem nos ciclos do nitrogênio e do carbono. São microaerófilos, mas também sobrevivem na ausência de oxigênio e até o momento só foram detectados em ambientes extremos, como fontes termais e minas ácidas (Chen *et al.*, 2017). Sendo assim, não era esperada a presença de sequências de DNA desse grupo em um cultivo a partir de amostras de aquário.

Como pode-se notar, todas as sequências relativas ao gene de rRNA 16S de *Archaea* classificadas como pertencentes ao filo *Crenarchaeota* sofreram mudanças na classificação taxonômica, sendo atualmente distribuídas em diferentes filos. Dessa forma, nota-se que as frequentes propostas de novos filos dificultam a classificação no banco de dados, que não é atualizado na mesma velocidade em que as sequências são depositadas, gerando desta maneira, informações taxonômicas imprecisas. Esse fato evidencia a importância da obtenção de novas informações a respeito desse domínio, principalmente de organismos não cultivados.

A grande diversidade de archaeas presentes no cultivo não era esperada, já que as condições de cultivo não visavam o enriquecimento de qualquer grupo específico desses organismos. Dessa forma, é importante analisar se a metodologia que está sendo utilizada baseada em um pequeno fragmento do gene de rRNA 16S é suficientemente confiável para a identificação taxonômica do cultivo analisado ou se outro marcador seria mais adequado.

Outra hipótese seria uma possível contaminação por DNA presente no meio de cultura, já que a mesma água usada para a confecção dos meios de cultura é utilizada como inóculo para o repique.

4.4.6 Análise filogenética empregando o gene *amoA*

Como mencionado anteriormente foram realizados cultivos em meios suplementado com NH_4Cl , visando o enriquecimento de archaeas nitrificantes. Foi realizada PCR com os iniciadores específicos para o gene *amoA*, resultando em amplicons de tamanho esperado. No entanto, após a transformação não foi observada a presença de clones recombinantes. É possível que grande parte do DNA tenha se perdido durante a purificação dos fragmentos. Dessa forma, não foi possível obter clones recombinantes para o sequenciamento de DNA dos organismos desse cultivo. Apesar disso, o sequenciamento de DNA dos amplicons obtidos nos ensaios de PCR dirigidos ao gene de rRNA 16S indicaram a presença de organismos oxidantes de amônia pertencentes ao grupo I.1b como ilustrado na árvore filogenética apresentada na Figura 11.

4.5 Árvores filogenéticas

Árvores filogenéticas são utilizadas para representar as relações evolutivas entre diferentes organismos, podendo ser construídas por meio do alinhamento múltiplo de sequências de DNA ou proteínas previamente selecionadas. O marcador molecular selecionado para esse trabalho foi o gene codificador do rRNA 16S, geralmente utilizado na construção de árvores filogenéticas pela sua natureza conservada e também pela larga disponibilidade de sequências desse gene no banco de dados.

Dessa forma, todas as árvores produzidas nesse trabalho foram criadas pelo programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011), utilizando o método estatístico *Neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987), com teste de *Bootstrap* de 1000 repetições.

4.5.1 Árvore filogenética do rRNA 16S de *Archaea*

As análises das sequências relativas ao gene de rRNA 16S de *Archaea* do tipo colonial Kappa C revelaram que o cultivo era composto por diferentes membros do domínio *Archaea*. A árvore foi construída utilizando-se sequências de Unidades taxonômicas operacionais (OTU). Essa sigla refere-se ao conjunto de linhagens que possuem alto grau de semelhança entre si. Dessa forma, todas as árvores do trabalho foram produzidas utilizando sequências de OTUs em nível de espécie (97% de identidade), adquiridas pelo programa Mothur (Schloss *et al.*, 2009).

Sequências do gene do rRNA 16S de archaeas dos filos *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Bathyarchaeota* e *Parvarchaeota* foram obtidas no banco de dados do NCBI e alinhadas às sequências amplificadas a partir do cultivo. A Tabela 5 apresenta as sequências de DNA dos isolados de archaeas retirados do NCBI para a construção da árvore filogenética.

Tabela 5. Organismos cujas sequências do gene de rRNA 16S de *Archaea* foram utilizados na construção da árvore filogenética.

Organismo	Número de acesso
<i>Candidatus Nitrososphaera gargensis</i>	GU797786.1
<i>Candidatus Nitrosphaera devanattera</i>	JN227488.1
<i>Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii</i>	EU239960.1
<i>Cenarchaeum symbiosum</i>	U51469.1
<i>Fervidicoccus fontis</i>	NR116054.1
<i>Ignicoccus pacificus</i>	AJ271794.1

<i>Ignisphaera aggregans</i>	NR102869.1
<i>Methanocella paludicola</i>	AB196288.1
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	NR074110.1
<i>Methanosaeta thermophila</i>	AB071701.1
<i>Methanospirillum hungatei</i>	AB517987.1
<i>Methanoregula boonei</i>	NR074180.1
<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	NR118098.1
<i>Methanobacterium paludis</i>	NR133895.1
<i>Nitrososphaera viennensis</i>	FR773157.1
<i>Nitrosopumilus maritimus</i>	JQ346765.1
<i>Pyrobaculum islandicum</i>	L07511.1
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	X03235.1
<i>Thermocladium modestius</i>	AB005296.1
<i>Thermoproteus neutrophilus</i>	AB009618.1
Uncultured <i>Bathyarchaeota</i> archaea	KY033162.1
Uncultured <i>Candidatus Parvarchaeum</i> sp	JF317821.1
Uncultured Chinese sea sediments archaea	JN590083.1
Uncultured <i>Thaumarchaeota</i>	AY278106.1

