



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estratificação vertical das comunidades microbianas
da zona mesopelágica, no Atlântico Norte
(38°64.90N, 28°31.45W), determinada por
pirosequenciação do 16S DNAr

Luísa dos Prazeres da Silva Lopes

2011



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estratificação vertical das comunidades microbianas da zona mesopelágica, no Atlântico Norte (38°64.90N, 28°31.45W), determinada por pirosequenciação do 16S DNAr

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor António Veríssimo (Universidade de Coimbra)

Luísa dos Prazeres da Silva Lopes

2011

AGRADECIMENTOS

Antes de mais gostaria de agradecer à EMEPC - Estrutura de Missão para a Extensão da Plataforma Continental, por possibilitar a recolha das amostras e permitir a sua utilização.

Ao Professor Doutor Milton Simões da Costa, a possibilidade de realizar o meu trabalho de mestrado no Laboratório de Microbiologia.

Ao meu orientador, Professor Doutor António Veríssimo, agradeço o facto de me ter aceiteado como estagiária e por me ter proporcionado a realização do presente trabalho. Agradeço, também, todas as suas indicações sábias que muito contribuíram para a realização desta tese.

Um agradecimento especial ao Doutor Igor por todo o seu apoio e desmedida confiança demonstrados durante o meu trabalho de mestrado. Não posso deixar de agradecer toda a sua paciência e ensinamentos que foram cruciais para a realização do mesmo. O meu sincero obrigado!

Toda a satisfação e prazer que obtive durante o meu trabalho de mestrado não teriam sido os mesmos se não me sentisse rodeada de pessoas tão especiais! Um agradecimento muito especial à Filipa, à Susana e à Tânia.

Quero também deixar os meus agradecimentos às minhas amigas de sempre, que me acompanham desde que comecei o curso de Biologia, há já 6 anos. Daniela, Liliana, Maria, Michéle e à Susana. O meu sincero agradecimento pelo ânimo partilhado, pelas

ideias trocadas, pelo esforço conjugado e, especialmente, pelo espírito de amizade durante os anos de trabalho em conjunto.

Finalmente, quero agradecer aos meus pais, Rui e Luísa, e aos meus irmãos. Toda a minha essência resulta de vós, da vossa presença, ensinamentos e carinho. Obrigada pai e mãe por nos deixarem, a mim e aos meus irmãos, crescer e escolher os nossos caminhos sempre cuidando mas nunca interpondo. Realizo o quanto se preocupam e o quanto zelam para que tudo nos corra bem!! Sei que sou a filha e irmã mais sortuda do mundo! ADORO-VOS

RESUMO

Pretendeu-se determinar e comparar a diversidade microbiana num ambiente marinho de alto mar a diferentes profundidades, na zona mesopelágica, no Atlântico Norte mais propriamente num *spot* com as coordenadas (38°64.90N, 28°31.45W). Para tal, foram recolhidas amostras de água do mar a três diferentes profundidades na zona mesopelágica (255m, 532m e 809m). A diversidade microbiana presente nas diferentes amostras foi determinada por análise das sequências do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal - gene 16S RNAr dos domínios *Bacteria* e *Archaea* obtidas por pirosequenciação. A diversidade microbiana foi também comparada nas diferentes amostras através de análise visual por DGGE.

A presença dos genes *cbbL* e *cbbM* que codificam a forma I e II de RubisCO, respectivamente, enzima “chave” da via de fixação de CO₂ do ciclo de Calvin- Benson-Bassham (CBB), foi também determinada nas amostras recolhidas a diferentes profundidades.

As populações que parecem constituir a esmagadora maioria da comunidade bacteriana na zona mesopelágica estudada estavam filogeneticamente afiliadas com a Classe *Alphaproteobacteria*, muito frequentes em ecossistemas marinhos, nomeadamente bactérias pertencentes ao grupo geralmente designado por *Roseobacter* que incluem, entre outras, as bactérias da família *Rhodobacteraceae*. E mais, a análise por pirosequenciação mostrou estratificação vertical atendendo aos resultados verificados para as OTUs: 1, 2, 3, 6, 8, e 10 que compreendiam os géneros *Sulfitobacter*, *Hyphomonas*, *Erythrobacter*. Em relação ao Domínio *Archaea*, a análise por pirosequenciação mostrou que a maioria das populações estavam filogeneticamente afiliadas com o Filo *Euryarchaeota*.

Em toda a zona mesopelágica apenas as sequências que codificam a forma I de RubisCO foram detectadas, formando um cluster com vários “phylotypes” muito similares.

Pelos resultados obtidos, foi possível concluir que a zona mesopelágica, de facto, não será seguramente a zona oceânica onde a produção primária, terá a relevância fundamental na sustentabilidade dos ecossistemas marinhos. Tudo parece indicar que nesta zona existem populações microbianas diversas que asseguram funções diversificadas no ecossistema.

Palavras-chave: Zona mesopelágica, diversidade microbiana, DGGE, pirosequenciação, RubisCO, ciclo de Calvin-Benson-Bassham, gene *cbbL*

ABSTRACT

The main goal of this work was to determine and compare the microbial diversity in a marine environment of the high sea at different depths in the mesopelagic zone in the North Atlantic in a spot with the following coordinates 38°64.90N, 28°31.45W. For this purpose, water samples were collected at different depths in the mesopelagic zone (255m, 532m and 809m). The microbial diversity present in the different samples was determined by analyzing the sequences of the gene that encodes the 16S subunit ribosomal RNA of *Bacteria* and *Archaea* domains obtained. This process was done by pyrosequencing. The microbial diversity was also compared in different samples through visual analysis by DGGE.

The presence of genes *cbbL* and *cbbM* that encode form I and II of RubisCO, respectively, the enzyme key of CO₂ fixation via cycle Calvin- Benson- Bassham (CBB), were also determined in samples collected. The populations that seem to constitute the majority of the bacterial community in the mesopelagic zone are phylogenetically affiliated with the class *Alphaproteobacteria*. This class is very common in marine ecosystems, including bacteria belonging to the group commonly known as *Roseobacter* that include, among others, the bacteria of family *Rhodobacteraceae*. Moreover, the pyrosequencing analysis showed vertical stratification as the results recorded for the OTUs 1, 2, 3, 6, 8, and 10 which included genera *Sulfitobacter*, *Hyphomonas* and *Erythrobacter*. In relation to the *Archaea* Domain, the pyrosequencing analysis showed that most populations were phylogenetically affiliated to the Phylum *Euryarchaeota*.

On the other hand, in the mesopelagic zone was only discovered sequences of the form I RubisCO that formed a very similar cluster on the phylotypes level.

From the results, it was concluded that the mesopelagic zone, is, not the zone where the primary production, will be crucial relevance in the sustainability of marine ecosystems. Microbial populations from this area seems to be able to provide several functions vital to the ecosystem.

Keywords: mesopelagic zone, microbial diversity, DGGE, pyrosequencing, RubisCO, Calvin- Benson- Bassham cycle, *cbbL* gene

ÍNDICE

ABREVIATURAS	xiii
1.INTRODUÇÃO	1
1.1.Ambientes marinhos.....	3
1.1.1.Regões e profundidades do oceano.....	3
1.1.1.1.Zona mesopelágica	4
1.2. Estudo da diversidade microbiana - as metodologias independentes de cultivo 5	
1.2.1. <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> - DGGE como ferramenta para o estudo da diversidade microbiana.....	6
1.2.2. A aplicação da pirosequenciação ao estudo da diversidade microbiana marinha7	
1.3.Fixação autotrófica de CO₂.....	9
1.3.1. Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (RubisCO).....	10
1.3.2. Outras vias autotróficas de fixação de carbono	12
1.4. Local de estudo	13
1.5. Objectivos	14
2.MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1.Origem das amostras.....	19
2.2.Concentração das amostras	19
2.3 Extracção de DNA das amostras ambientais	20
2.4. Amplificação do gene 16S RNAr de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> através da reacção de polimerização em cadeia - PCR.....	20
2.4.1. Solução de desoxiribonucleótidos trifosfato – dNTP's	22
2.5. Visualização dos produtos de amplificação por electroforese	22
2.5.1. Gel de agarose 1%	22
2.5.1.1. Solução TAE (1x)	23
2.5.1.1.1. Solução <i>stock</i> TAE (50x)	23

2.5.1.2. Solução de brometo de etídeo (5mg/mL).....	24
2.6. Análise por DGGE.....	24
2.6.1. Amplificação parcial do gene 16S RNAr de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> para DGGE	24
2.6.2. <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> (DGGE).....	26
2.6.2.1. Solução de Persulfato de amónio 10%	27
2.6.3. Análise estatística da análise de DGGE.....	28
2.7. Análise da diversidade microbiana por Pirosequenciação	28
2.7.1. Análise por <i>Massively parallel bTEFAP</i> e <i>aTEFAP titanium</i>	28
2.7.2. Tratamento de dados obtidos por pirosequenciação e posterior análise filogenética.....	29
2.7.3. Análise estatística dos resultados obtidos por pirosequenciação	30
2.8. Amplificação parcial dos genes <i>cbbL</i> e <i>cbbM</i>	31
2.9. Purificação dos produtos amplificados.....	32
2.10. Clonagem dos <i>amplicons</i> parciais do gene <i>cbbL</i> de RubisCO	33
2.10.1. Ligação dos <i>amplicons</i> ao vector de clonagem pCR-2.1- TOPO (Invitrogen)33	
2.10.2. Transformação <i>E. coli</i> TOPO 10 (Invitrogen)	35
2.10.2.1. Solução de X-Gal.....	35
2.10.2.2. Solução de IPTG 0,1M	36
2.10.2.2.1. Solução de IPTG 1 M.....	36
2.10.3. Meio líquido LB (Luria- Bertani)	36
2.10.4. Meio sólido LB com ampicilina	37
2.10.4.1. Solução de ampicilina 100mg/L	37
2.10.5. Preparação das suspensões celulares	38
2.11. Análise filogenética	38
3.RESULTADOS	41
3.1. Análise por DGGE.....	43
3.1.1. Análise estatística dos resultados de DGGE.....	44

3.2. Análise da diversidade microbiana por Pirosequenciação	44
3.2.1. Determinação das Unidades Taxonómicas Operacionais - OTUs a partir das seqüências obtidas por Pirosequenciação	44
3.2.2 Classificação taxonómica das OTUs determinadas para o Domínio Bacteria nas diferentes amostras	52
3.2.3. Classificação taxonómica das OTUs determinadas para o Domínio Archaea nas diferentes amostras	61
3.2.4. Análise estatística dos resultados obtidos por pirosequenciação	67
3.3. Ciclo Calvin- Benson- Bassham (ciclo CBB).....	69
4.DISSCUSSÃO E CONCLUSÕES FINAIS	71
4.1. Análise dos resultados obtidos por DGGE e pirosequenciação dos Domínios Bacteria e Archaea	73
4.2. Fixação autotrófica de carbono - Ciclo de Calvin- Benson- Bassham.....	76
4.3. Conclusões Finais.....	77
5.BIBLIOGRAFIA	79

ABREVIATURAS

3-HP	ciclo 3-hidroxiopropionate
3-HP/4-HB	ciclo 3- hidroxiopropionato/4-hidroxi butirato
ACCase	enzima acetil CoA carboxilase
<i>accC</i>	gene codifica a subunidade da biotina carboxilase
<i>acl</i>	gene da ATP citrato liase
aTEFAP	archaeal tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing
bTEFAP	bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing
CBB	ciclo de Calvin-Benson-Bassham
<i>cbbL</i>	gene que codifica a forma I de RubisCO
<i>cbbM</i>	gene que codifica a forma II de RubisCO
dATP	Desoxiadenina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
ddNTPs	Didesoxinucleotidos trifosfato
DGGE	Denaturing Gel Gradient Electrophoresis
dGTP	Desoxiguanina trifosfato
dTTP	Desoxitimina trifosfato
DNA	desoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
H'	índice de Shannon-Weaver
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria Bertani
m	metros
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
<i>nif</i>	gene que codifica piruvato: ferredoxina oxidoreductase forma nif

<i>oor</i>	gene da 2-oxoglutarate: ferredoxina oxidoreductase
OTUs	unidades taxonómicas operacionais
p.b.	Pares de bases
PCR	Polimerase Chain Reaction
<i>Por</i>	gene da piruvato: ferredoxina oxidoreductase
QS	índice de similaridade de Sørensen's
RDP	Ribosomal Database Project II
RLP	“RubisCO-like-protein”
ROV	remotely operated vehicle
rpm	rotações por minuto
rTCA	ciclo do ácido tricarboxílico redutor
RubisCO	enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase
RNAr	Ácido ribonucleico ribossómico
RNAr 16S	Subunidade 16S do ácido ribonucleico ribossómico
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
X-Gal	Bromo-cloro-indolil-galactopiranosideo

1.INTRODUÇÃO

1.1.Ambientes marinhos

Os ambientes marinhos são, sem dúvida, os maiores *habitats* na Terra, com oceanos que cobrem cerca de 70% da superfície do planeta. São extremamente diversos, com elevado teor de salinidade e grandes variações na pressão e temperatura (Kennedy *et al.*, 2010). Quando analisadas colunas de água compostas por diferentes profundidades, verifica-se que nas águas mais à superfície a intensidade da luz é maior, assim como a temperatura e concentração de nutrientes. A profundidades maiores, a temperatura é mais baixa, a pressão hidrostática é crescente, a luz vai diminuindo e há diferentes factores geoquímicos. Estas diferentes condições resultantes da variação de muitos factores abióticos, sem dúvida, que deverão influenciar a composição, distribuição e nível de abundância das comunidades microbianas, ao longo da profundidade (DeLong *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2010).