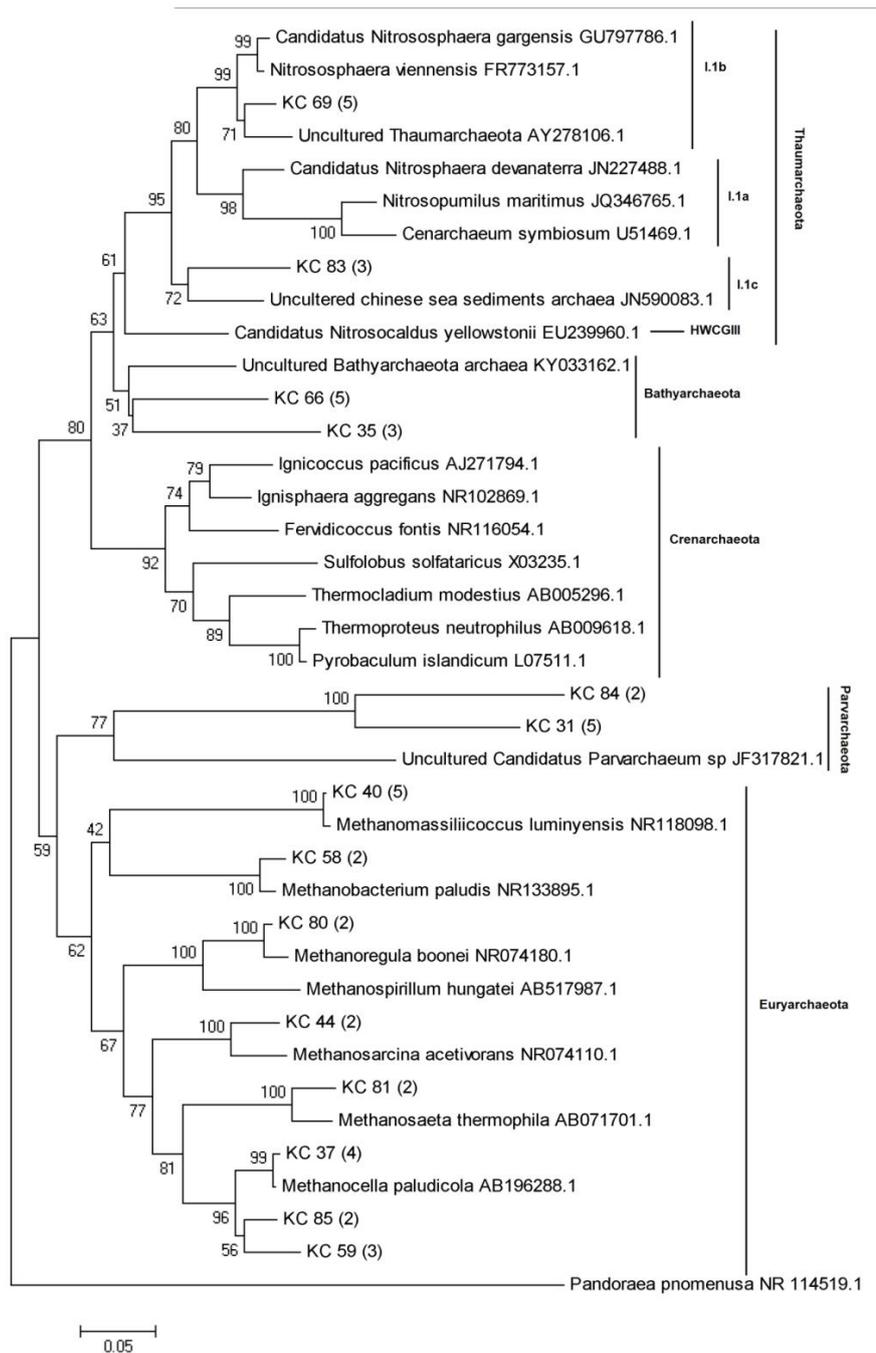


Figura 11. Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene de rRNA 16S de archaea detectadas no cultivo de Kappa C. Foram incluídas nas árvores apenas as OTUs representativas (97% de identidade), os números entre parênteses indicam o número de sequências representadas em cada OTU. Também foram incluídas nas árvores sequências de archaeas cultivadas e não cultivadas retiradas do banco de dados do NCBI. Os números de acesso encontram-se ao lado de cada sequência. A árvore foi construída pelo método de *Neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987), com teste de 1000 *bootstrap* (Felsenstein, 1985). Valores de bootstrap menores que 50 não são mostrados na árvore. A barra de escala indica a distância da similaridade dos ramos. Uma sequência do gene rRNA 16S da bactéria *Pandoraea promenus* (número de acesso NR114519.1) foi utilizada como grupo externo. Os filós e grupos de archaea estão indicados na árvore. HWCG III: *Hot Water Crenarchaeotic Group III*.

Para a construção da árvore foram utilizadas 14 OTUs representativas, sendo os *singletons* excluídos das análises. Dessas 14 OTUS representativas, duas foram classificadas como *Thaumarchaeota*, duas como *Bathyarchaeota*, duas como *Parvarchaeota* e oito como *Euryarchaeota*.

A OTU representativa KC 69 posicionou-se no grupo I.1b, exibindo maior similaridade com a sequência de um organismo ainda não cultivado do filo *Thaumarchaeota*. O grupo I.1b possui dois representantes cultivados até o momento, as espécies *Nitrososphaera viennensis* e *Candidatus Nitrososphaera gargensis*, ambas oxidantes de amônia. A espécie *Nitrososphaera viennensis* foi isolada de amostras de solo e representa, excetuando-se os organismos metanogênicos, uma das poucas espécies de *Archaea* de ambientes não extremos obtidas em cultura pura (Tourna *et al.*, 2011; Stieglmeier *et al.*, 2014). A espécie *Candidatus Nitrososphaera gargensis* foi obtida em co-cultura com bactérias a partir de amostras de uma fonte termal terrestre (Hatzenpichler *et al.*, 2008), tendo seu DNA totalmente sequenciado (Spang *et al.*, 2012).

A OTU representativa KC 83 posicionou-se no grupo I.1c de *Thaumarchaeota*, afiliando-se a uma sequência de um organismo não cultivado. Ao contrário do grupo I.1b, o grupo I.1c não possui qualquer representante com capacidade nitrificante (Weber *et al.*, 2015) e, até o momento, não há relatos de membros desse grupo cultivados em meios artificiais. Organismos do grupo I.1c são comumente encontrados em solos ácidos (Lehtorvita *et al.*, 2009; Timonen e Bomberg, 2009) mas também em solos de altas altitudes (Oline, Schmidt e Grant 2006), solos das florestas temperadas e tropicais (Nicol *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2013), lagos (Auguet e Casamayor, 2013) e até fontes termais (Bohorquez *et al.*, 2012). A ocorrência desse grupo em vários ambientes sugere possíveis papéis no ecossistema. No entanto, estudos sobre os organismos do grupo I.1c são ainda limitados devido à inexistência de culturas laboratoriais, que facilitariam a caracterização fisiológica desses organismos (Weber *et al.*, 2015). Dessa forma, a presença de sequências do grupo I.1c no tipo colonial Kappa C mostra-se bastante interessante, pois permitirá a realização de novos experimentos visando a obtenção de culturas enriquecidas para tais organismos, o que resultará em um maior conhecimento sobre a biologia desse grupo de archaeas.

As OTUs KC 35 e KC 66 posicionaram-se no filo *Bathyarchaeota*, identificado em diversos tipos de ambientes aquáticos e terrestres, sendo aparentemente ubíquo (Huang *et al.*, 2003; Parkes *et al.*, 2005; Teske, 2006; Biddle *et al.*, 2006), mas até o

momento não possui representantes cultivados (Kubo *et al.*, 2012). A obtenção de uma cultura de organismos desse grupo seria um grande salto para uma melhor avaliação das características fisiológicas e ecológicas dos integrantes desse filo que, até o momento permanecem desconhecidas (Meng *et al.*, 2014).

As OTUs KC 31 e KC 84 alinham-se com sequências do filo *Parvarchaeota*, que ainda não possui representantes cultivados. Sequências de DNA desse filo foram encontradas apenas em ambientes ácidos ou com altas temperaturas e pouco se sabe a respeito de suas características fisiológicas ou seu papel biológico na natureza (Chem *et al.*, 2017). Esse filo integra o Superfilo DPANN composto por outros filios que possuem características semelhantes como célula e genoma diminutos (Rink *et al.*, 2014).

As OTUs representativas KC 37, KC 40, KC 44, KC 58, KC 59, KC 80, KC 81, KC 85 posicionaram-se no filo *Euryarchaeota* afiliando-se com sequências de archaeas metanogênicas.

A OTU KC 37 afiliou-se com *Methanocella paludicola*, uma espécie isolada do solo de uma plantação de arroz, cujas células são bacilares, imóveis e Gram negativas (Sakai *et al.*, 2008). As OTUs KC 59 e KC 85 alinham-se entre si, posicionando-se como um grupo irmão de *Methanocella paludicola*. A OTU KC 40 agrupou-se com *Methanomassiliicoccus luminyensis*, espécie isolada de fezes humanas, que apresenta células cocóides, imóveis e Gram positivas (Dridi *et al.*, 2012), característica não observada nas preparações microscópicas coradas pelo método de Gram, que somente revelou a presença de células Gram negativas.

A OTU KC 44 posicionou-se com *Methanosarcina acetivoran*, uma archaea inicialmente isolada de sedimentos marinhos, que possui células cocóides irregulares, imóveis e Gram negativas (Sowers *et al.*, 1984). A OTU KC 58 posicionou-se com *Methanobacterium paludis*, espécie encontrada em solo de turfeiras, com células bacilares, imóveis e Gram negativas (Cadillo-Quiroz *et al.*, 2014). A OTU KC 80 posicionou-se com *Methanoregula boonei*, um organismo Gram negativo dimórfico, possuindo células bacilares e cocos irregulares (Brauer *et al.*, 2006; Brauer *et al.*, 2011).

A OTU KC 81 posicionou-se com *Methanosaeta thermophila*, espécie composta por células imóveis, bacilares, são Gram negativas e termófilas (Nozhevnikova e Chudina, 1985), o que torna esse achado questionável, uma vez que as culturas utilizadas neste trabalho foram sempre mantidas a 28 °C.

É improvável que todas essas archaeas metanogênicas estejam presentes no cultivo, pelo fato de várias dessas espécies requererem condições muito específicas de

crescimento, geralmente necessitando de meios de cultura enriquecidos para o seu desenvolvimento. De acordo com a literatura é pouco provável que essas espécies se desenvolvam nas condições de cultivo do presente trabalho (Sowers *et al.*, 1984; Nozhevnikova e Chudina, 1985; Brauer *et al.*, 2006; Sakai *et al.*, 2008; Brauer *et al.*, 2011; Dridi *et al.*, 2012; Cadillo-Quiroz *et al.*, 2014).

Existe a possibilidade da PCR ter sido contaminada por DNA advindo do meio de cultura ou por outros tipos de contaminação externa que podem ter promovido essa alta diversidade. Além disso, é importante avaliar se o uso de um pequeno fragmento do gene que codifica o rRNA 16S, comparando com o banco de dados é confiável o suficiente para inferir análises filogenéticas, ou se o uso do gene inteiro seria mais confiável para esse tipo de análise.