1.1.1.Regões e profundidades do oceano

Os oceanógrafos dividem o oceano verticalmente e horizontalmente em regiões dependendo das características físicas e biológicas dessas áreas. No meio oceânico, a luz solar consegue penetrar a água até aproximadamente aos 200 metros (Galand *et al.*, 2010) enquanto que a profundidades maiores, não há praticamente luz. Em relação à profundidade é usual distinguir no oceano várias zonas. A zona iluminada do mar denomina-se de região fótica e a zona escura de região afótica. Há, ainda a zona disfótica que se caracteriza por má luz, embora alguma luz ainda penetre, mas não o suficiente para a realização da fotossíntese. A zona fótica cobre os oceanos a partir do nível da superfície a 200 metros de profundidade e compreende a zona epipelágica. Esta é a região onde a fotossíntese ocorre (Galand *et al.*, 2010). A região disfótica compreende a zona mesopelágica (vai dos 200m aos 1000m de profundidade) e a

INTRODUÇÃO

afótica compreende as zonas: batipelágica (dos 1000m aos 3000m de profundidade), a abisopelágica ou abisal (dos 3000m aos 6000m) e finalmente a zona hadopelágica ou hadal com mais de 6000m de profundidade (Barange *et al.*, 2010; Galand *et al.*, 2010).

Geralmente nos oceanos distinguem-se duas regiões em relação à distância à costa: região nerítica e região oceânica. A primeira estende-se desde a zona das marés até ao fim da plataforma continental. A região oceânica, por sua vez, é a região mais afastada da costa, em alto mar, fora do limite da plataforma continental (Barange *et al.*, 2010) (Figura 1).

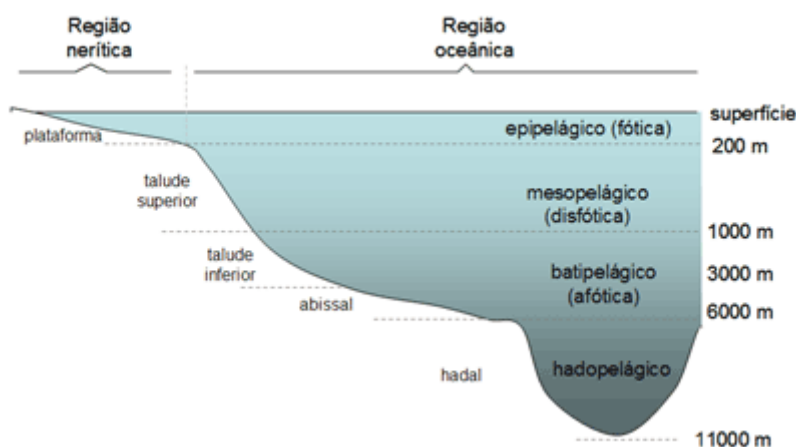


Figura 1- Esquema representativo das diferentes zonas e regiões que constituem os oceanos adaptado de http://www.geoprof.org/mar_prof.php

1.1.1.1.Zona mesopelágica

Os microrganismos dominam o oceano em termos de abundância, diversidade e actividade metabólica, tendo um papel essencial no funcionamento do ecossistema (Galand *et al.*, 2010). Estas comunidades têm sido extensivamente estudadas na zona epipelágica, que é a zona onde ocorre a fotossíntese, sendo dominadas por populações de *Cyanobacteria*. Porém, existem zonas onde as comunidades microbianas ainda são

pouco conhecidas, como o caso da zona mesopelágica. Esta zona situa-se entre as profundidades de 200 a 1000m e caracteriza-se por apresentar pouca ou nenhuma luminosidade (não sendo suficiente para a realização da fotossíntese) e uma grande variedade de factores, tais como baixas temperaturas, níveis baixos de oxigénio, altos níveis de nutrientes inorgânicos e salinidade constante (Eloe *et al.*, 2011; Galand *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 2010). Apesar de tudo, estudos sobre diversidade microbiana na zona oceânica entre os 200m e os 1000m são mais escassos. Assim, estudos que permitam recolher grandes quantidades de informação capazes de caracterizar a estrutura das populações existentes na zona mesopelágica são importantes para contribuir para uma visão mais alargada da importância desta zona no contexto amplo da ecologia dos oceanos. Metodologias recentes, como a pirosequenciação podem constituir bons instrumentos para recolha de informação que permita, pouco a pouco, ajudar a formar uma visão mais abrangente sobre constituição e a importância das comunidades microbianas no balanço global dos ecossistemas oceânicos. Um dos desafios, quiçá, mais interessantes na reconstituição deste gigantesco “puzzle“, será, com certeza, compreender de que modo as comunidades microbianas são influenciadas pela variação da profundidade, ou melhor por todos os factores que tal variação implica.

1.2. Estudo da diversidade microbiana - as metodologias independentes de cultivo

Ao realizar o estudo da diversidade microbiana num dado ambiente algumas questões são colocadas: quantas espécies existem realmente, que métodos serão aplicados e se os resultados por eles obtidos reflectem a “verdadeira ” diversidade microbiana do ambiente? O uso de metodologias independentes de cultivo, aplicadas para estudos microbianos ambientais, tem revelado uma diversidade microbiana não detectada

INTRODUÇÃO

anteriormente e têm sido utilizadas para a determinação da diversidade microbiana em ambientes marinhos (Qian *et al.*, 2010; Galand *et al.*, 2009; Sogin *et al.*, 2006).

A utilização deste tipo de metodologias é especialmente aconselhável quando os estudos microbianos são realizados em ambientes extremos ou em ambientes com características físico-químicas pouco usuais, onde as metodologias de cultivo muitas vezes não recuperam a maioria da diversidade existente. Ambientes marinhos são, sem dúvida, desses tipos de ambientes (Donachie *et al.*, 2007, Hugenholtz. P, 2002, Pedrós-Alió. C, 2006).

No entanto, a utilização de tais metodologias comporta certos compromissos que têm de estar bem presentes quando se analisam os resultados. A maioria das metodologias independentes de cultivo depende de protocolos da extracção de DNA total da amostra a estudar, que pode em muito influenciar a quantidade, qualidade do DNA e posteriormente influenciar a determinação da diversidade presente no ambiente. Tais metodologias, também são dependentes da reacção de “Polimerase Chain Reaction”-PCR que depende directamente da especificidade das enzimas polimerase e/ou dos *set* de primers usados e/ou das condições de amplificação que poderão influenciar a diversidade microbiana detectada no ambiente (Acinas *et al.*, 2005; Donachie *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2009).

1.2.1. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE como ferramenta para o estudo da diversidade microbiana

Os métodos moleculares são ferramentas importantes para estudar a estrutura e a diversidade microbiana em amostras ambientais e os estudos independentes de cultivo, baseados na determinação das sequências do gene 16S RNAr têm expandido muito o conhecimento da diversidade filogenética dos microrganismos (Yeung *et al.*, 2010). Em

particular a “*Denaturing Gradient Electrophoresis*”- DGGE tem sido utilizada para analisar e comparar a estrutura de comunidades microbianas. É um método amplamente utilizado para a avaliação rápida da diversidade de espécies microbianas dominantes, possibilitando a posterior identificação das populações por meio de sequenciação das bandas obtidas (Muyzer. 1993; Yeung *et al.*, 2010). A análise simultânea de várias amostras bem como o estudo da dinâmica de populações específicas em função das variações ambientais, fazem do DGGE um dos métodos muito usado em vários estudos, frequentemente, em ambientes marinhos (Muyzer, 1993; DeLong *et al.*, 2006; Pedrós-Alió. C, 2006; Yeung *et al.*, 2010).

1.2.2. A aplicação da pirosequenciação ao estudo da diversidade microbiana marinha

Nos últimos anos, a microbiologia ambiental tem incorporado técnicas baseadas na análise de fragmentos genómicos de microrganismos do ambiente utilizando técnicas independentes de cultivo, nomeadamente na determinação e análise da sequência do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal – gene 16S RNAr. Delas, a pirosequenciação (metodologia de sequenciação geradora de enorme quantidade de informação), é considerada a tecnologia do futuro para o estudo mais detalhado da diversidade de comunidades microbianas (Sogin *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2010). A tecnologia de pirosequenciação tem sido aplicada no estudo de vários ambientes para a determinação das comunidades microbianas, uma vez que numa só reacção é gerado um elevado número de sequências e conseqüentemente, de informação sobre a amostra em estudo. Assim, é gerada uma massiva quantidade de informação num curto espaço de tempo e a custos inferiores aos métodos de sequenciação tradicionais, nomeadamente os que incluem a construção de livrarias genómicas (Qian *et al.*, 2010; Shendure *et al.*,

INTRODUÇÃO

2008; Kennedy *et al.*, 2010). Esta técnica, precisamente pelo elevado conjunto de informação que gera directamente do DNA contido na amostra, possui também, a capacidade para revelar *taxa* raros, apresentando assim, uma maior sensibilidade do que o tradicional método de clonagem (Rothberg & Leamon, 2008).

A aplicação da técnica de pirosequenciação do gene 16S RNAr tem sido reportada em vários estudos que pretendem verificar a diversidade microbiana nas águas do mar profundo. Exemplo disso, é um estudo realizado no oceano Pacífico (Brown *et al.*, 2009). Neste trabalho, os autores obtiveram uma grande diversidade microbiana do domínio *Bacteria* que estava representado por membros pertencentes aos Filos *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria* e *Firmicutes*, e à Classe *Betaproteobacteria*.

O Domínio *Archaea*, por sua vez, compreendia os Filos *Euryarchaeota* (Marine Group II e Marine group III) e *Crenarchaeota* (Marine group I) (Brown *et al.*, 2009). Também Eloe e colaboradores usaram a técnica da pirosequenciação com o mesmo propósito, num estudo realizado no noroeste do oceano Atlântico (Eloe *et al.*, 2011). Aqui, os autores obtiveram uma diversidade bacteriana que compreendia uma variedade de grupos, nomeadamente, os Filos *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Deferribacteres* e as Classes *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*. Em relação à diversidade encontrada no Domínio *Archaea*, compreendia os grupos *Euryarchaeota* (Marine Group II Euryarchaeota) e *Thaumarchaeota* (Eloe *et al.*, 2011). Qian e colaboradores usaram a técnica de pirosequenciação, igualmente para descrever a diversidade microbiana presente no Mar Vermelho, mas sobretudo para comparar essa diversidade a diferentes profundidades (Qian *et al.*, 2010). A classificação taxonómica revelada pela pirosequenciação dos *amplicons* do gene 16S RNAr mostrou uma estratificação vertical da diversidade microbiana. Os autores obtiveram diferenças

significativas na diversidade de bactérias e de arqueias entre as zonas mais à superfície (20 e 50m) comparadas com as existentes nas zonas mais profundas (200 e 1500m). A comunidade de bactérias, era dominada por *Cyanobacteria* nas camadas mais à superfície, porém a sua proporção diminuía nas camadas mais profundas, onde as populações dominantes pertenciam a *Proteobacteria*. Em relação à comunidade de arqueias, o Filo *Euryarchaeota* era o grupo filogenético mais abundante nas camadas mais à superfície, mas diminuía drasticamente nas camadas mais profundas onde o Filo *Crenarchaeota* se tornava o grupo filogenético dominante.

1.3.Fixação autotrófica de CO₂

Em qualquer ambiente o mecanismo de fixação de carbono é um processo crucial no estabelecimento de Vida e na manutenção das comunidades. Em *habitats* em que a luz solar não penetra ou em que a radiação luminosa não é suficiente para a realização da fotossíntese, como na zona mesopelágica e zonas marinhas mais profundas, o estudo dos processos capazes de fixar carbono tornam ainda mais relevantes. Por isso, a detecção dos genes que codificam as enzimas “chave” das vias metabólicas de fixação de CO₂ tem sido aplicada como uma metodologia útil para determinar a existência de metabolismos autotróficos que possam estar presentes nos ambientes e que contribuam para sustentar as comunidades microbianas. Esta metodologia tem sido muito utilizada com sucesso em estudos ecológicos em meios marinhos nomeadamente, para detectar enzimas cruciais do ciclo de Calvin- Benson- Bassham (ciclo CBB), a via de fixação de CO₂ mais prevalente na Terra (Elsaid & Naganuma. 2001; Kovaleva *et al.*, 2010; Campbel *et al.*, 2004). O ciclo CBB tem sido encontrado numa variedade de microrganismos com características fotoautotróficas e quimiolitototróficas, com capacidade de fixar o carbono inorgânico (C_i) em compostos orgânicos característica

INTRODUÇÃO

funcional de autotrofia, pertencentes a grupos filogenéticos tão distintos como por exemplo as Classes *Epsilonproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Alphaproteobacteria* (Nakagawa & Takai, 2008). A ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RubisCO) é a enzima “chave” deste processo (Elsaid *et al.*, 2001; Hügler & Sievert 2011; Kovaleva *et al.*, 2010). A RubisCO catalisa a carboxilação da ribulose 1,5-bisfosfato (RuBP) com o CO₂, produzindo, assim, um intermediário com 6 carbonos, que é tão instável que origina duas moléculas de 3-fosfoglicerato o qual continua através do ciclo CBB (Figura 2) (Hügler & Sievert 2011; Kondratieva., 1996; Tourova & Spiridinova, 2009).

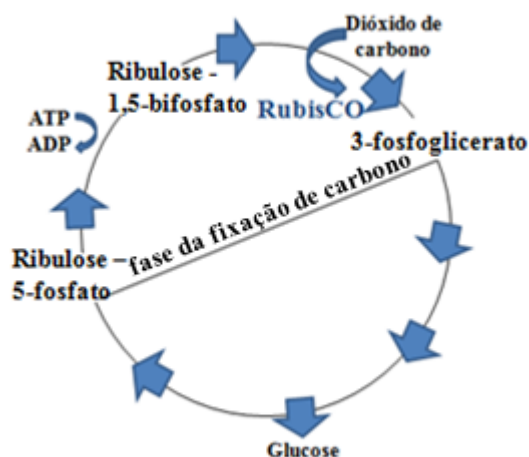


Figura 2 – Esquema simplificado do ciclo CBB mostrando o papel da RubisCO durante a fase de fixação de CO₂ do ciclo CBB.