O fato do domínio *Archaea* ser amplamente distribuído em vários ambientes sugere um papel ecológico muito importante desses microrganismos na natureza. Apesar disso, existem poucos relatos de cultivo de archaeas, principalmente daquelas de ambientes não extremos.

4.6 Análises de filogenia molecular de *Bacteria*

Com o objetivo de identificar as bactérias presentes no cultivo, foram realizadas análises de filogenia molecular utilizando o DNA extraído do cultivo de Kappa C.

4.6.1 Ensaios de PCR dirigidos para o gene de rRNA 16S de *Bacteria*

O DNA extraído do tipo colonial Kappa C foi submetido a ensaios de PCR com os iniciadores 27F e 1492R, específicos para o gene que codifica o rRNA 16S de *Bacteria*, a fim de confirmar a presença de membros desse domínio no cultivo. Foram utilizadas diferentes concentrações de DNA, que resultaram na amplificação de amplicons do tamanho esperado (cerca de 1400 pb) para todas as concentrações utilizadas no ensaio (Figura 12). Essa análise confirma a permanência de co-cultivo de archaeas e bactérias no tipo colonial Kappa C, como descrito anteriormente por Ribeiro (2015).

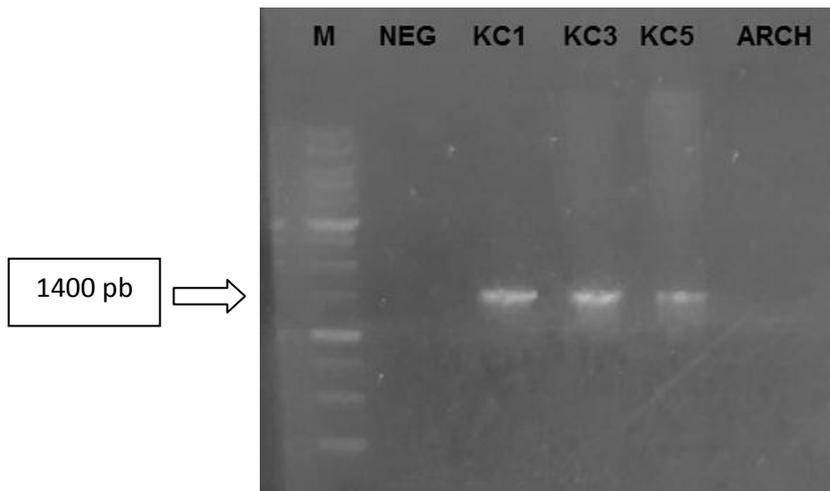


Figura 12. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio dos produtos gerados na PCR utilizando-se os iniciadores 27F e 1492R. KC1: DNA de Kappa C diluído 1:5, KC3: DNA Kappa C diluído 3:5, KC5: Kappa C diluído 5:5. **M:** Marcador de massa molecular *Ikb Plus DNA ladder* Kasvi; NEG: Controle negativo, sem DNA; ARCH: Controle negativo, onde foi utilizado o DNA da archaea *Haloferax volcanii*.

4.6.2 Transformação células de *Escherichia coli* DH5 α e seleção de clones recombinantes

Para se obter uma concentração adequada dos produtos da PCR, os amplicons foram reunidos em uma única amostra, purificados com o KIT *GeneJET PCR Purification* (Thermoscientific) e ligados ao vetor pGEM-T Easy® (Promega). Em seguida foram utilizados na transformação por choque térmico de células de *E.coli* DH5 α . Foram obtidos 40 clones recombinantes os quais foram estocados em glicerol 35% e também submetidos ao procedimento de extração de DNA plasmidial.

4.6.3 Extração de DNA plasmidial dos clones recombinantes

O DNA dos clones foi extraído pelo método de lise alcalina e a eficiência foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Dos 40 clones contendo o gene de rRNA 16S de *Bacteria*, 38 apresentaram qualidade adequada para o sequenciamento de DNA.

4.6.4 Análises de bioinformática

Foram enviados para o sequenciamento 38 DNAs plasmidiais dos clones recombinantes contendo o fragmento de DNA relativo ao gene de rRNA 16S de *Bacteria*. Os DNAs foram submetidos ao sequenciamento automático pelo método de Sanger, empregando o iniciador 27F, realizado pela empresa Macrogen, na Coreia do Sul. As 38 sequências resultantes apresentaram PHRED (Ewing *et al.*, 1998) superior a 20 em mais de 250 pares de bases. Estas foram então submetidas a alinhamentos múltiplos por meio do programa ClustalX (Larkin *et al.*, 2007), e posteriormente editadas com o auxílio do programa BioEdit.

4.6.5 Análises filogenéticas do gene de RNA 16S de *Bacteria*

As sequências do gene de rRNA 16S de *Bacteria* foram classificadas utilizando-se o banco de dados *Greengenes*. Trinta e sete sequências foram classificadas como pertencentes ao filo *Proteobacteria*, classe *Betaproteobacteria*, ordem *Burkholderiales*, família *Burkholderiaceae* e gênero *Pandoraea*, com 100% de identidade. Apenas uma sequência apresentou 98% de identidade com o gênero *Pandoraea*.

Dessa forma, é possível inferir que bactérias do gênero *Pandoraea* estão estabelecidas no tipo colonial Kappa C, mantendo-se como a única espécie bacteriana após três anos de repiques sucessivos, desde sua identificação por Ribeiro (2015). Isso revela que, apesar da tentativa de eliminação dos organismos do domínio *Bacteria* das culturas por meio do uso de agentes antimicrobianos, esta espécie se manteve estável, sugerindo um perfil de multirresistência a antibióticos.

As bactérias do gênero *Pandoraea* são organismos Gram negativos, com morfologia bacilar e flagelação polar. Este gênero é composto por cinco espécies: *Pandoraea apista*, *P.pulmonicola*, *P.pnomenusa*, *P.sputorum*, e *P.norimbergensis* (Coenye *et al.*, 2000). *Pandoraea apista*, *P.pulmonicola*, *P.pnomenus*, e *P.sputorum* foram isoladas de amostras de escarro de pacientes com fibrose cística, já *P.norimbergensis* foi encontrada em diversos ambientes como água, cultura de sangue, lavagens alveolares humanas e até leite em pó. Existem isolados de *Pandoraea* sp. encontrados em solos e sistemas de água potável que não foram classificadas até o momento (Silbaq, 2009). No entanto, vale ressaltar que ainda não há relatos de *Pandoraea* em aquários.

Os resultados obtidos nas análises por coloração de Gram e microscopia eletrônica de varredura corroboram o achado deste gênero, uma vez que formas bacilares sempre foram observadas.

O gênero *Pandoraea* exibe amplo espectro de resistência à ampicilina, aminoglicosídeos, cefalosporinas de espectro estendido aztreonam e meropenem, no entanto, são sensíveis a imipenem (Daneshvar *et al*, 2001; Stryjewski *et al*, 2003). Essa característica explica porque os antibióticos utilizados não inibiram o crescimento dessa bactéria. Esse fato novamente introduz a dificuldade de obtenção de uma cultura pura de archaea obtida de ambientes mesófilos.

4.6.6 Árvore filogenética do gene de rRNA 16S de *Bacteria*

Foi construída uma árvore filogenética, visando melhor caracterização da espécie do gênero *Pandoraea* presente no cultivo. Todas as 38 sequências de DNA geraram apenas uma OTU representativa a nível de espécie (97% de similaridade), de acordo com o programa Mothur (Schloss *et al.*, 2009).

Sequências de várias espécies do gênero *Pandoraea* e sequências de outras bactérias de referência foram obtidas e alinhadas à OTU representativa do gene de rRNA 16S de *Bacteria*. A Tabela 6 apresenta os isolados de *Bacteria* utilizados na construção da árvore filogenética e seus respectivos números de acesso. Uma sequência de *Archaea* foi utilizada como grupo externo na construção da árvore.

Tabela 6. Sequências do gene de rRNA 16S de *Bacteria* utilizados na construção da árvore filogenética.