1.3.1. Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RubisCO)

A RubisCO é a enzima mais estudada de todas as enzimas envolvidas no ciclo CBB. (Elis, 1979). No domínio *Bacteria* conhecem-se duas formas desta enzima com capacidade de fixar CO₂ a forma I e a forma II com apenas 25-30% de similaridade partilhada em aminoácidos. Ambas as formas estão envolvidas no ciclo CBB e diferem

em estrutura e actividade. Em adição, a forma III foi encontrada em *Archaea*, mas o seu significado funcional não é ainda claro, uma vez que ainda não se observou actividade directamente relacionada com o ciclo CBB em membros do Domínio *Archaea* que activamente expressam esta enzima (Berg *et al.*, 2010; Nishitani *et al.*, 2010). Reconhece-se, também, uma forma IV, sendo denominada por “RubisCO-like protein” (RLP), que é incapaz de catalisar a fixação de CO₂ não tendo a mesma função das formas I e II e pensa-se estar envolvida no metabolismo de compostos de enxofre tendo sido encontrada em muitos grupos filogenéticos de bactérias e archaeas, nomeadamente nas Classes *Epsilonproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* e no Filo *Euryarcheota* (Tabita *et al.*, 2007; Tourova *et al.*, 2009). Assim sendo, apenas as formas I e II se encontram comprovadamente envolvidas no ciclo CBB (Tourova *et al.*, 2009). Das quatro formas de RubisCO, a forma I é a mais abundante e é encontrada em bactérias e eucariotas. A forma II como foi dito, é claramente distinta da forma I e tem baixa especificidade para CO₂ encontrando-se, efectivamente, mais adaptada a ambientes que apresentem concentrações mais elevadas de CO₂ (Elsaid, 2001; Tourova *et al.*, 2009).

A detecção das formas I e II de RubisCO é feita através da determinação da presença dos genes que as codificam, *cbbL* e *cbbM* respectivamente. Este método é geralmente usado em estudos ambientais, para pesquisar a presença do ciclo CBB nos mais diversos ambientes aquáticos, tais como: fontes hidrotermais, aquíferos, lagos de água doce e em lagos hipersalinos (Giri *et al.*, 2004; Campbell & Cary 2004; Elsaid *et al.*, 2001; Kovaleva *et al.*, 2010; Wielen, 2006; Takai *et al.*, 2005).

A detecção da presença de genes de RubisCO, e consequente utilização como marcadores filogenéticos, permite a detecção e identificação das comunidades microbianas autotróficas sem recurso a técnicas de cultivo. Esta metodologia tem sido

usada frequentemente para analisar comunidades microbianas em ambientes marinhos (Campbell & Cary 2004; Campbell *et al.*, 2003 Giri *et al.*, 2004; Kovaleva *et al.*, 2010; Wielen, 2006).

1.3.2. Outras vias autotróficas de fixação de carbono

Existem outras vias alternativas de fixação de carbono para além do ciclo Calvin-Benson-Bassham, que podem participar na sustentabilidade de comunidades microbianas, nomeadamente o ciclo redutivo do ácido tricarboxílico (rTCA), o ciclo 3-hidroxiopropionato (3-HP) e o recentemente descoberto, exclusivamente em *Crenarchaeota*, ciclo do 3-hidroxiopropionato/4-hidroxiobutirato (3-HP/ 4-HB). Tal como o ciclo CBB, a presença destes ciclos no ambiente também pode ser determinada pela procura de genes que codificam as enzimas “chave” directamente envolvidas nesses mesmos ciclos.

O ciclo rTCA, que é essencialmente uma versão reversa do ciclo do ácido tricarboxílico oxidativo (TCA), foi originalmente descoberto em organismos fototróficos e tem sido identificado em diversos organismos quimiolitautotróficos (Campbell *et al.*, 2003; Hugler *et al.*, 2005; Nakagawa & Takai, 2008). As enzimas “chave” do ciclo rTCA incluem a ATP citrato liase (codificada pelo gene *Acl*), a 2-oxoglutarato:ferredoxina oxidoreductase (codificada pelo gene *Oor*) e as duas formas de piruvato:ferredoxina oxidoreductase (codificada pelos genes *por* e *nif*) (Campbell *et al.*, 2004 e 2006).

O ciclo 3-hidroxiopropionato (3-HP) foi originalmente caracterizado em organismos anoxigénicos, fototróficos, termofílicos moderados do género *Chloroflexus*. (Strauss & Fuchs, 1993) em que apenas algumas espécies deste género exibem este ciclo activo (Auguet *et al.*, 2008). Recentemente, uma versão modificada da via 3-HB foi descoberta exclusivamente em microrganismos pertencentes ao Filo *Crenarchaeota*, e designada

como 3-hidroxiopropionato/4-hidroxiбутирато (3-HP/ 4-HB) (Berg *et al.*, 2007). A acetil CoA carboxilase é uma das enzimas “chave” desta via de fixação de carbono (Auguet *et al.*, 2008; Nakagawa & Takai, 2008), sendo composta por três subunidades: biotina carboxilase, biotina carboxil e a carboxitransferase (Auguet *et al.*, 2008). Recentemente, o gene *accC* que codifica a subunidade biotina carboxilase tem sido usado como marcador para a detecção dos ciclos 3-HP e 3-HP/4HB em relação a estudos de assimilação de CO₂ no escuro (Berg *et al.*, 2010; Nakagawa & Takai, 2008).

1.4. Local de estudo

As amostras usadas na elaboração do presente estudo foram recolhidas no Atlântico Norte, num local situado entre as ilhas S. Jorge e Faial, Açores (Figura 3).



Figura 3- Localização geográfica do local de estudo. Mapa adaptado do Google Maps.

1.5. Objectivos

As comunidades microbianas encontradas nas zonas oceânicas mais superficiais, (zona fótica) são largamente dominadas por populações de *Cyanobacteria* (Andersen *et al.*, 2000; Dennis *et al.*, 2000). As comunidades microbianas características de zonas mais profundas, nomeadamente da zona designada de mesopelágica, são menos conhecidas, nomeadamente em áreas de mar aberto sem interferência de fundos marinhos raros (por exemplo fontes hidrotermais) que influenciam decisivamente a natureza das comunidades biológicas. Como tal, o presente trabalho teve como propósito descrever e comparar a diversidade microbiana num ambiente marinho de alto mar a diferentes profundidades, na zona mesopelágica, no Atlântico Norte mais propriamente no *spot* com as coordenadas (38°64.90N, 28°31.45W). Para tal, foram recolhidas amostras de água do mar a três diferentes profundidades na zona mesopelágica (255m, 532m e 809m) com o auxílio de um veículo submarino operado à distância – ROV (*remotely operated vehicle*), e recorreu-se à utilização de metodologias independentes de cultura para a obtenção de resultados para posterior comparação.

A diversidade microbiana presente nas diferentes amostras foi realizada por análise das sequências do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal - gene 16S RNAr dos domínios *Bacteria* e *Archaea* obtidas por pirosequenciação.

Adicionalmente, foi realizado a análise por *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* - DGGE que foi usado complementarmente como uma abordagem visual, suplementar, para determinar variações das comunidades microbianas entre as amostras.

A presença dos genes *cbbL* e *cbbM* que codificam a forma I e II de RubisCO, respectivamente, enzima “chave” da via de fixação de CO₂ do ciclo de Calvin- Benson-Bassham (CBB), foi também determinada nas amostras recolhidas a diferentes

profundidades. A posterior análise filogenética da comunidade microbiana autotrófica, ligada ao ciclo CBB, nas diferentes profundidades possibilitou aferir se existiriam variações na identidade das populações presentes nas diferentes profundidades.

INTRODUÇÃO

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Origem das amostras

As amostras de água do mar foram recolhidas em Novembro de 2008, ao largo da Ilha de São Jorge, nas coordenadas: 38°64.90N, 28°31.45W . Foram recolhidas três amostras de água, em garrafas de Niskin, cada uma a diferente profundidade (Tabela I) com o auxílio do ROV (*Remote Operated Vehicle*) – LUSO, instalado no N.R.P. Almirante Gago Coutinho.

Tabela I- Diferentes profundidades das amostras.

Amostra	Profundidade (m)
1	255
2	532
3	809

2.2. Concentração das amostras

As amostras de água trazidas à superfície foram concentradas por filtração, utilizando para tal unidades de filtração (Gelman, EUA), constituídas por um funil e um suporte para a membrana (47 mm de diâmetro) acoplados por encaixe magnético. Estas unidades, previamente esterilizadas por autoclavagem (121° C, durante 15 minutos), foram colocadas em série numa rampa de filtração (Gelman, EUA) acoplada a uma fonte de vácuo. Os filtros de membrana de ésteres de celulose com 47 mm de diâmetro, e 0,1 µm (Gelman, EUA) de poro, pré-esterilizados, foram colocados no suporte em condições assépticas. Ao sistema foi cuidadosamente acoplado o funil. A filtração foi efectuada passando 500 mL de volume de cada amostra sobre a membrana accionando o sistema gerador de vácuo. Após o processo de filtração, a membrana foi retirada do suporte, em condições assépticas e colocada no interior de tubos estéreis que continham

10 mL de água estéril e mantidas a -80°C até que a extracção de DNA pudesse ser efectuada.

2.3 Extracção de DNA das amostras ambientais

O DNA total foi extraído usando o Kit UltraClean Water DNA MoBio Laboratories (EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA resultante foi preservado a -20°C até posterior utilização.

2.4. Amplificação do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal – gene 16S RNAr de Bacteria e Archaea através da reacção de polimerização em cadeia - PCR

A reacção de amplificação do gene 16S RNAr de *Bacteria* (1500pb) e *Archaea* (980pb) foi efectuada num tubo tipo *Eppendorf* de $200\mu\text{L}$, contendo o volume final de $70\mu\text{L}$ de reacção constituída pelos reagentes que constam na tabela abaixo:

Tabela II. Volume dos reagentes usados nas misturas de reacção de PCR por amplificação

Composição	Volume (μL)
Cloreto de magnésio (50mM)	3
Tampão de PCR ¹	6.5
Mistura de dNTP's (1mM)	10
"Primer" F ² 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.3
"Primer" R ³ 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.3
<i>Taq</i> DNA Polimerase Platinum (5 U/ μl) (Invitrogen)	0.4
Água ultra-pura estéril	35
DNA	15

¹Tampão de PCR 10x: 100mM de Tris-HCL, 15mM de MgCl_2 , 500mM de KCl, pH 9,0.

²Primer directo

³Primer inverso

O gene 16S RNAr de *Bacteria* e *Archaea* foi amplificado num termociclador (MyCycler, Bio-Rad) programado para os seguintes ciclos de temperatura: 3,3 minutos a 94°C (desnaturação inicial) seguidos de 35 ciclos de: 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 55°C (“annealing”) e 2 minutos a 72°C (alongamento). Para assegurar a completa extensão dos produtos de PCR, ocorreu ainda um último ciclo a 72°C durante 10 minutos. Em simultâneo foi realizado um controlo negativo, o qual foi composto por toda a mistura de reacção excepto o DNA que foi substituído por água estéril, de modo a detectar uma possível contaminação.

Tabela III. Sequência dos *set* de primers utilizados nas reacções de amplificação parcial do gene 16S RNAr de *Bacteria* (27F e 1525R) e *Archaea* (21F e 958R).

Primer	Sequência (5' - 3')
27F	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G
1525R	AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC
21F	TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA
958R	YCC GGC GTT GAM TCC AAT

Procedimento:

O *stock* liofilizado de cada oligonucleótido foi hidratado, em água ultra-pura estéril por filtração e autoclavagem (121°C, durante 15 minutos), de modo a que a concentração final da suspensão fosse de 1 µg/µL. Posteriormente, foram preparadas alíquotas de trabalho, com concentração final de 0,1 µg/µL, por adição de 10 µL de solução *stock* a 90 µL de água ultra-pura esterilizada por filtração e autoclavagem (121°C, durante 15 minutos), que foram conservadas a -20°C.

2.4.1. Solução de desoxiribonucleótidos trifosfato – dNTP's

	Volume	[final]
dACT 100 mM (Promega)	10 µl	1 mM
dCCT 100 mM (Promega)	10 µl	1 mM
dGCT 100 mM (Promega)	10 µl	1 mM
dTCT 100 mM (Promega)	10 µl	1 mM
Água ultra-pura estéril*	960 µl	-

* Estéril por filtração, com filtros de 0,2 µm de diâmetro de poro (Shlucher & Schuell), e por autoclavagem (121°C durante 15 minutos). A mistura foi conservada em tubos *ependorf*, a -20 °C

2.5. Visualização dos produtos de amplificação por electroforese

Após cada reacção de PCR, foi realizada uma electroforese em gel de agarose a 1% (2.5.1.) durante 45 minutos a 90 V para comprovar a qualidade e presença dos produtos amplificados.

Foram colocados 35 µL do produto de PCR no gel, e a cada um foram, previamente, adicionados 3,5 µL de *loading buffer*. Foi também aplicado a cada gel 3 µL de uma mistura de fragmentos de DNA de peso molecular conhecido – DNA Marker XIV (0,25µg/µL, Boehringer Mannheim). Após a electroforese, os géis foram observados utilizando um sistema Gel Doc XR System (BioRad, A, EUA) acoplado a um computador, sob luz ultravioleta.

2.5.1. Gel de agarose 1%

Agarose (Sigma)	1g
Solução TAE 1x	100mL
Brometo de etídio	5 µL

Procedimento:

A agarose foi hidratada com uma solução TAE 1x (2.5.1.1.), preparada sempre que necessário, por diluição da solução TAE 50x (2.5.1.1.1.) em água ultra-pura. Para facilitar a hidratação, a suspensão foi ligeiramente aquecida num microondas. Após a completa hidratação do gel, o volume final foi ajustado a 100mL. Deixou-se arrefecer, agitando-se sempre. Finalmente, 5 μ L de uma solução de brometo de etídeo (2.5.1.2.) foi adicionada e o gel homogeneizado. Este, por sua vez foi deixado a polimerizar com pentes colocados, para a formação de poços no gel para posterior aplicação dos *amplicons*. Antes de usar, os pentes foram cuidadosamente retirados.

2.5.1.1. Solução TAE (1x)

A solução de trabalho foi preparada sempre que necessário, por diluição da solução stock TAE (50x) (2.5.1.1.1.) em água ultra pura.

2.5.1.1.1. Solução stock TAE (50x)

Tris/base (Merck)	121g
Ácido acético (Merck)	28.55mL
Solução aquosa EDTA (0.5M;pH 8) (Sigma)	50mL
Água ultra-pura até	500mL

Procedimento:

O Tris-HCl foi dissolvido numa solução aquosa de EDTA, e o ácido acético foi adicionado à solução. O valor de pH foi ajustado a 8 utilizando uma solução de NaOH (5M). Finalmente, fez-se o volume final a 500 mL com água ultra-pura e armazenou-se à temperatura ambiente num frasco escuro.

2.5.1.2. Solução de brometo de etídeo (5mg/mL)

Brometo de etídeo	0,5g
Água ultra pura (estéril)	100mL

Procedimento:

O brometo de etídeo foi dissolvido completamente. A solução foi guardada num frasco envolvido em papel de alumínio ao abrigo da luz e armazenada a 4°C.

2.6. Análise por DGGE**2.6.1. Amplificação parcial do gene 16S RNAr de Bacteria e Archaea para DGGE**

Para a análise por *Denaturing Gradient Gel Electrophoreses* – DGGE da diversidade microbiana existente nas diferentes amostras, duas abordagens foram utilizadas. Foi efectuado um PCR para a amplificação parcial do gene 16S RNAr para o domínio *Archaea* com os seguinte *set* de primers 519R (5′ - CAG CCG CCG CGG TAA – 3′) e 915-GC (5′ - CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CGT GCT CCC CCG CCA ATT CCT – 3′) e para o domínio *Bactéria* com o *set* de primers 341F-GC (5′ - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG RGG CAG CAG - 3′) e o 534R (5′ - ATT ACC GCG GCT GCT GG – 3′). Estes *amplicons* foram usados para proceder ao que posteriormente se designou de “DGGE directo”. Também se efectuou um Nested-PCR tendo como *template* o DNA amplificado obtido na secção 2.4. e utilizados os *set* de primers acima mencionados. Os resultados do Nested-PCR foram usados para efectuar o que posteriormente se designou de “DGGE reamplificado”.

A reacção foi efectuada num tubo tipo *Eppendorf* de 200 μL , contendo um volume final de 70 μL (no caso do “DGGE directo”) e de 50 μL (no caso do “DGGE reamplificado”) de reacção constituída pelos reagentes que constam na tabela abaixo.

Tabela IV. Volume dos reagentes usados nas misturas de reacção de PCR por amplificação

Composição	DGGE reamplificado	DGGE Directo
Cloreto de magnésio (50mM)	1.5 μL	3 μL
Tampão de PCR ¹	5 μL	6.5 μL
Mistura de dNTP's (1mM)	10 μL	10 μL
"Primer" F ² 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.3 μL	0.3 μL
"Primer" R ³ 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.3 μL	0.3 μL
<i>Taq</i> DNA Polimerase Platinum (5 U/ μl) (Invitrogen)	0.25 μL	0.4 μL
Água ultra-pura estéril	28 μL	35 μL
DNA	5 μL	15 μL

¹Tampão de PCR 10x: 100mM de Tris-HCL, 15mM de MgCl₂, 500mM de KCl, pH 9,0.

²Primer directo;

³Primer inverso

As reacções de PCR foram feitas num termociclador (MyCycler, Bio-Rad) programado para os seguintes ciclos de temperatura: 3,30 minutos a 94°C (desnaturação inicial) seguidos de 35 ciclos (no caso do DGGE directo) ou 30 ciclos (no caso do DGGE reamplificado) de: 1minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 53°C (“annealing”) e 2 minutos a 72°C (alongamento). Para assegurar a completa extensão dos produtos de PCR, ocorreu ainda um último ciclo a 72°C durante 10 minutos. Em simultâneo foi realizado um controlo negativo, o qual foi composto por toda a mistura excepto o DNA, que foi substituído por água estéril, de modo a detectar uma possível contaminação.

O tamanho e a qualidade dos *amplicons* foram comprovados pela electroforese em gel de agarose a 1% (2.5.1.), durante 45 minutos a 90V em tampão TAE 1x (2.5.1.1.) com

um marcador de peso molecular conhecido - DNA Marker XIV (0,25µg/µL, Boehringer Mannheim).

2.6.2. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

DGGE foi realizada usando o DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) utilizando uma versão alterada do protocolo descrito por Muyzer *et al.*, 1993. As soluções foram preparadas para criarem géis de poliacrilamida (8% [w/v] géis de poliacrilamida em TAE 50x) e um gradiente linear de desnaturantes: formamida e ureia. O gradiente desnaturante de 35-65% (tabela V) foi usado para a separação dos fragmentos obtidos do gene 16S RNAr. O gradiente foi criado com o auxílio do mecanismo de mistura de dupla câmara MSE (Loughborough, Leicestershire, United Kingdom) e uma bomba peristáltica. As soluções de acrilamida DGGE (35% e 65%) foram desgaseificadas durante 15 minutos. Foram pipetados 12,5 mL de cada solução de DGGE para o interior das duas câmaras do misturador e adicionados 140 µL de persulfato de amónio 10% (2.6.2.1.), preparado na hora, e 14 µL de tetramethylethylenediamine- TEMED (Sigma). A temperatura da tina foi regulada para 60°C de forma a aquecer o tampão TAE 50x.

Após duas horas de polimerização do gel, colocou-se 6 mL de solução a 0% de ureia e em seguida foi aplicado o pente para formação dos poços do *stacking* gel. Colocaram-se 35 µL de produto de PCR misturado com 3,5 µL de *loading buffer* em cada um dos poços do *stacking* gel, e iniciou-se a electroforese que durou 17 horas a uma voltagem constante de 70 V, corrente gerada por uma fonte de alimentação (BioRad Power Pac 3000). Após a electroforese, retirou-se o gel e colocou-se numa tina com solução TAE 1x/brometo de etídeo (100mL/5µL), e deixou-se a colorar durante 30 minutos no escuro. Após este período de coloração, o excesso de brometo de etídeo foi removido do

gel por incubação deste em água destilada por 15 minutos. Posteriormente o gel foi observado sobre luz ultra-violeta, e fotografado utilizando um sistema Gel Doc XR System (BioRad, A, EUA), acoplado a um computador.

Tabela V- Soluções desnaturantes de acrilamida, utilizadas no DGGE

	0%	35%	65%
Reagentes/ Percentagem	ureia	ureia	ureia
40% Acrilamida (mL) (BioRad)	20	20	20
TAE (50x) (mL)	2	2	2
Formamida (desionizada) (mL) (Sigma)	0	14	26
Ureia (g) (Merck)	0	14,7	27,3
Água ultra-pura (mL)	78	até 100	até 100

Procedimento:

A acrilamida foi inicialmente hidratada de acordo com as indicações do fornecedor, adicionando 48 mL de água mili-Q (anteriormente filtrada através de filtros de 0,2 µm). De seguida, procedeu-se à preparação das soluções desnaturantes com 35% e 65% de ureia, de acordo com os valores dados na tabela V. Após dissolução completa de todos os componentes e ajuste do volume final, a solução obtida foi filtrada através de papel de filtro (Wathman nº1) e guardada no escuro, a 4°C.

2.6.2.1. Solução de Persulfato de amónio 10%

Persulfato de amónio (Sigma)	10 mg
Água ultra-pura até	1 mL

2.6.3. Análise estatística da análise de DGGE

Para determinar a similaridade das comunidades microbianas detectada nas diferentes profundidades para as metodologias: DGGE directo e DGGE reamplificado usando a análise de DGGE, foi determinado o índice de similaridade de Sørensen (QS) usando a seguinte equação: $QS = 2C / (A + B)$ em que A e B são o número de bandas nas amostras A e B, respectivamente, e C o número de bandas partilhadas nas duas amostras (Sørensen. T., 1948).

2.7. Análise da diversidade microbiana por Pirosequenciação

2.7.1. Análise por Massively parallel bTEFAP e aTEFAP titanium

Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) foi realizada como descrito por (Dowd *et al.*, (2009) e Callaway *et al.* (2008) no Research and Testing Laboratory (Lubbock, TX. USA). A construção inicial das livrarias de sequenciação utilizou um *one-step* de PCR, uma mistura Hot Start, Taq polimerase high fidelity HotStar e *amplicons* originários da amplificação parcial do gene 16S RNAr entre as zonas hipervariáveis V1 e V3 (Figura 4) para a diversidade bacteriana. Para a análise dos *tag- encoded FLX amplicon* foi utilizada o instrumento Roche 454 FLX com reagentes e procedimentos Titanium realizados no Research and Testing Laboratory (Lubbock, TX) com base em protocolos RTL (www.researchandtesting.com).

Os *TEFAP* de *Archaea* (*aTEFAP*) foram fundamentados em princípios similares baseados nos procedimentos de bactéria mas usando *set* de primers específicos para as zonas hipervariáveis V4 e V5 (Figura 4) do gene 16S RNAr do domínio *Archaea*.

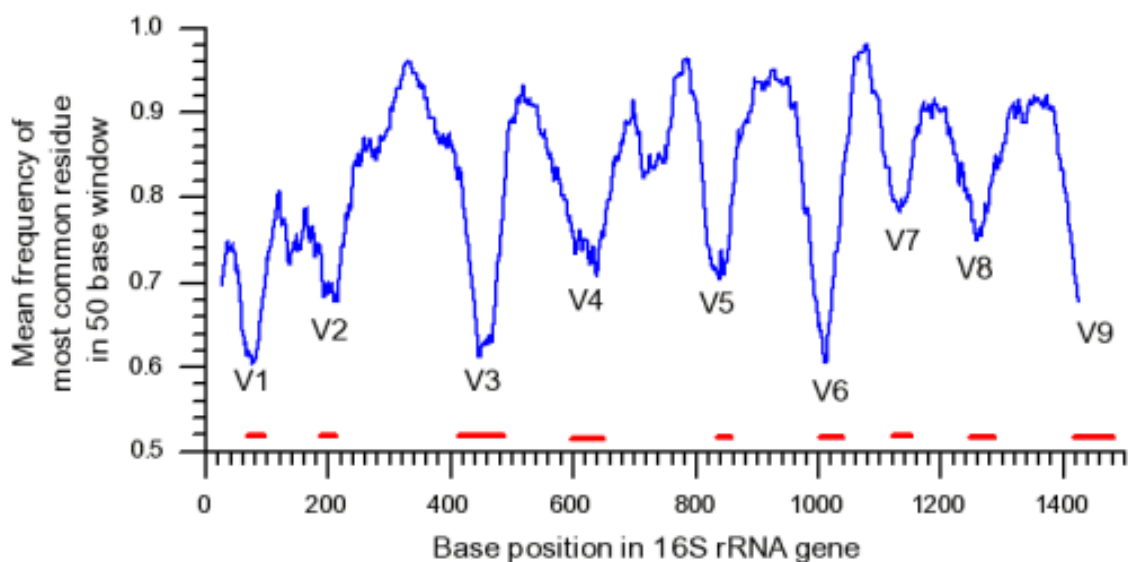


Figura 4- Representação das regiões hipervariáveis do gene 16S RNAr. As linhas reflectem as flutuações na variabilidade entre as sequências alinhadas do gene 16S RNAr; os picos reflectem a maior conservação, enquanto que os valores mais baixos correspondem às regiões hipervariáveis conhecidas V1 a V9 indicadas pelas barras vermelhas.

2.7.2. Tratamento de dados obtidos por pirosequenciação e posterior análise filogenética

O conjunto de pirosequências obtidas para cada amostra 2642, 4527 e 5417 (para o domínio *Bacteria*) e 8764, 4991 e 9077 (para o domínio *Archaea*), para as profundidades 255m, 532m e 809m, respectivamente, foi tratado utilizando o pacote de *software* Mothur (Schloss *et al.*, 2009, <http://www.mothur.org/>). As sequências de baixa qualidade (qualidade média abaixo de 25), as que apresentavam menos de 250 pares de bases, as regiões dos primers e tags foram removidos dos conjuntos de sequências. Também se efectuou um “screening” de possíveis quimeras, e as sequências que possivelmente as representariam foram eliminadas do *bulk* final. Assim um total de

1683 pirosequências obtidas na profundidade 255m, 2103 pirosequências na profundidade 532m e 2707 pirosequências na profundidade 809m foram examinados para determinar a diversidade populacional do domínio *Bacteria* nas diferentes amostras. Para a determinação da diversidade populacional do domínio *Archaea* nas diferentes amostras foram analisadas para a profundidade 255m um total de 2461 pirosequências, na profundidade 532m 1247 pirosequências e na profundidade 809m 3848 pirosequências. O alinhamento e o agrupamento das sequências em Unidades Taxonômicas Operacionais determinadas por pirosequenciação – OTUs foi realizado utilizando as várias opções disponibilizadas no sítio online Ribosomal Database Project: em “*RDP Pyrosequencing pipeline*” (<http://pyro.cme.msu.edu/>), nomeadamente as funcionalidades “Aligner” e “Complete Linkage Clustering”. A classificação filogenética das pirosequências do gene 16S RNAr foi realizada usando a função “Classifier” (Wang *et al.*, 2007). A ligação entre as OTUs determinadas e a classificação filogenética das pirosequências do gene 16S RNAr foi efectuada usando um programa com *interface* Windows especialmente programado por Filipe Campelo para este propósito em R (<http://www.r.project.org/>).