Organismo	Número de acesso
<i>Pandoraea faecigallinarum</i>	AB510957.1
<i>Pandoraea sputorum</i>	NR028751.1
<i>Pandoraea pulmonicola</i>	NR028750.1
<i>Pandoraea pnomenusa</i>	NR114519.1
<i>Pandoraea apista</i>	NR028749.1
<i>Pandoraea norimbergens</i>	AF139171.1
<i>Pandoraea terrae</i>	NR152002.1
<i>Ralstoniasyzygii subsp celebesensis</i>	KC820940.1

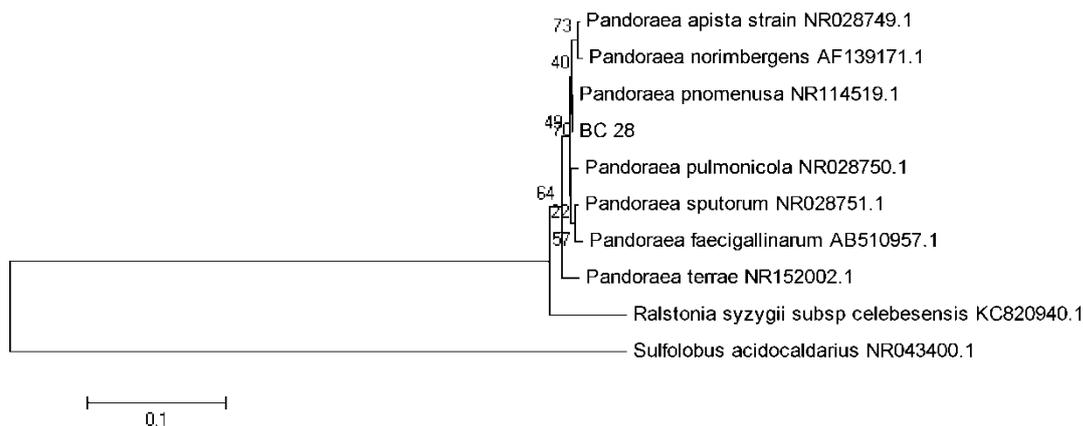


Figura 13. Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene de rRNA 16S de *Bacteria* detectada no cultivo. Foi incluída na árvore apenas uma OTU representativa (97% de identidade), o número entre parênteses indica o número de sequências representadas pela OTU. Também foram incluídas na árvore sequências de bactérias cultivadas e não cultivadas retiradas do banco de dados do NCBI. Os números de acesso encontram-se ao lado de cada sequência. A árvore foi construída pelo método de *Neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987), com teste de 1000 *bootstrap* (Felsenstein, 1985). A barra de escala indica a distância da similaridade dos ramos. Uma sequência do gene rRNA 16S da archaea *Sulfolobus acidocaldarius* (número de acesso NR043400.1) foi utilizada como grupo externo.

A OTU representativa BC 28 alinhou-se com a sequência de *P.pnomenusa* que, juntamente com outras espécies de *Pandoraea*, formaram um clado bem definido, sendo *Ralstonia syzygii* subespécie *celebesensis* a bactéria mais próxima filogeneticamente desse grupo.

Recentemente foi sequenciado o genoma completo de um isolado de *Pandoraea pnomenusa* obtido de amostras de escarro de pacientes com fibrose cística. O genoma dessa bactéria possui um único cromossomo circular de 5,389,285 bp, não sendo detectada a presença de plasmídeos nessa bactéria (Lim *et al.*, 2016). Relatos descrevendo o gênero *Pandoraea* associados a bacteremia e o posterior isolamento de *P.pnomenusa* de uma cultura de sangue, sugeriu que essa espécie possa ser extremamente patogênica. Essa bactéria também já foi isolada de amostras de escarro e de fluidos dos brônquios de pacientes com fibrose cística ou doenças pulmonares crônicas (Daneshvar *et al.*, 2001; Stryjewski *et al.*, 2003; Costello *et al.*, 2011). Apesar dos relatos associarem a espécie *P. pnomenusa* a diferentes quadros patológicos, nossos resultados sugerem um possível papel ecológico para este organismo, tendo em vista

sua ocorrência em uma cultura contendo pelo menos um organismo do domínio *Archaea*. Além disso, mais estudos são necessários para confirmar se a bactéria presente no cultivo do tipo colonial Kappa C realmente corresponde à espécie *P.pnomenusa* ou se representa uma espécie ainda não cultivada deste gênero.

5 Conclusões

- As análises microscópicas revelaram dois tipos morfológicos no cultivo: bacilos e cocos Gram negativos;
- Foram detectadas sequências de DNA que se afiliaram a diferentes filos de *Archaea*.
- O tipo colonial Kappa C consiste em um co-cultivo composto por *Archaea* de diferentes filos e bactérias do gênero *Pandoraea*.

6 Perspectivas

- Realização de experimentos de PCR empregando iniciadores que propiciem a amplificação de fragmentos mais longos do gene de rRNA 16S para análises filogenéticas mais acuradas do cultivo;
- Utilização de outros marcadores filogenéticos como proteínas ribossomais;
- Uso de novos agentes antimicrobianos, ou novas técnicas com intuito de obter culturas puras de archaeas mesófilas;
- Repetir os experimentos empregando a cultura do tipo colonial Kappa C crescido em meio suplementado com cloreto de amônio.

7 Referências Bibliográficas

- Alain, K. & Querellou, J. 2009. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. **Extremophiles**, 13:583-594.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. 2004. Capítulo 4 DNA e Cromossomos. **Biologia Molecular da Célula**. 4ª Edição – Porto Alegre, Artmed, p. 191-234.
- Albers, S. V. & Meyer, B. H. 2011. The archaeal cell envelope. **Nature**, 9(6):414-427.
- Auchtung, T. A.; Takacs-Vesbach, C. D.; Cavanaugh, C. M. 2006. 16S rRNA phylogenetic investigation of the candidate division “Korarchaeota.” **Applied and Environmental Microbiology**, 72:5077–5082.
- Amann, R. I.; Ludwig, W.; Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, 59(1):143-169.
- Auguet, J. C.; Barberan, A.; Casamayor, E. O. 2010. Global ecological patterns in uncultured *Archaea*. **The ISME journal**, 4(2):182-190.
- Auguet, J.C.; Triado-Margarit, X.; Nomokonova, N.; Camarero, L.; Casamayor, E.O. 2012. Vertical segregation and phylogenetic characterization of ammonia-oxidizing Archaea in a deep oligotrophic lake **The ISME Journal** 6:1786–1797.
- Auguet, J.C; Casamayor, E. O. 2013. Partitioning of Thaumarchaeota populations along environmental gradients in high mountain lakes. **FEMS Microbiology Ecology**, 84:154–64.
- Balch, W. E.; Fox, G. E.; Magrum, L. J.; Woese, C. R.; Wolfe, R. S. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. **Microbiological Reviews**, 43(2):260-296.
- Barns, S. M.; Delwiche, C. F.; Palmer, J.D.; Pace, N.R. 1996. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, 93(17):9188-9193.
- Barry, E.R.; Bell, S.D. 2006. DNA Replication in the Archaea. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 70(4):876-887.
- Bartelme, R.P.; McLellan, S.L.; Newton, R.J. 2017. Freshwater Recirculating Aquaculture System Operations Drive Biofilter Bacterial Community Shifts around a Stable Nitrifying Consortium of Ammonia-Oxidizing *Archaea* and Comammox *Nitrospira*. **Frontiers in microbiology**, 8:101.
- Bates, S. T.; Berg-Lyons, D.; Caporaso, J. G.; Walters, W. A.; Knight, R.; Fierer, N. 2011. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **The ISME journal**, 5(5):908-917.