2.7.3. Análise estatística dos resultados obtidos por pirosequenciação

A similaridade entre as comunidades microbianas detectadas por pirosequenciação para as diferentes profundidades foi determinada por análise estatística. Três tipos de testes estatísticos complementares foram realizados. Os valores de “Coverage” (Good, I.J., 1953) foram calculados usando a seguinte equação: $C = (1 - n / N) \times 100$, em que n é o número de OTUs de cada amostra e N o número final de pirosequências a ser tratadas em cada amostra. O índice de similaridade de Sørensen (QS) foi determinado usando a seguinte equação: $QS = 2C / (A + B)$ em que A e B são o número de OTUs nas amostras

A e B, respectivamente, e C o número de OTUs partilhadas pelas duas amostras (Sørensen. T., 1948). Os valores do índice de Shannon – Weaver (H') e a Equitabilidade de Shannon foram calculados usando equações *standart* (Hill *et al.*, 2003).

2.8. Amplificação parcial dos genes *cbbL* e *cbbM*

A amplificação dos genes *cbbL* e *cbbM* que codificam a forma I e II de RubisCO, respectivamente, serviu para detectar a presença da via autotrófica de fixação de carbono pelo ciclo Calvin-Bensen-Bassham - ciclo CBB em cada uma das amostras. Nas amostras em que os genes foram amplificados, foi efectuada a clonagem dos *amplicons*, procedendo-se posteriormente à sua sequenciação. A análise filogenética foi efectuada de modo a identificar as comunidades microbianas que possivelmente poderão ser responsáveis pela fixação autotrófica de carbono pela via CBB nas diferentes estratificações marinhas no *spot* Rosais.

A mistura de amplificação para os genes foi preparada num tubo tipo *Eppendorf* de 200 μ L, contendo o volume final de 50 μ L de reacção constituída pelos reagentes que constam na tabela VI.

Tabela VI. Volume dos reagentes usados nas misturas de reacção de PCR por amplificação

Composição	Volume (μ L)
Tampão de PCR ¹	6
Mistura de dNTP's (1mM)	12
"Primer" F ² 0,5 μ g/ μ L	0.35
"Primer" R ³ 0,5 μ g/ μ L	0.35
Cloreto de magnésio (50mM)	3.5
<i>Taq</i> DNA Polimerase Platinum (5 U/ μ L) (Invitrogen)	0.5
Água ultra-pura estéril	17.5
DNA	10

¹Tampão de PCR 10x: 100mM de Tris-HCL, 15mM de MgCl₂, 500mM de KCl, pH 9,0.

²Primer directo

³Primer inverso

As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador (MyCycler, Bio-Rad) programado para os seguintes ciclos de temperatura: 4 minutos a 94°C (desnaturação inicial), 1 ciclo de: 2 minutos a 94°C (desnaturação inicial), 2 minutos a 45°C e 2 minutos a 72°C seguidos de 38 ciclos de: 2 minutos a 94°C, 2 minutos a 50°C (annealing (para o gene *cbbL*) e 58°C (para o gene *cbbM*) e 2 minutos a 72°C. Para assegurar a completa extensão dos produtos de PCR, ocorreu ainda um último ciclo a 72°C durante 10 minutos. Em simultâneo foi realizado um controlo negativo, o qual foi composto por toda a mistura de reacção há excepção do DNA, que foi substituído por água estéril, de modo a detectar uma possível contaminação.

Tabela VII. Sequência dos diferentes *set* de primers utilizados nas reacções de PCR

Gene	Primer	Sequência (5´- 3´)
forma I RubisCO	cbbL F	GAC TTC ACC AAA GAC GAC GA
<i>cbbL</i>	cbbL R	TCG AAC TTG ATT TCT TTC CA
	RubIg F	GA(C/T)TTCACCAA(A/G)GA(C/T)GA(C/T)GA
	RubIg R	TC(A/G)AACTTGAT(C/T)TC(C/T)TTCCA
	RubRed F	ACCTGGAC(G/C)(A/G)T(G/C)GT(G/A/C)TGGAC
	RubRed R	TCGCC(C/T)TC(G/C)AGCTTGCC(G/C)AC
forma II RubisCO	cbbM F	TTCTGGCTGGGBGGHGAYTTYATYAARAAYGACGA
<i>cbbM</i>	cbbM R	CCGTGRCCRGVCVCGRTGGTARTG

2.9. Purificação dos produtos amplificados

O tamanho e a qualidade dos *amplicons* foram comprovados pela electroforese em gel de agarose a 1% (2.5.1.), durante 45 minutos a 90V em tampão TAE 1x (2.5.1.1.) com

um marcador de peso molecular conhecido - DNA Marker XIV (0,25µg/µL, Boehringer Mannheim).

As bandas que continham os produtos de PCR com o tamanho correcto foram cortadas a partir do gel de agarose e purificadas recorrendo ao “JETquick Spin Column Technique – PCR Purification Spin Kit” (Genomed) de acordo com as instruções do fabricante. Basicamente o processo consistiu na passagem e lavagem com diferentes reagentes do kit da mistura resultante da reacção de PCR por uma coluna de separação, de matriz de sílica, previamente inserida num tubo tipo *Eppendorf* de 2mL.

2.10. Clonagem dos amplicons parciais do gene *cbbL* de RubisCO

A clonagem de um *amplicon* (fragmento de DNA) consiste na sua ligação a um vector, com a capacidade de ser incorporado numa célula hospedeira. Esta célula não integra o vector no seu genoma, mas replica-o várias vezes. Como consequência o gene é amplificado muitas vezes.

No presente trabalho foram clonados os *amplicons* parciais do gene *cbbL* de RubisCO obtidos na reacção de PCR descrito na secção 2.8. Devido ao tamanho dos amplicons obtidos, utilizando primers que se ligam ao vector é possível sequenciar a totalidade do *amplicon* de interesse.

2.10.1. Ligação dos amplicons ao vector de clonagem pCR-2.1- TOPO (Invitrogen)

Para efectuar a ligação dos *amplicons* pretendidos ao vector, foram utilizados os *amplicons* purificados com menos de 24 h de modo a aumentar a eficiência da ligação. A *Taq* polimerase utilizada na amplificação dos genes deixa na extremidade 3' da cadeia de DNA amplificada uma adenina livre permitindo a

ligação do produto de PCR ao vector pCR2.1-TOPO incluído no kit de clonagem de “TOPO TA cloning” (Invitrogen, EUA), que possui na forma linear uma timina livre.

O vector utilizado tem a particularidade de efectuar a selecção e a distinção entre células transformadas e não transformadas e entre vectores com ou sem *insert*. Este vector possui na sua estrutura uma sequência que permite a síntese de uma proteína que confere resistência a ampicilina, deste modo, todas as células transformadas com o vector são resistentes a ampicilina, e as não transformadas não proliferam em meio com ampicilina. Outra característica importante é o facto do local de ligação do produto de PCR estar localizado no meio do gene da β -galactosidase. A transcrição deste gene é induzida por Isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). O gene da β -galactosidase codifica uma enzima que catalisa uma reacção de degradação da galactose, mas neste caso utiliza-se um análogo da galactose, o 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranoside (X-GAL). Assim quando este é degradado pela enzima liberta o grupo indol que oxida no meio de cultura e adquire uma coloração azul. Assim as células transformadas com o plasmídeo que possui o produto de PCR de interesse são brancas, pois não expressam a β -galactosidase e as não transformadas apresentam uma coloração azul.

As proporções dos reagentes utilizados na ligação do gene de interesse ao vector pCR2.1-TOPO estão descritas na tabela VIII.

Tabela VIII. Mistura de reacção utilizada na ligação dos *amplicons* parciais do gene *cbbL* ao vector pCR-2.1-TOPO

Água estéril (Invitrogen)	4 μ L
Tampão de ligação (Invitrogen)	1 μ L
Vector pCR 2.1 (Invitrogen)	2 μ L
Produto de PCR	2 μ L
T4 DNA ligase (Invitrogen)	1 μ L

2.10.2. Transformação *E. coli* TOPO 10 (Invitrogen)

Às ligações previamente realizadas (2.10.1.) adicionaram-se 50 μL de células competentes (*E. coli* TOPO 10, Invitrogen) que foram incubadas no gelo durante 30 minutos. Posteriormente, as suspensões foram submetidas a um choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Este choque térmico permitiu que o vector com o *insert* do gene de interesse fosse incorporado pela bactéria. Seguidamente, foram adicionados 300 μL de meio S.O.C. (Invitrogen, EUA) e as células foram incubadas a 37°C durante 1 hora com agitação constante. Este período de tempo permitiu à célula hospedeira sintetizar as proteínas que conferem resistência à ampicilina. O volume total obtido na transformação da bactéria foi plaqueado em caixas de Petri com meio LB (2.10.4.) com 100 mg/mL de ampicilina (2.10.4.1.), previamente plaqueadas com 20 μL de X-Gal (2.10.2.1.) e 100 μL de IPTG 0,1 M (2.10.2.2.). Por fim, as culturas foram incubadas durante a noite (\pm 16 horas) numa estufa a 37 °C.

2.10.2.1. Solução de X-Gal

5-bromo-4-cloro-3-indol -D-galactopiranosido	100mg
N,N-dimetilformamida	2mL

Procedimento:

Foram dissolvidos 100 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indol -D-galactopiranosido em 2 mL de N,N-dimetilformamida. No fim de dissolvida, a solução foi guardada a -20 °C e protegida da luz.

2.10.2.2. Solução de IPTG 0,1M

Foram colocados 100 µl de IPTG 1M (2.10.2.2.1.) em 900 µl de água ultra-pura estéril (estéril por filtração, com filtros de 0,2 µm de diâmetro de poro (Shlucher & Schuell), e por autoclavagem (121 °C durante 15 minutos).

2.10.2.2.1. Solução de IPTG 1 M

Isopropil -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)	11,92g
Água mili-Q até	50mL

Procedimento:

Dissolveram-se 11,92 g de IPTG em 40 mL de água mili-Q. Após completa dissolução deste aferiu-se o volume até 50 mL.

2.10.3. Meio líquido LB (Luria- Bertani)

Este meio foi utilizado para o crescimento de células competentes de *Escherichia coli*. Possui na sua composição os seguintes reagentes:

Triptona (Difco)	10g/L
Extracto de levedura (Difco)	5g/L
Cloreto de sódio (Merck)	5g/L

Procedimento:

Depois de adicionar os reagentes, ajustou-se o pH da solução a 7. O meio foi esterilizado por autoclavagem (121 °C, 15 minutos), sendo de seguida armazenado à temperatura ambiente.

2.10.4. Meio sólido LB com ampicilina

Este meio permitiu o crescimento de células transformadas com o vector. Tem constituição igual ao anterior, com a adição de ampicilina e de agar para solidificar.

Triptona (Difco)	10g/L
Extracto de levedura (Difco)	5g/L
Cloreto de sódio (Merck)	5g/L
Ampicilina	1mg/L
Agar (Sigma)	15g

Procedimento:

Depois de misturar os reagentes ajustou-se o pH da solução para 7 com NaOH. O agar foi pesado directamente num frasco tipo *schott*, ao qual se adicionou de seguida a solução com o pH acertado. O meio foi esterilizado por autoclavagem (121 °C, 15 minutos).

Uma vez esterilizado, a temperatura foi estabilizada num banho de água a 55 °C. Seguidamente foi adicionado 1mL de ampicilina (100 µg/mL). O meio foi homogeneizado com precaução e distribuído por caixas de Petri de plástico estéreis, que foram guardadas invertidas e conservadas a 4 °C, ao abrigo da luz, até à sua utilização.

2.10.4.1. Solução de ampicilina 100mg/L

D(-)- -aminobenzilpenicilina (Sigma)	1g
Água ultra pura até	10mL

Procedimento:

Dissolveu-se 1 g de D(-)-aminobenzilpenicilina em 10 mL de água mili-Q. Após total dissolução do composto, esterilizou-se por filtração.

2.10.5. Preparação das suspensões celulares

Por amostras, foram repicadas 80 colónias brancas, das caixas de Petri plaqueadas. Cada colónia foi usada para inocular um tubo universal estéril contendo 2 mL de meio LB com 100 mg/L de ampicilina. As culturas foram incubadas durante a noite a 37 °C com agitação constante. Posteriormente foram transferidas para um *eppendorf* de 2 mL e procedeu-se à sedimentação das células por centrifugação a 13200 rpm durante um minuto. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi submetido ao processo de extracção e isolamento do DNA plasmídico através do Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed) seguindo as instruções do fabricante. Após o processo de extracção de plasmídeos, os *eppendorf's* com as suspensões aquosas que continham o DNA plasmídico extraído e purificado foram guardados a -20 °C, até à sua sequenciação.

2.11. Análise filogenética

As sequências parciais do gene *cbbL* foram determinadas recorrendo a um serviço de sequenciação fornecido pela empresa Macrogen, (<http://dna.macrogen.com/eng/>).

A verificação da qualidade e edição das sequências obtidas foi efectuada usando o *software* “Sequence Scanner v 1.0” (<https://products.appliedbiosystems.com>). As sequências de DNA foram traduzidas para proteína, e foram posteriormente alinhadas com o programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). Depois de alinhadas, foram identificadas as sequências representativas de cada filótipo obtido. As

sequências do gene *cbbL* de organismos com maior homologia com as nossas sequências ambientais foram obtidas partir da base de dados “GenBank” usando o *software* BLAST-P (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Todas as sequências de aminoácidos foram novamente alinhadas com o *software* de alinhamento múltiplo Clustal W contido no programa MEGA 5. Estes alinhamentos foram usados para a construção do dendrograma filogenético no programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2007). A topologia do dendrograma foi obtida pelo algoritmo de *neighbor-joining* com a correção do modelo de substituição de aminoácidos de Poisson (Nei & Kumar, 2000) presente no programa MEGA 5. A significância estatística e estabilidade topológica dos grupos obtidos foram confirmadas pela análise de “*bootstrap*” (1000 réplicas).