- Belay, N. Mukhopadhyay, B.; De Macario, E.C.; Galask, R.; Daniels, L. 1990. Methanogenic bacteria in human vaginal samples. **Journal of Clinical Microbiology**, 28(7):1666-1668.
- Beman, J. M. & Francis, C. A. 2006. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahía del Tóbari, Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, 72(12):7767-7777.
- Bernander, R. 2000. Chromosome replication, nucleoid segregation and cell division in Archaea. **Trends in Microbiology**, 8(6):278-283.
- Biddle, J. F.; Lipp, J. S.; Lever, M. A.; Lloyd, K. G.; Sørensen, K. B.; Anderson, R.; Fredricks, H. F.; Elvert, M.; Kelly, T. J.; Schrag, D. P.; Sogin, M. L.; Brenchley, J. E.; Teske, A.; House, C. H.; Hinrichs, K. 2006. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 103:3846–3851.
- Bintrim, S. B.; Donohue, T. J.; Handelsman, J.; Roberts, G. P.; Goodman, R. M. 1997. Molecular phylogeny of Archaea from soil. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, 94:277-282.
- Blainey, P.C.; Mosier, A.C.; Potanina, A.; Francis, C.A.; Quake, S.R. 2011. Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis. **PLoS One**, 6(2):1-12.
- Bohorquez, L. C.; Delgado-Serrano, L.; López, G.; Osorio-Forero, C.; Klepac-Cerai, V.; Kolter, R.; Junca, H.; Baena, S.; Zambranp, M. M.; 2012. In-depth characterization via complementing culture-independent approaches of the microbial community in an acidic hot spring of the Colombian Andes. **Microbiology Ecology**, 63:103–15.
- Bomberg, M. 2016. The Elusive Boreal Forest Thaumarchaeota. **Agronomy**, 6, 36.
- Braüer, S. L.; Cadillo-Quiroz, H.; Yashiro, E.; Yavitt, J. B.; Zinder, S. H.; 2006. Isolation of a novel acidiphilic methanogen from an acidic peat bog. **Nature** 442:192–194.
- Braüer, S. L.; Cadillo-Quiroz, H.; Ward, R. J.; Yavitt, J. B.; Zinde, S. H. 2011. *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 61:45–52.
- Brochier-Armanet, C.; Boussau, B.; Gribaldo, S.; Forterre, P. 2008. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. **Nature Reviews Microbiology**, 6(3):245-252.
- Brochier-Armanet, C.; Forterre, P.; Gribaldo, S. 2011. Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. **Current Opinion in Microbiology**, 14(3):274-281.

- Brock, T.D.; Brock, K.M; Belly, R.T.; Weiss, R.L. 1972. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. **Archives of Microbiology**, 84(1):54-68.
- Cadillo-Quiroz, H.; Braüer, S. L.; Goodson, N.; Yavitt, J. B.; Zinder, S. H. 2014. *Methanobacterium paludis* sp. nov. and a novel strain of *Methanobacterium lacus* isolated from northern peatlands. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 64:1473–1480.
- Canfield, D. E.; Glazer, A. N.; Falkowski, P. G. 2010. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. **Science**, 330(6001):192-196.
- Castelle, C. J.; Wrighton, K. C.; Thomas, B. C.; Hug, L. A.; Brown, C. T.; Wilkins, M. J.; Frischkorn, K. R.; Tringe, S. G.; Singh, A.; Markillie, L. M.; Taylor, R. C.; Willians, K. H.; Banfield, J. F. 2015. Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. **Current Biology**, 25:690–701.
- Chelius, M. K. & Triplett, E. W. 2001. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L. **Microbiology Ecology**, 41:252–263.
- Chen, L.; Méndez-García. C.; Dombrowski, N; Servín-Garcidueñas, L.E.; Eloe-Fadrosh, E.A.; Fang, B.; Luo, Z.; Tan, S.; Zhi, X.; Hua, Z.; Martinez-Romero, E.; Woyke, T.; Huang, L.; Sánchez, J.; Peláez, A.I.; Ferrer, M.; Baker, B.J.; Shu, W. 2017. Metabolic versatility of small archaea Micrarchaeota and Parvarchaeota. **The ISME Journal**, 12:756–775.
- Coenye, T.; Falsen, E.; Hoste, B.; Ohlén, M.; Johan, G.; Govan, J.; Gillis, M.; Vandamme, P. 2000. Description of *Pandoraea* gen. Nov with *Pandoraea apista* sp. Nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. Nov., *Pandoraea pnomenusa* sp. Nov., *Pandoraea sputorum* sp. Nov. And *Pandoraea norimbergensis* comb. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 50:887-889.
- Connon, S.A. & Giovannoni, S.J. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, 68:3878-3885.
- Casanueva, A.; Galada, N.; Baker, G. C.; Grant, W. D.; Heaphy, S.; Jones, B.; Yanhe, M.; Ventosa, A.; Blamey, J.; Cowan, D. A.; 2008. Nanoarchaeal 16S rRNA gene sequences are widely dispersed in hyperthermophilic and mesophilic halophilic environments. **Extremophiles**, 12:651–656.
- Clingenpeel, S.; Kan, J.; Macur, R. E.; Woyke, T.; Loyalvo, D.; Varley, J.; Inskeep, W. P.; Nealson, K.; McDermott, T. R.; 2013. Yellowstone lake nanoarchaeota. **Frontiers in Microbiology**, 4:274.
- Costello, A.; Herbert, G.; Fabunmi, L.; Schaffer, K.; Kavanagh, K. A.; Caraher, E. M.; Callaghan, M.; McClean, S. 2011. Virulence of an emerging respiratory pathogen,

genus *Pandoraea*, *in vivo* and its interactions with lung epithelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, 60:289–299.

Darland, G.; Brock, T.D.; Samsonoff, W.; Conti, S.F. 1970. A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile. **Science**, 170(3965):1416-1418.

Damashek, J.; Smith, J.M.; Mosier, A.C.; Francis, C.A. 2015. Benthic ammonia oxidizers differ in community structure and biogeochemical potential across a riverine delta. **Frontiers in Microbiology**, 5(743):1-18.

Daneshvar, M. I; Hollis, D. G; Steigerwalt, A. G; Whitney, A. M; Spangler, L; Douglas, M. P; Jordan, J. G.; Macgregor, J. P.; Hill, B. C.; Tenover, F. C.; Brenner, D. J.; Weyant, R. S.; 2001. Assignment of CDC weak oxidizer group2 (WO-2) to the genus *Pandoraea* and characterization of three new *Pandoraea* genome species. **Journal of Clinical Microbiology**, 39,1819–1826.

De la Torre, J.; Walker, C.; Ingalls, A.; Könneke, M.; Stahl, D. 2008. Cultivation of a Thermophilic Ammonia Oxidizing Archaeon Synthethizing Crenarchaeol. **Environmental Microbiology**, 10(3):810-818.

DeLong, E. F. 1992. *Archaea* in costal marine environments. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, 89:5685-5689.

DeLong, E.F.; Wu, K.Y.; Prézelin, B.B.; Jovine, R.V. 1994. High abundance of *Archaea* in Antarctic marine picoplankton. **Nature**, 371:695-697.

DeLong, E. F. 1998. Everything in moderation: *Archaea* as ‘non-extremophiles’. **Current Opinion in Genetics and Development**, 8(6):649-654.

DeLong, E.F. 2003. Oceans of *Archaea*: abundant oceanic *Crenarchaeota* appear to derive from thermophilic ancestors that invaded low-temperature marine environments. **ASM News**, 69(10): 503-511.

Dennis, P.P. 1997. Ancient Ciphers: Translation in Archaea. **Cell**, 89:1007-1010.

DeSantis, T. Z.; Hugenholtz, P.; Larsen, N.; Rojas, M.; Brodie, E. L.; Keller, K.; Huber, T.; Dalevi, D.; Hu, P.; Andersen, G. L. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, 72(7):5069-5072.

Dridi, B.; Fardeau, M.; Ollivier, B.; Raoult, D.; Drancourt, M. 2012. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp.nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**,62:1902–1907.

Elkins, J. G.; Podar, M.; Graham, D. E.; Makarova, K. S.; Wolf, Y.; Randau, L.; Hedlund, B. P.; Brochier-Armanet, C.; Kunin, V.; Anderson, I.; Lapidus, A.; Goltsman, E.; Barry, K.; Koonin, E. V.; Hugenholtz, P.; Kyrpides, N.; Wanner, G.; Richardson, P.; Keller, M.; Stetter, K. O. 2008. A korarchaeal genome reveals

insights into the evolution of the Archaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 105(23):8102-8107.

Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M. C.; Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. accuracy assessment. **Genome Research**, 8:175-185.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, 39:783-791.

Fiala, G. & Stetter, K.O. 1986. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. **Archives of Microbiology**, 145:56-61.

Francis, C. A.; Roberts, K. J.; Beman, J. M.; Santoro, A. E.; Oakley, B. B. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, 102(41):14683-14688.

Gray, N.D.; Miskin, I. P.; Oksana, K.; Curtis, T.P.; Head, I. M. 2002. Occurrence and activity of Archaea in aerated activated sludge wastewater treatment plants. **Environmental Microbiology**, 4(3):158-168.

Guy, L. & Ettema, T. J. G. 2011. The archaeal ‘TACK’ superphylum and the origin of eukaryotes. **Trends in Microbiology**, 19(12):580-587.