3.RESULTADOS

3.1. Análise por DGGE

A análise por DGGE foi efectuada com o propósito de comparar visualmente a diversidade microbiana detectada nas amostras recolhidas nas três diferentes profundidades no *spot* estudado. Os *fingerprints* das populações de *Bacteria* e *Archaea* foram obtidos após a separação dos fragmentos do gene 16S RNAr por DGGE. A vasta maioria das bandas dominantes estava presente em todos os perfis obtidos para ambos os Domínios *Bacteria* e *Archaea*, o que provavelmente indicará que os mesmos grupos filogenéticos estarão presentes nas diferentes profundidades. Em relação ao Domínio *Bacteria*, no que diz respeito à metodologia “DGGE reamplificado” não se observaram diferenças entre os perfis obtidos, apenas uma maior intensidade das bandas quando comparadas com a metodologia do “DGGE directo” (Figura 5).

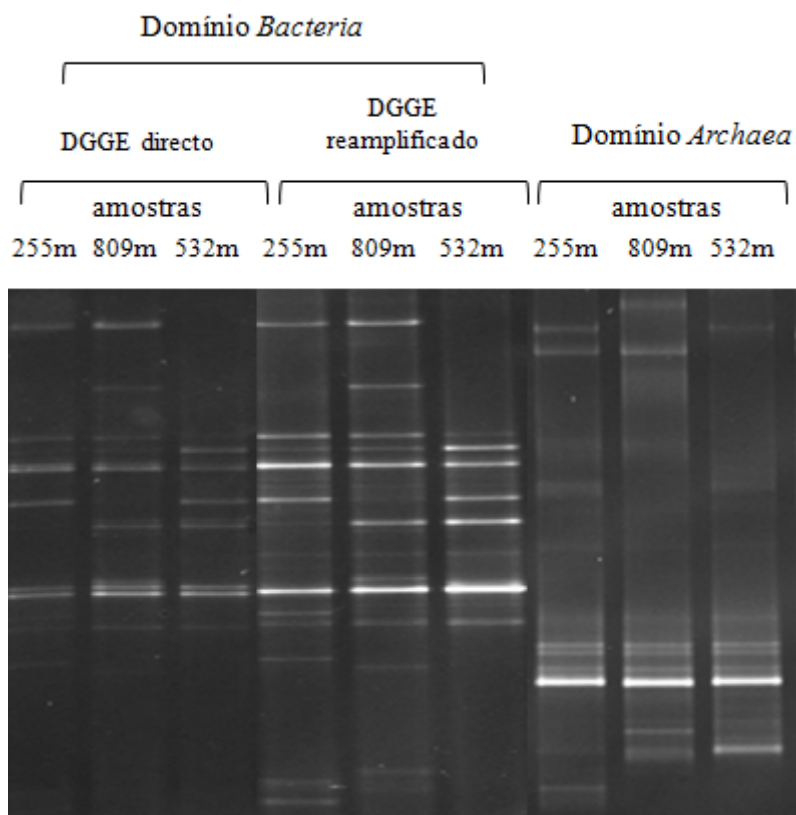


Figura5 – Perfis de DGGE para as três diferentes profundidades obtidos a partir dos fragmentos do gene 16S RNAr dos Domínios *Bacteria* e *Archaea*.

3.1.1. Análise estatística dos resultados de DGGE

O índice de similaridade de Sørensen permite comparar a diversidade determinada entre amostras, sendo possível aferir a similaridade entre essas mesmas amostras. Neste caso, o índice foi aplicado para as populações determinadas para cada perfil do DGGE (para ambas as técnicas: DGGE Directo e DGGE Reamplificado). Embora seja apenas uma determinação visual, é possível, pela análise da figura 5, verificar quais as bandas únicas em cada profundidade e quais as que são comuns entre profundidades. Os valores determinados para o índice de similaridade de Sørensen estão indicados na Tabela IX. Indicando a presença de uniformidade na identidade das populações determinadas nas diferentes profundidades.

Tabela IX - Índice de similaridade de Sørensen aplicado para os perfis obtidos por DGGE para o Domínio *Bacteria*

Amostras	Versus		
	255m	532m	809m
255m	-	0,74 ^a	0,7 ^a
532m	0,6 ^b	-	0,74 ^a
809m	0,67 ^b	0,64 ^b	-

^a valores que correspondem à técnica do DGGE Directo

^b valores que correspondem à técnica do DGGE reamplificado

3.2. Análise da diversidade microbiana por Pirosequenciação

3.2.1. Determinação das Unidades Taxonómicas Operacionais - OTUs a partir das sequências obtidas por Pirosequenciação

Após submeter o conjunto de pirosequências obtidas para o Domínio *Bacteria*, às diferentes profundidades, ao procedimento descrito na secção 2.7.2., obteve-se um *bulk* final com os totais de 2103, 2525 e 2707 pirosequências originárias das amostras recolhidas às profundidades de 255m, 532m e 809m, respectivamente. Cada conjunto final de pirosequências foi tratado no "*RDP Pyrosequencing pipeline*" como descrito na secção 2.7.2.. Após analisar o gráfico obtido pela relação do número de Unidades Taxonómicas Operacionais - OTUs *versus* o valor de similaridade a que cada OTU foi determinada (compreendido entre 0.00 e 0.1) - "clustering vs distance cutoff" (Figuras 6, 7 e 8); e os resultados da análise de rarefacção para as diferentes profundidades (Figuras 9, 10 e 11), foi definido o valor de *cutoff* de 0,05% (valor mínimo de 95% de similaridade para todas as pirosequências incluídas em cada OTU) para a determinação das OTUs no Domínio *Bacteria* e consequente realização da análise estatística e filogenética nas diferentes amostras.

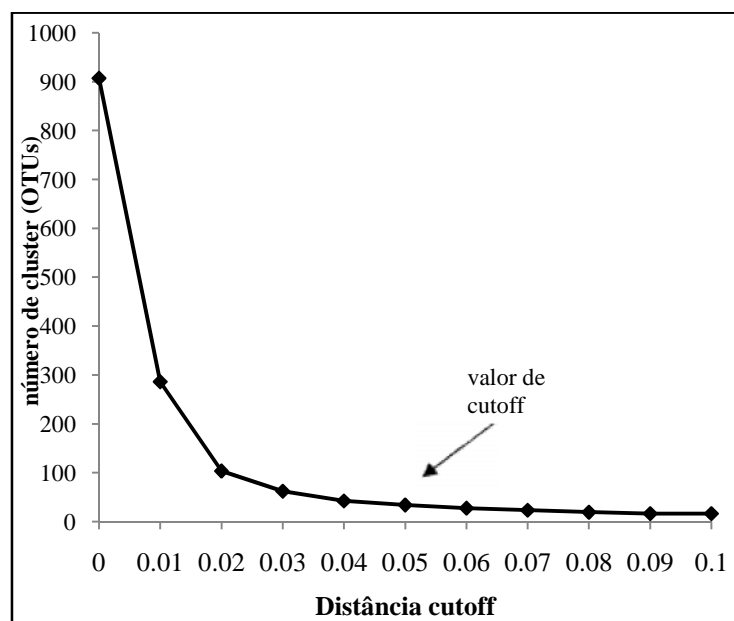


Figura 6- Gráfico representativo dos resultados resultantes do tratamento "Clustering vs distance cutoff" para as pirosequências obtidas para o Domínio *Bacteria* para a profundidade 255m

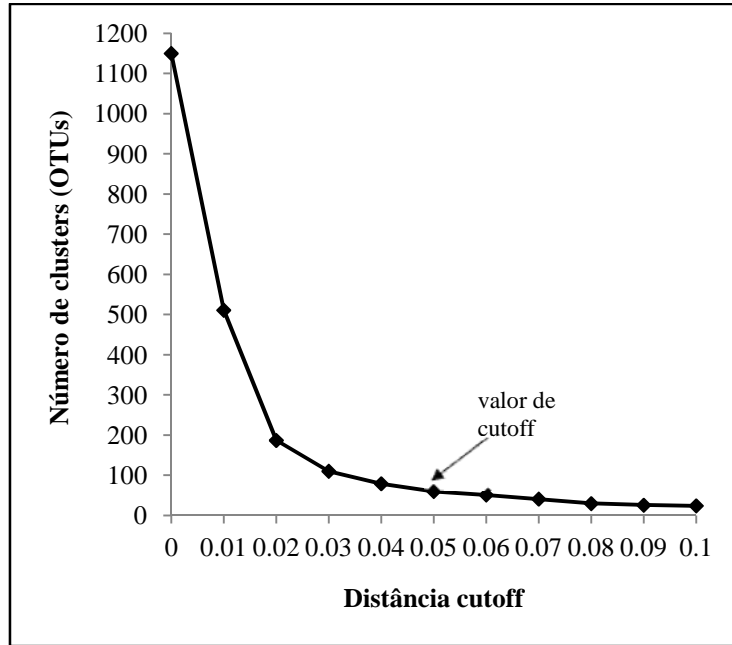


Figura 7- Gráfico representativo dos resultados resultantes do tratamento “Clustering vs distance cutoff” para as pirosequências obtidas para o Domínio *Bacteria* para a profundidade 532m

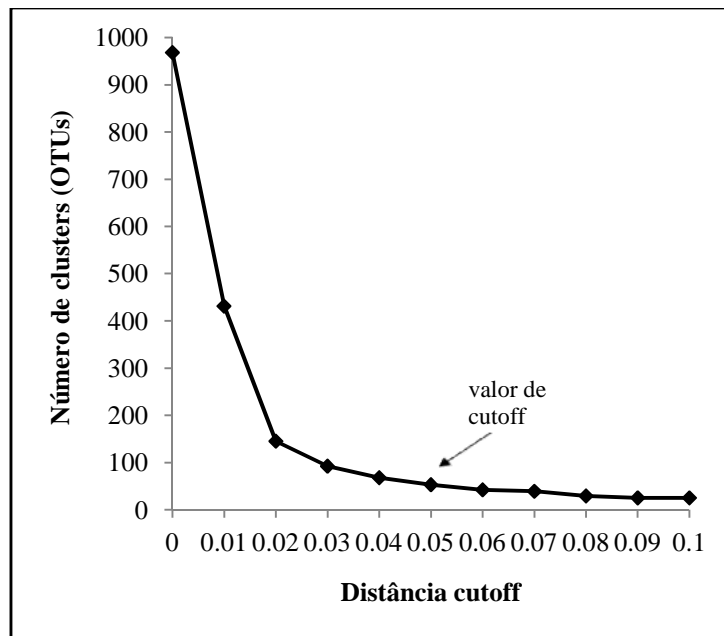


Figura 8- Gráfico representativo dos resultados resultantes do tratamento “Clustering vs distance cutoff” para as pirosequências obtidas para o Domínio *Bacteria* para a profundidade 809m

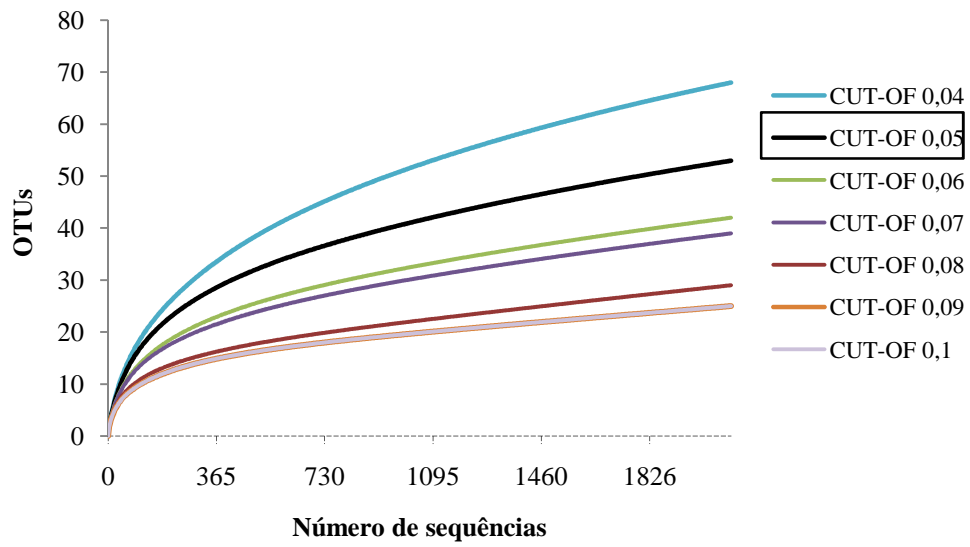


Figura9- Gráfico representativo dos resultados da análise de rarefação realizada para o conjunto de dados obtidos para o Domínio *Bacteria* para a profundidade de 255m

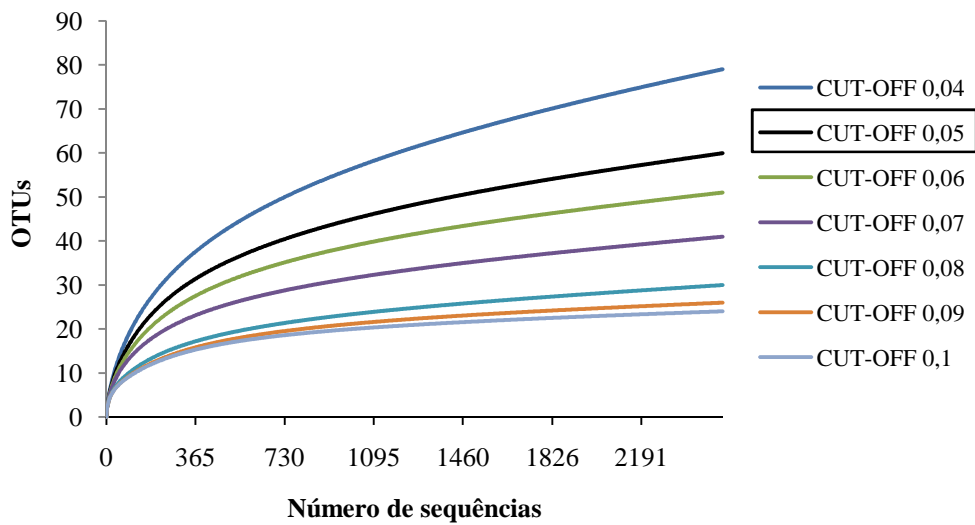


Figura10 - Gráfico representativo dos resultados da análise de rarefação realizada para o conjunto de dados obtidos para o Domínio *Bacteria* para a profundidade de 532m

RESULTADOS

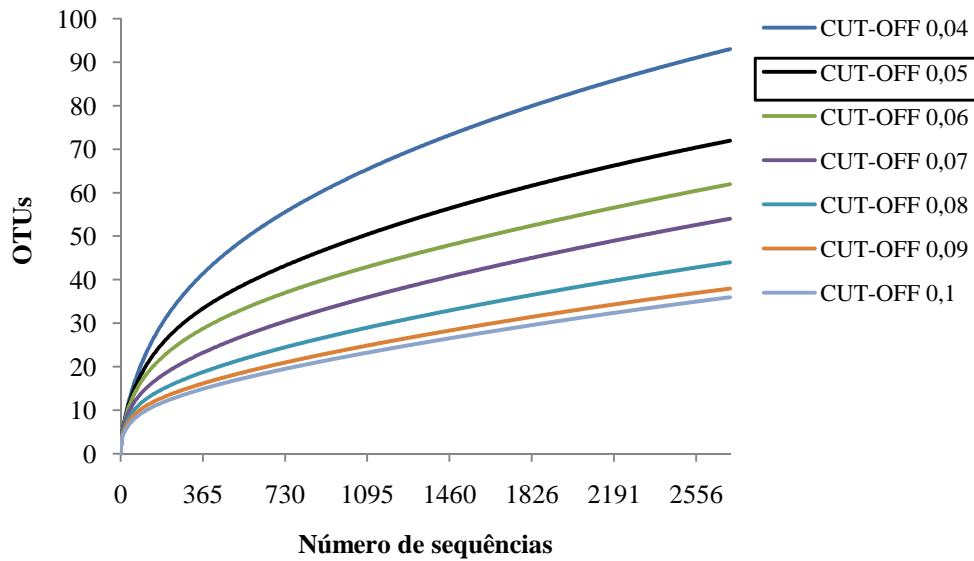


Figura11- Gráfico representativo dos resultados da análise de rareficação realizada para o conjunto de dados obtidos para o Domínio *Bacteria* para a profundidade de 809m

Após submeter o conjunto de pirosequências obtidas para o Domínio *Archaea*, originárias das amostras recolhidas às diferentes profundidades, ao tratamento descrito na secção 2.7.2., obteve-se um *bulk* final com os totais de 3841, 1247 e 2155 pirosequências para as profundidades 255m, 532m e 809m, respectivamente. Cada conjunto de pirosequências foi tratado no "*RDP Pyrosequencing pipeline*" como descrito na secção 2.7.2. Após analisar o gráfico obtido pela relação do número de OTUs *versus* o valor de similaridade a que cada OTU foi determinada (compreendido entre 0.00 e 0.15) - "clustering vs distance cutoff" (Figuras 12, 13 e 14) e os resultados da análise de rareficação para as diferentes profundidades (Figuras 15, 16 e 17). Foi designado o valor de *cutoff* de 0,1% (valor mínimo de 90% de similaridade entre todas pirosequências incluídas em cada OTU) para a determinação das OTUs no Domínio *Archaea* e consequente realização da análise estatística e filogenética das diferentes amostras.

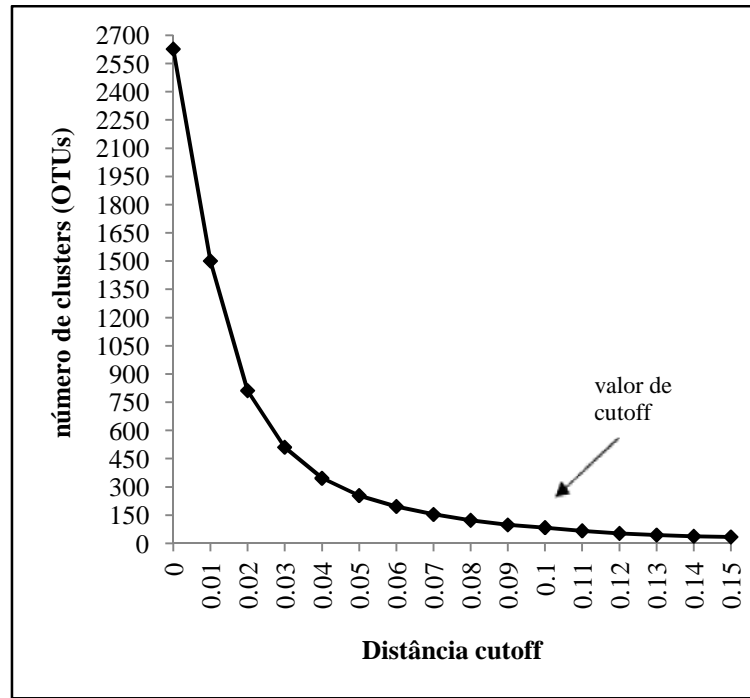


Figura 12- Gráfico representativo dos resultados resultantes do tratamento “Clustering vs distance cutoff” para as pirosequências obtidas para o Domínio *Archaea* para a profundidade 255m.

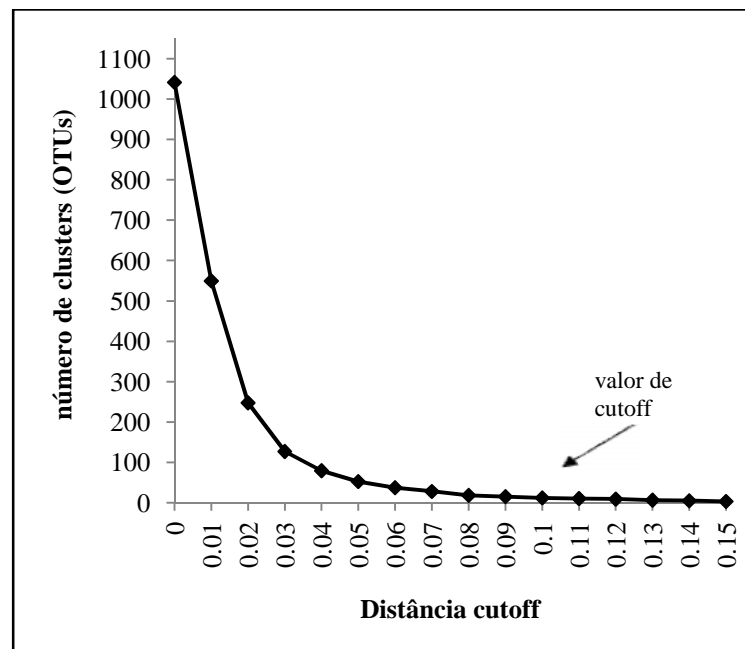


Figura 13- Gráfico representativo dos resultados resultantes do tratamento “Clustering vs distance cutoff” para as pirosequências obtidas para o Domínio *Archaea* para a profundidade 532m

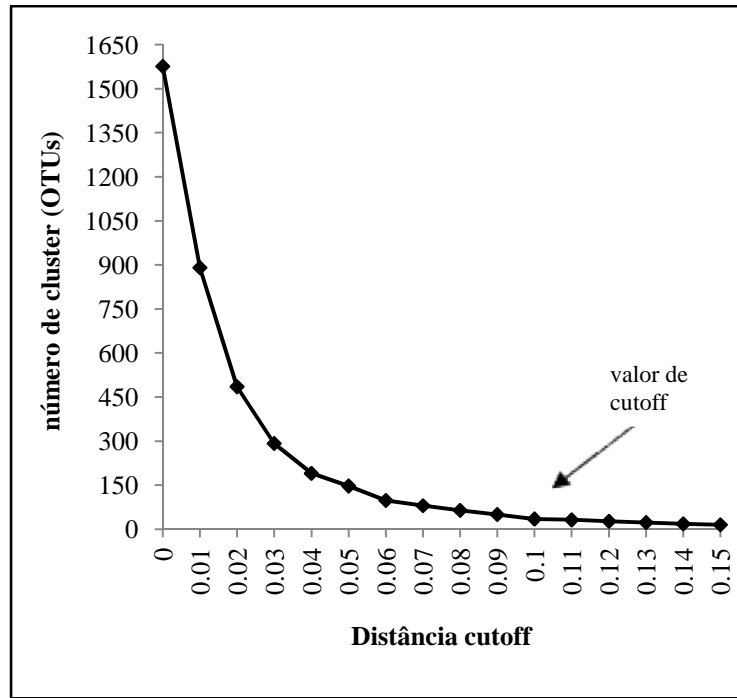


Figura 14- Gráfico representativo dos resultados resultantes do tratamento “Clustering vs distance cutoff” para as pirosequências obtidas para o Domínio *Archaea* para a profundidade 809m

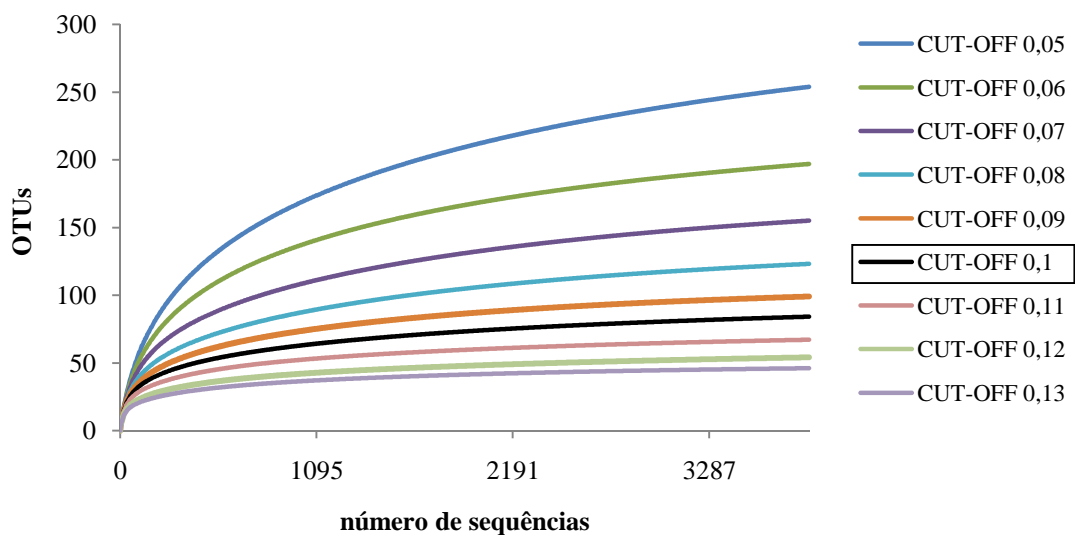


Figura15- Gráfico representativo dos resultados da análise de rarefacção realizada para o conjunto de dados obtidos para o Domínio *Archaea* para a profundidade de 255m

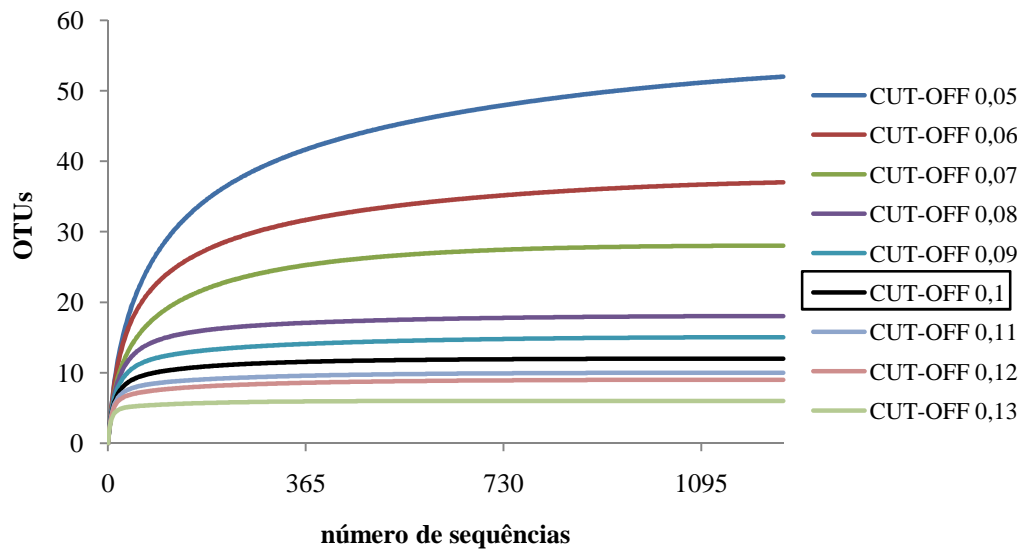


Figura16- Gráfico representativo dos resultados da análise de rareficação realizada para o conjunto de dados obtidos para o Domínio *Archaea* para a profundidade de 532m

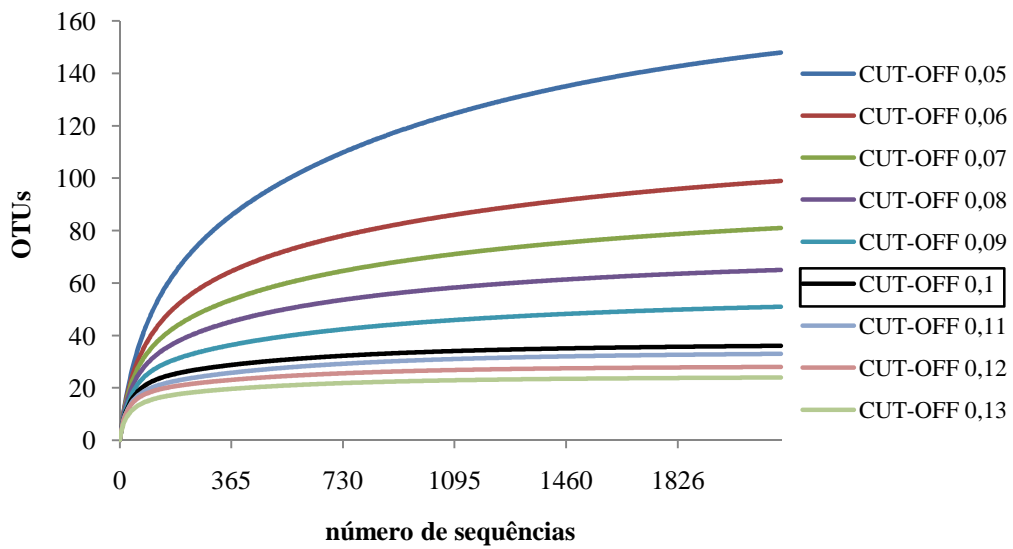


Figura17- Gráfico representativo dos resultados da análise de rareficação realizada para o conjunto de dados obtidos para o Domínio *Archaea* para a profundidade de 809m