Hatzenpichler, R.; Lebedeva, E. V.; Spieck, E.; Stoecker, K.; Richter, A.; Daims, H.; Wagner, M. 2008. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 105(6):2134-2139.

Hatzenpichler, R. 2012. Diversity, physiology and niche differentiation of ammonia-oxidizing Archaea. **Applied and Environmental Microbiology**, 78(21):7501-7510.

Hoffmann, C.; Dollive, S.; Grunberg, S.; Chen, J. Li, H.; Lewis, J.D. 2013. Archaea and Fungi of the Human Gut Microbiome: correlations with diet and bacterial residents. **PLoS One**, 8(6):1-12.

Hohn, M. J., Hedlund, B. P. & Huber, H. 2002. Detection of 16S rDNA sequences representing the novel phylum ‘‘Nanoarchaeota’’: indication for a wide distribution in high temperature biotopes. *Syst. Appl. Microbiol.* 25:551–554.

Hong, Y.; Youshao, W.; Chen, F.; 2013. Archaea dominate ammonia oxidizers in the permian water ecosystem of Midland basin. **Microbes and Environments**, 28(3):396-199.

Huang, L.N.; Chen, Y.Q.; Zhou, H.; Luo, S.; Lan, C. Y.; Qu, L. H. 2003. Characterization of methanogenic Archaea in the leachate of a closed municipal solid waste landfill. **FEMS Microbiology Ecology** 46:171–177.

- Huber, H.; Hohn, M.J.; Stetter, K.O.; Reinhard, R. 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. **Nature**, 417(6884):63-67.
- Ishino, Y. & Ishino, S. 2012. Rapid progress of DNA replication studies in Archaea, the third domain of life. **Science China**, 55(5):386-403.
- Jung, M. Y.; Park, S. J.; Min, D.; Kim, J. S.; Rijpstra, W. I. C.; Sinninghe Damsté, J. S.; Kim, G. J.; Madsen, E. L.; Rhee, S. K. 2011. Enrichment and characterization of an autotrophic ammonia-oxidizing archaeon of mesophilic crenarchaeal group I.1a from an agricultural soil. **Applied and Environmental Microbiology**, 77(24):8635-8647.
- Jung, M. Y; Park, S. J; Kima, S. J.; KIMA, J.G; Sinningh, J. S; Damstéc; Jeond, C. O; Rhea, S. K. 2014. A mesophilic, autotrophic, ammonia-oxidizing archaeon of thaumarchaeal group I.1a cultivated from a deep oligotrophic soil horizon. **Applied and Environmental Microbiology**, 80(12):3645-3655.
- Jurgens, G.; Lindstrom, K; Saano, A. 1997. Novel group within the kingdom crenarchaeota from boreal forest soil. **Applied and Environmental Microbiology**, 63(2):803-805.
- Kates, M. 1993. Membrane lipids of archaea. In: **The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)** (Kates, M; Kushner, D. J.; Matheson, A. T., eds). Amsterdam: Elsevier. Capítulo 9, 261-295.
- Kaeberlein, T.; Lewis, K.; Espstein, S. S. 2002. Isolating "Uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. **Science**. 296:1127-1129.
- Kim, J.; Jung, M.; Park, S.; Rijpstra, I. C.; Damsté, J. S. A.; Madsen, E. L.; Min, D.; Kim, J.; Kim, G.; Rhee, S. 2012. Cultivation of a highly enriched ammonia-oxidizing archaeon of thaumarchaeotal group I.1b from an agricultural soil. **Environmental Microbiology**, 14(6):1528-1543.
- Könneke, M.; Bernhard, A. E.; de la Torre, J. R.; Walker, C. B.; Waterbury, J. B.; Stahl, D. A. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature**, 437(7058):543-546.
- Kozubal, M. A.; Romine, M.; Jennings, R. M; Jay, Z. J.; Tringe, T. G.; Rusch, D. B.; Beam, J. P.; McCue, L. A.; Inskeep, W. P. 2012. Geoarchaeota: a new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park. **The ISME Journal**, (7): 622-634.
- Kubo, K.; Lloyd, K. G.; Biddle, J. F.; Amann, R.; Teske, A.; Knittel, K. 2012. Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments. **The ISME journal**, 6(10):1949-1965.
- Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.D.;

- Gibson, T. J.; Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 23(21):2947-2948.
- Lehtovirta, L. E.; Prosser, J. I.; Nicol, G. W. 2009. Soil pH regulates the abundance and diversity of Group I.1c Crenarchaeota. **FEMS Microbiology Ecology**, 70(3):367-376.
- Lehtovirta-Morley, L. E.; Stoecker, K.; Vilcinkas, A.; Prosser, J. I.; Nicol, G.W. 2011. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 108(38):15892-15897.
- Lehtovirta-Morley, L. E.; Ge, C.; Ross, J.; Yao, H.; Nicol, G. W.; Prosser, J. I. 2014. Characterisation of terrestrial acidophilic archaeal ammonia oxidisers and their inhibition and stimulation by organic compounds. **FEMS Microbiology Ecology**, 89:542-552.
- Leigh, J.A. 2000. Nitrogen fixation in methanogens: the archaeal perspective. **Current Issues in Molecular Biology**, 2(4):125-131.
- Leigh, J.A.; Albers, S.J.; Atomi, H. Allers, T. 2011. Model for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, *Thermococcales* and *Sulfolobales*. **FEMS Microbiology Reviews**, 35:577-608.
- Lebedeva, E. V.; Hatzenpichler, R.; Pelletier, E.; Schuster, N.; Hauzmayer, S.; Bulaev, A.; Grigoreva, N. V.; Galushko, A.; Schmid, M.; Palatinszky, M.; Le Paslier, D.; Daims, H.; Wagner, M. 2013. Enrichment and genome sequence of the group I.1a ammonia-oxidizing archaeon “*Ca. Nitrosotenuis uzonensis*” representing a clade globally distributed in thermal habitats. **PloS One**, 8(1):1-12.
- Lim, Y.; Ee, R. ; Yong, D.; Yu, C.; Ang, G.; Tee, K.; Yin, W.; Chan, K. 2016. Complete Genome Sequence Analysis of *Pandoraea pnomenusa* Type Strain DSM16536T Isolated from a Cystic Fibrosis Patient. **Frontiers in microbiology**, 7:109.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Dunlap, P.V.; Clark, D.P. 2010. **Microbiologia de Brock**. 12ª Edição – Porto Alegre, Artmed.
- Magrum, L. J.; Luehrsen, K. R.; Woese, C. R. 1978. Are extreme halophiles actually "bacteria"? **Journal of Molecular Evolution**, 11(1):1-8.
- Maranhão, A. Q. 2016. Transformação bacteriana. De-Souza, M. T; Brígido, M. M; Maranhão, A. Q. (Orgs). Técnicas básicas em biologia molecular. 2ª Edição, Brasília, Editora **Universidade de Brasília**. p. 215-230.
- Maranhão, A. Q; Moraes, L. M. P. 2016. Extração e purificação de DNA. De-Souza, M. T; Brígido, M. M; Maranhão, A. Q. (Orgs). Técnicas básicas em biologia molecular. 2ª Edição, Brasília, Editora **Universidade de Brasília**. p. 55-85.

- Marteinsson, V. T.; Hauksdottir, S.; Hobel, C. F.; Kristmannsdottir, H.; Hreggvidsson, G. O.; Kristjansson, J. K. 2001. Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:4242–4248.
- Marteinsson, V. T.; Kristjansson, J. K.; Kristmannsdottir, H.; Dahlkvist, M.; Saemundsson, K.; Hannington, M.; Pétursdóttir, S. K.; Geptner, A.; Stoffers, P. 2001. Discovery and description of giant submarine smectite cones on the seafloor in Eyjafjördur, northern Iceland, and a novel thermal microbial habitat. ***Applied Environmental Microbiology***, 67:827–833.
- Mathrani, I. M.; Boone, D. R.; Mah, R. A.; Fox, G. E.; Lau, P. P. 1988. *Methanohalophilus zhilinae* sp. nov., and Alkaliphilic, Halophilic, Methylotrophic Methanogen. ***International Journal of Systematics Bacteriology***, 38(2):139-142.
- McDonald, D.; Price, M.N.; Goodrich, J.; Nawrocki, E.P.; Todd Z DeSantis, T.Z.; Probst, A.; Andersen, G.L.; Knight, R.; Hugenholtz, P. 2012. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. ***The ISME Journal***, 6:610–618.
- Meng, J.; Xu, J.; Qin, D.; He, Y.; Xiao, X.; Wang, F. 2014. Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses. ***The ISME Journal***, 8:650-659.
- Mirmohammadsadeghi, H; Abedi, D; Mohmoudpour, H. R; Akbari, V; 2013. Comparison of five methods for extraction of genomic DNA from a marine Archaea, *Pyrococcus furiosus*. ***Pakistan Journal of Medical Science***, 29(1):390-394.
- Muller, F.; Brissac, T.; Le Bris, N.; Felbeck, H.; Gros, O. 2010. First description of giant Archaea (Thaumarchaeota) associated with putative bacterial ectosymbionts in a sulfidic marine habitat. ***Environmental Microbiology***, 12(8):2371-2383.
- Munson-McGee, J. H.; Field, E. K.; Bateson, M.; Rooney, C.; Stepanauskas, R.; Young, M. J. 2015. *Nanoarchaeota*, their *Sulfolobales* host, and *Nanoarchaeota* virus distribution across Yellowstone National Park hot springs. ***Applied Environmental Microbiology***, 81:7860–7868.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. 2011. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5ª Edição. São Paulo, Editora Artmed.
- Nicol, G. W.; Leininger, S.; Schleper, C.; Prosser, J. I. 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. ***Environmental Microbiology***, 10(11):2966-2978.
- Nozhevnikova, A. N; Chudina, V. I. 1985. Morphology of the thermophilic acetate methane-producing bacterium *Methanotherix themtoacetophila* sp. nov. ***Microbiology***, 53:618-624.
- Nunoura, T.; Takaki, Y.; Kakuta, J.; Nishi, S.; Sugahara, J.; Kazama, H.; Chee, G.J.; Hattori, M.; Kanai, A.; Atomi, H.; Takai, K.; Takami, H. 2011. Insights into the

- evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. **Nucleic Acids Research**, 39(8):3204-3223.
- Ochsenreiter, T.; Selezi, D.; Quaiser, A.; Bonch-Osmolovskaya, L.; Schleper, C. 2003. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. **Environmental Microbiology**, 5(9):787-797.
- Offre, P.; Spang, A.; Schleper, C. 2013. Archaea in Biogeochemical Cycles. **Annual Review of Microbiology**, 67:437-457.
- Oline, D.K.; Schmidt, S.K.; Grant, M.C. 2006. Biogeography and landscape-scale diversity of the dominant Crenarchaeota of soil. **Microbial Ecology**, 52:480–490.
- Oparin, A. I. The Origen of Life. New York: macmillan (1938). Park, B.J.; Park, S.J.; Yoon, D.N.; Schouten, S.; Sinninghe, J.S.; Rhee, S.K. 2010. Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing Archaea from marine sediments in co-culture with sulfur-oxidizing-bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 76(22):7575-7587.
- Parkes RJ, Webster G, Cragg BA, Weightman AJ, Newberry CJ, Ferdelman TG et al. 2005. Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time. **Nature**, 436:390–394.
- Peng, C.; Jiang, H.; Huang, L.; Hou, W.; Yang, J.; Wang, S.; Huang, Q.; Deng, S.; Dong, H. 2013. Abundance and Diversity of Ammonia-Oxidizing Bacteria and Archaea in Cold Springs on the Qinghai-Tibet Plateau. **Geomicrobiology Journal**, 30(6):530-539.
- Peplies, J; Kottmann, R.; Ludwig, W.; Glockner, F. O. 2008. A standard operating procedure for phylogenetic inference (SOPPI) using (rRNA) marker genes. **Systematic and Applied Microbiology**, 31:251–257.
- Pester, M.; Schleper, C.; Wagner, M. 2011. The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. **Current Opinion in Microbiology**, 14(3):300-306.
- Pester, M.; Rattei, T.; Flechl, S.; Gröngröft, A.; Richter, A.; Overmann, J.; Reinhold-Hurek, B.; Loy, A.; Wagner, M. 2012. *amoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions. **Environmental Microbiology**, 14(2):525-539.
- Podar M, Makarova, K. S.; Grahan, D. E.; Wolf, Y, I.; Koonin, E, V.;Reysenbach, A. L. 2013. Insights into archaeal evolution and symbiosis from the genomes of a nanoarchaeon and its inferred crenarchaeal host from Obsidian Pool, Yellowstone National Park. **Biology Direct**, (8), 9:1-20.
- Preston, C. M.; Wu, K. Y.; Molinskit, T. F.; Delong, E. F. 1996. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 93:6241-6246.

- Pruesse, E.; Quast, C.; Knittel, K.; Fuchs, B. M.; Ludwig, W.; Peplies, J.; Glöckner, F. O.; 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic Acids Research**, 35:7188–7196.
- Reigstad, L. J.; Jorgensen, S. L.; Schleper, C. 2010. Diversity and abundance of Korarchaeota in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka. **The ISME Journal** 4:346–356.
- Ribeiro, H. R. 2015. Cultivo e Filogenia Molecular de *Archaea* a partir de Amostras de Aquário de Água Doce. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular Departamento de Biologia Celular, **Universidade de Brasília**.
- Rinke, C.; Schwientek, P.; Sczyrba, A.; Ivanova, N. N.; Anderson, I. J.; Cheng, J. F.; Darling, A.; Malfatti, S.; Swan, B. K.; Gies, E. A.; Dodsworth, J. A.; Hedlund, B. P.; Tsiamis, G.; Sievert, S. F.; Liu, W.; Eisen, J. A.; Haliyam, S. F.; Kyrpider, N. C.; Stepanauskas, R.; Rubin, E. R.; Hugenholtz, P.; Woyke, T. 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. **Nature**, 499 (7459):431-437.
- Rodrigues, T.; Catão, E.; Bustamante, M. C.; Quirino, B. F.; Krüger, R. K.; Kyaw, C. M. 2014. Seasonal effects in a lake sediment archaeal community of the Brazilian savanna. **Archaea**, 2014:957145.
- Rogers, K. L & Amend, J. P. 2005. Archaeal diversity and geochemical energy yields in a geothermal well on Vulcano Island, Italy. **Geobiology** 3:319–332.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4(4):406-425.
- Sakai, S.; Imachi, H.; Hanada, S.; Ohashi, A.; Harada, H.; Kamagata, Y. 2008. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage ‘Rice Cluster I’, and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 58:929–936.
- Sauder, L.A.; Engel, K.; Stearns, J.C.; Masella, A.P.; Pawliszyn, R.; Neufeld, J.D. 2011. Aquarium Nitrification Revisited: Thaumarchaeota are the Dominant Ammonia Oxidizers in Freshwater Aquarium Biofilters. **PLoS One**, 6(8):1-9.
- Silbaq, F. S. 2009. Viable ultramicrocells in drinking water. **Journal of Applied Microbiology**, 106:106–17.
- Simon, H.M.; Jahn, C.E.; Bergerud, L.T.; Sligerud, K.; Weimer, P.J.; Willis, D.K. 2005. Cultivation of Mesophilic Soil Crenarchaeotes in Enrichment Cultures from Plant Roots. **Applied and Environmental Microbiology**, 71(8):4751-4760.
- Schloss, P. D.; Westcott, S. L.; Ryabin, T.; Hall, J. R.; Hartmann, M.; Hollister, E. B.; Lesniewski, R. A.; Oakley, B. B.; Parks, D. H.; Robinson, C. J.; Sahl, J. W.; Stres,

- B.; Thallinger, G. G.; Van Horn, D. J.; Weber, C. F. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, 75(23):7537-7541.
- Sowers, K. R.; Baron, S. F.; Ferry, J. G. 1984. Methanosarcina acetivorans sp. nov., an Acetotrophic Methane-Producing Bacterium Isolated from Marine Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**. 47(5): 971-978.
- Spang, A.; Poehlein, A.; Offre, P.; Zumbrägel, S.; Haider, S.; Rychlik, N.; Nowka, B.; Schmeisser, C.; Lebedeva, E. V.; Rattei, T.; Böhm, C.; Schmid, M.; Galushko, A.; Hatzenpichler, R.; Weinmaier, T.; Daniel, R.; Schleper, C.; Spieck, E.; Streit, W.; Wagner, M. 2012. The genome of the ammonia-oxidizing Candidatus Nitrososphaera gargensis: insights into metabolic versatility and environmental adaptations. **Environmental Microbiology**, 14(12):3122-3145.
- Spang, A.; Saw, J. H.; Jørgensen, S. L.; Zaremba-Niedzwiedzka, K. ; Martijn, J. ; Lind, A. E.; Eijk, R. V.; Schleper, C.; Guy, L.; Ettema, T. J.G. 2015. Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. **Nature**. 521(7551):173–179.
- Spang, A.; Caceres, E. F.; Ettema, T. J. G. 2017. Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. **Science**, (357):563-574.
- Staley, J.T. & Konopka, A. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annual Reviews of Microbiology**, 39:321-346.
- Stempfhuber, B.; Engel, M.; Fischer D.; Nesjovic-Prit, G.; Wubet, T.; Schöning, I.; Gubry-Rangin, C.; Kublik, S.; Schloter-Hai, B.; Rattei, T.; Welzl, G.; Nicol, G.W.; Schrumpf, M.; Buscot, F.; Prosser, J.I.; Schloter, M. 2014. PH as a driver for ammonia-oxidizing archaea in forest soils. **Soil Microbiology**, 69(4):879-883.
- Stieglmeier, M.; Klingl, A.; Alves, R. J. E.; Rittmann, S. K. R.; Melcher, M.; Leisch, N.; Schleper, C. 2014. *Nitrososphaera viennensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum *Thaumarchaeota*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 64:2738-2752.
- Stryjewski, M. E; LiPuma, J. J; Messier, R. H. Jr.; Reller, L. B; Alexander, B. D. 2003. Sepsis, multiple organ failure, and death due to *Pandoraea pnomenusa* infection after lung transplantation. **Journal of Clinical Microbiology**, 41:2255–2257.
- Swanson, C. A.; Sliwinski, M. K. 2013. One-dimensional TRFLP-SSCP is an effective DNA fingerprinting strategy for soil Archaea that is able to simultaneously differentiate broad taxonomic clades based on terminal fragment length polymorphisms and closely related sequences based on single stranded conformation polymorphisms. **Journal of Microbiological Methods**, 94(3):317-324.

- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analyses using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28:2731-2739.
- Teske, A.; Hinrichs, K. U.; Edgcomb, V.; Gomez, A. V.; Kysela, D.; Sylva, S. P.; Sogin, M. L.; Jannasch, H. W. 2002. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. **Applied Environmental Microbiology**, 68:1994–2007.
- Teske, A. 2006. Microbial communities of deep marine subsurface sediments: molecular and cultivation surveys. **Geomicrobiol Journal**, 23:357–368.
- Teske, A. & Sorensen, K. B. 2008. Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? **The ISME Journal**, 2:3–18.
- Timonen, S. & Bomberg, M. 2009. Archaea in dry soil environments. **Phytochemistry Reviews**, 8(3):505-518.
- Tourna, M.; Freitag, T. E.; Nicol, G. W.; Prosser, J. I. 2010. Stable isotope probing analysis of interactions between ammonia oxidizers. **Applied and Environmental Microbiology** 76:2468-2477.
- Tourna, M.; Stieglmeier, M.; Spang, A.; Könneke, M.; Schintlmeister, A.; Urich, T.; Engel, M.; Scloter, M.; Wagner, M.; Richter, A.; Schleper, C. 2011. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 108(20):8420-8425.
- Tripathi, B. M.; Kim, M.; Lai-Hoe, A.; Rahim, R. A.; Go, R.; Adams, J. M.; 2013. pH dominates variation in tropical soil archaeal diversity and community structure. **FEMS Microbiology Ecology**, 86:303–11.
- Urakawa, H.; Tajima, Y.; Numata, Y.; Tsuneda, S. 2008. Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems. **Applied and Environmental Microbiology**, 74(3):894-900.
- Vissers, E. W.; Bodelier, P. L. E.; Muyzer, G.; Laanbroek, H. J. 2009. A nested PCR approach for improved recovery of archaeal 16S rRNA gene fragments from freshwater samples. **FEMS Microbiology Letters**, 298(2):193-198.
- Walker, C. B.; De La Torre, J.R.; Klotz, M.G.; Urakawa, H.; Pinel, N.; Arp, D.J.; Brochier-Armanet, C.; Chain, P.S.G.; Chan, P.P.; Gollabgir, A.; Hemp, J.; Hügler, M.; Karr, E.A.; Könneke, M.; Shin, M.; Lawton, T.J.; Lowe, T.J.; Martens-Habbena, W.; Sayavedra-Soto, L.A.; Lang, D.; Sievert, S.M.; Rosenzweig, A.C.; Manning, G.; Stahl, D.A. 2010. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 107(19):8818-8823.

- Ward, D. M.; Bateson, M. M.; Weller, R.; Ruff-Roberts, A. L. 1992. **Advances in Microbial Ecology**, 12:219-286.
- Waters, E.; Hohn, M. J.; Ahel, I.; Grahan, D.E.; ADAMS, M. D.; Barnstead, M.; Beeson, K. Y.; Bibbs, L.; Bolanos, R.; Keller, M.; Kretz, K.; Lin, X.; Mathur, E.; Ni, J.; Podar, M.; Richardson, T.; Sutton, G. G.; Simon, M.; So, D.; Stetter, K. O.; Short, J. M., Noordewier, M. 2003. The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 100,12984–12988.
- Watve, M.; Shejval, V.; Sonawane, C.; Rahalkar, M.; Matapurkar, A.; Shouche, Y.; Patole, M.; Phadnis, N.; Champhenkar, A.; Damle, K.; Karandikar, S.; Kshirsagar, V.; Jog, M. 2000. The 'K' selected oligophilic bacteria; a key to uncultured diversity? **Current Science**, 78:1535-1542.
- Weber, E.B.; Lehtovirta-Morley, L.E.; Prosser, J.I.; Gubry-Rangin, C. 2015. Ammonia oxidation is not required for growth of Group 1.1c soil Thaumarchaeota. **FEMS Microbiology Ecology**, 91(3):1-7.
- Weidler, G. W.; Dornmayr-Pfaffenhuemer, M.; Gerbl, F. W.; Heinen, W.; Stan-Lotter, H. 2007. Communities of archaea and bacteria in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Central Alps, and evidence of ammonia-oxidizing Crenarchaeota. **Applied and Environmental Microbiology**, 73(1):259-270.
- Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, 173(2): 697-703.
- Whitehead, T.R.; Cotta, M.A.; 1999. Phylogenetic diversity of methanogenic archaea in swine waste storage pits. **FEMS Microbiology Letters**, 179:223-226.
- Woese, C. R.; Fox, G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 74(11):5088-5090.
- Woese, C. R.; Magrum, L. J.; Fox, G. E. 1978. Archaeobacteria. **Journal of Molecular Evolution**, 11(3):245-251.
- Woese, C. R.; Kandler, O.; Wheelis, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, 87:4576-4579.
- Wuchter, C.; Abbas, B.; Coolen, M. J. L.; Herfort, L.; van Bleijswijk, J.; Timmers, P.; Strous, M.; Teira, E.; Herndl, G. J.; Middelburg, J. J.; Schouten, S.; Damsté, J. S. S. 2006. Archaeal nitrification in the ocean. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, 103(33):12317-12322.
- Xiang, X.; Wang, R.; Wang, H.; Gong, L.; Man, B.; Xu, Y. 2017. Distribution of Bathyarchaeota Communities Across Different Terrestrial Settings and Their Potential Ecological Functions. **Scientific Reports**, 7:45028.

- Ying, J. Y.; Zhang, L. M.; He, J. Z. 2010. Putative ammonia-oxidizing bacteria and archaea in an acidic red soil with different land utilization patterns. **Environmental Microbiology Reports**, 2(2):304-312.
- Zaremba-Niedzwiedzka, K.; Careses, E. F.; Saw, J. H.; Bäckström, D.; Juzokaite, L.; Vancaester, E.; Seitz, K. W.; Anantharaman, K.; Starnawski, P.; Kjeldsen, K. U.; Stott, M. B.; Nunoura, T.; Banfield, J. F.; Schramm, A.; Baker, B. J.; Spang, A.; Ettema, T.G. 2017. Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. **Nature**, 541:353–358.
- Zeng, J.; Zhao, D.; Yu, Z.; Huang, R.; Wu, Q.L. 2014. Temperature responses of ammonia-oxidizing prokaryotes in freshwater sediment microcosms. **PLoS One**, 9(6):1-8.