3.2.2 Classificação taxonómica das OTUs determinadas para o Domínio Bacteria nas diferentes amostras

A classificação taxonómica das 2103 pirosequências obtidas na profundidade 255m realizada no *RDP Classifier* distribuiu-as por cinco grupos filogenéticos diferentes, nomeadamente os Filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* e *Acidobacteria*. Em relação à profundidade 532m, a classificação taxonómica das 2525 pirosequências distribuiu-as pelos Filos *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Acidobacteria*. Relativamente à profundidade 809m a classificação taxonómica das 2707 pirosequências obtidas distribuiu-as pelos Filos *Proteobacteria* e *Firmicutes* (Tabela X). Transversalmente a todas as amostras, as populações microbianas determinadas eram, na sua grande maioria, filogeneticamente afiliadas com o Filo *Proteobacteria*, mais concretamente com a Classe *Alphaproteobacteria* (Tabela X). Dentro desta Classe três populações foram mais detectadas, nomeadamente os géneros *Sulfitobacter*, *Hyphomonas* e *Erythrobacter* (Figura 18 e Tabela X). O género *Sulfitobacter* (Ordem *Rhodobacterales*, Família *Rhodobacteraceae*), compreendeu 34,62%, 67,62% e 77,26% do total das pirosequências determinadas para as profundidades 255m, 532m e 809m, respectivamente (Figura 18 e tabela X). O género *Hyphomonas* (Ordem *Caulobacterales*, Família *Hyphomanadaceae*), compreendeu 30,70%, 4,43% e 8,18% do total das pirosequências determinadas para as profundidades 255m, 532m e 809m, respectivamente (Figura 18 e Tabela X). O género *Erythrobacter* (Ordem *Sphingomonadales*, Família *Erythrobacteraceae*), por sua vez, representou um total de 2,26%, 17,26% e 8,37% do total das pirosequências determinadas para as profundidades 255m, 532m e 809m, respectivamente (Figura18 e Tabela X).

É, também, de salientar a existência de populações que só foram detectadas a determinada profundidade, como é o caso dos géneros *Bacillus*, *Streptococcus*,

Zunongwangia, *Methylobacterium*, *Pelomonas*, *Methylophaga* e bactérias do grupo *GPI* que só foram detectadas a 255m. Por outro lado, populações pertencentes aos géneros *Maribacter*, *Alcanivorak*, *Idiomaria* e *Pseudoalteromonas*, só foram encontrados na profundidade 532m, enquanto que populações pertencentes aos géneros *Veillonella*, *Sphingobium*, *Roseovarius* e *Halomonas* apenas foram detectadas na profundidade 809m (Tabela X).

As pirosequências determinadas para a profundidade 255m foram distribuídas por 58 OTUs, das quais 13 foram consideradas maioritárias (mais detectadas), pois apresentavam um valor igual ou superior a 0,55% (15 pirosequências 0,55% do total das pirosequências determinadas). Já as pirosequências pertencentes à profundidade 532m foram distribuídas por 41 OTUs, em que dessas, 17 foram consideradas maioritárias, uma vez que possuíam um valor igual ou superior a 0,55% (14 pirosequências 0,55% do total das pirosequências determinadas). Finalmente, as pirosequências obtidas para a profundidade 809m foram distribuídas por 34 OTUs em que 12 foram consideradas maioritárias porque apresentavam um valor igual ou superior a 0,52% (11 pirosequências 0,52% do total das pirosequências determinadas).

RESULTADOS

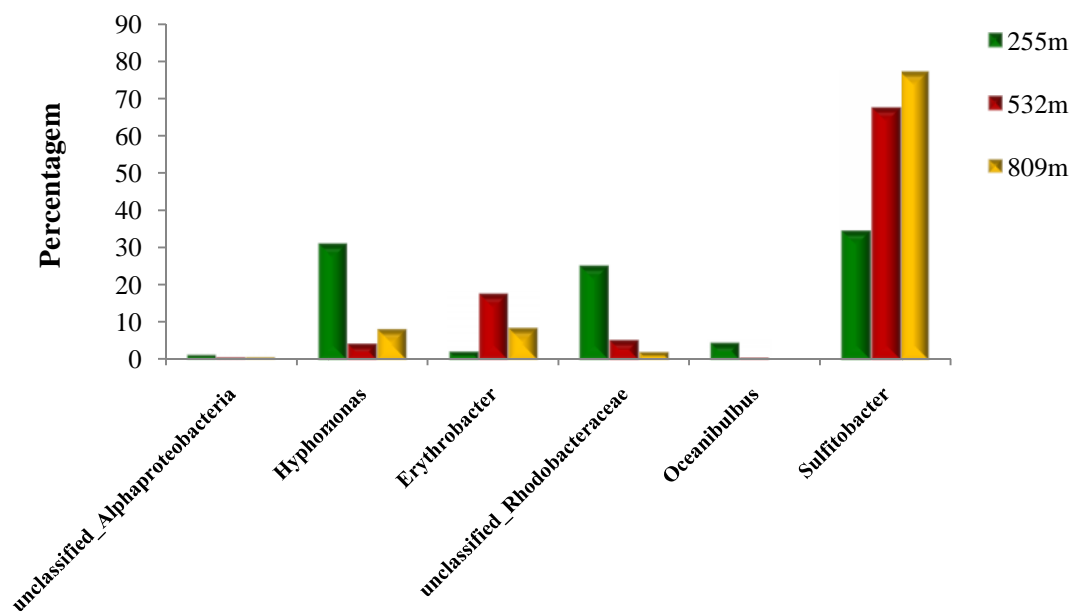


Figura 18- Classificação taxonômica das pirosequências de *Bacteria* obtidas nas diferentes profundidades, realizado no RDP “Classifier

Tabela X- Percentagem relativa de cada grupo filogenético do Domínio *Bacteria* determinado para as diferentes profundidades

Afiliação Filogenética					Amostras		
Filo	Classe	Ordem	Família	Género	255m	532m	809m
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Unclassified_Bacillaceae	0,04 ¹	0,00	0,00
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	0,04	0,00	0,00
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Veillonellaceae	<i>Veillonella</i>	0,00	0,00	0,05
Bacteroidetes	Flavobacteria	Lactobacillales	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	0,04	0,00	0,00
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Maribacter</i>	0,00	0,04	0,00
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Zunongwangia</i>	0,04	0,00	0,00
Proteobacteria	NA ³	NA	NA	Unclassified_"Proteobacteria"	0,15	0,67	0,05
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	NA	NA	Unclassified_Alphaproteobacteria	1,26	0,59	0,62
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	NA	Unclassified_Rhizobiales	0,04	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Aurantimonadaceae	<i>Aurantimonas</i>	0,22	0,63	0,48
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	0,04	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Hyphomonadaceae	Unclassified_Hyphomonadaceae	0,44	0,08	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Hyphomonadaceae	<i>Hyphomonas</i> ²	30,7	4,43	8,18
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	SAR11	<i>Pelagibacter</i>	0,15	0,00	0,05
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingobium</i>	0,00	0,00	1,47
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingopyxis</i>	0,00	0,04	0,05
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	Unclassified_Erythrobacteraceae	0,15	1,5	0,14

¹ Percentagem total das pirosequências obtidas em cada profundidade;² Os três géneros mais detectados nas diferentes profundidades encontram-se a negrito;³ Não aplicável

RESULTADOS

Tabela X- (Cont.) - Percentagem relativa de cada grupo filogenético do Domínio *Bacteria* determinado para as diferentes profundidades

Afiliação Filogenética					Amostras		
Filo	Classe	Ordem	Família	Género	255m	532m	809m
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	<i>Altererythrobacter</i>	0,04 ¹	0,16	0,14
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	<i>Erythrobacter</i> ²	2,26	17,26	8,37
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Unclassified_Rhodobacteraceae	24,82	5,34	2,14
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Oceanibulbus</i>	4,44	0,59	0,05
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Oceanicola</i>	0,04	0,12	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Sulfitobacter</i>	34,62	67,62	77,26
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Roseovarius</i>	0,00	0,00	0,10
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Jannaschia</i>	0,00	0,08	0,14
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Pelomonas</i>	0,04	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	NA ³	NA	unclassified_Gammaproteobacteria	0,07	0,04	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Psychrobacter</i>	0,26	0,28	0,33
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	<i>Methylophaga</i>	0,07	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	NA	unclassified_Oceanospirillales	0,00	0,04	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	<i>Halomonas</i>	0,00	0,00	0,38
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Alcanivoracaceae	<i>Alcanivorax</i>	0,00	0,16	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Idiomarinaceae	<i>Idiomarina</i>	0,00	0,04	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i>	0,00	0,16	0,00
Acidobacteria	Acidobacteria Gp1	NA	NA	<i>Gp1</i>	0,04	0,00	0,00
Verrucomicrobia	Opitutae	Puniceococcales	Puniceococcaceae	unclassified_Puniceococcaceae	0,04	0,00	0,00

¹ Percentagem total das pirosequências obtidas em cada profundidade;

² Os três géneros mais detectados nas diferentes profundidades encontram-se a negrito;

³ Não aplicável

Com a finalidade de verificar se havia estratificação vertical das populações, foi efectuada uma correlação entre as OTUs das diferentes profundidades. Assim, verificou-se que as OTUs da profundidade 255m correspondiam a OTUs das profundidades 532m e 809m. Procedeu-se a uma uniformização da nomenclatura das OTUs mais representativas. E como tal, conseguiu-se observar que a OTU 1 (por exemplo) está presente nas diferentes profundidades, ou seja, a mesma população – OTU está presente nas diferentes profundidades (Tabela XI). Existem, porém, OTUs de uma determinada profundidade que não têm correspondência com OTUs das outras profundidades como é o caso das OTU 5, 11, 13, 15 e 16 (Tabela XI). Assim sendo, é possível verificar que 6 OTUs, nomeadamente as OTUs 1, 3, 5, 7, 11 e 13, são filogeneticamente relacionadas com o género *Sulfitobacter* (Figura19 e Tabela XI). Já as OTUs 2, 4, 10 e 13 são relacionadas filogeneticamente com o género *Hyphomonas* (Figura 19 e Tabela XI). E 5 OTUs, nomeadamente a 8, 15, 16, 17 e 18, estão filogeneticamente relacionadas com o género *Erythrobacter* (Figura 19 e tabela XI).

O género *Sulfitobacter* aumentou a sua proporção com a profundidade, obtendo um total de 77,26% do total das pirosequências determinadas para a profundidade 809m, comparado com o valor de 34,62% e 67,62% do total das pirosequências obtido para as profundidades 255m e 532m, respectivamente (Figura 18, Tabela X). Já o género *Hyphomonas* apresentou o maior valor de detecção na profundidade 255m com um valor de 30,70% do total das pirosequências, diminuindo drasticamente nas profundidades seguintes compreendendo um valor de 4,43% e 8,18% do total das pirosequências obtidas para 532m e 809m respectivamente (Figura 18, tabela X).

O género *Erythrobacter* apresentou um valor de 2,26% na profundidade 255m, verificando-se um incremento para 17,26% do total das pirosequências na profundidade 532m diminuindo, posteriormente a sua proporção na profundidade 809m onde

RESULTADOS

apresentava um valor de 8,37% do total das pirosequências determinadas (Figura 18, Tabela X).

Tabela XI- Correlação encontrada entre as OTUs (determinadas para o Domínio *Bacteria*) e as amostras (profundidade) a que foram observadas. A afiliação filogenética é apresentada para cada uma das OTUs determinadas.

OTUs	Amostras			Afiliação filogenética	% de similaridade
	255m	532m	809m		
1	32,47 ¹	6,89	0,52	<i>Sulfitobacter delicatus</i> , <i>Sulfitobacter dubius</i>	99%
2	23,27	3,33	6,56	<i>Hyphomonas oceanitis</i>	99%
3	5,8	54,55	71,9	<i>Sulfitobacter pontiacus</i>	98%
4	5,5	0,87	ND ²	<i>Hyphomonas oceanitis</i>	96%
5	4,21	ND	ND	<i>Sulfitobacter delicatus</i> , <i>Roseovarius aestuarii</i>	95%
6	2,99	0,87	2,19	Alpha proteobacterium AB576005, HQ336493, FJ467624	92%
7	2,51	0,67	ND	<i>Sulfitobacter delicatus</i> , <i>Sulfitobacter dubius</i> , <i>Marinovum algicola</i>	94%
8	2,03	13,66	2,76	<i>Erythrobacter citreus</i> , <i>Erythrobacter longus</i>	97%
9	0,26	0,63	0,43	<i>Aurantimonas coralicida</i> , <i>Aurantimonas litoralis</i>	94%
10	1,4	0,55	1,05	<i>Hyphomonas jannaschiana</i> , <i>Hyphomonas oceanitis</i>	93%
11	ND	2,81	ND	<i>Sulfitobacter pontiacus</i>	97%
12	0,81	1,03	ND	<i>Sulfitobacter delicatus</i> , <i>Sulfitobacter dubius</i>	98%
13	ND	ND	1,76	<i>Sulfitobacter pontiacus</i>	95%
14	ND	ND	1,38	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	98%
15	ND	2,45	ND	<i>Erythrobacter longus</i>	96%
16	ND	2,45	ND	<i>Erythrobacter longus</i> , <i>Erythrobacter citreus</i>	94%
17	ND	ND	4,33	<i>Erythrobacter ishigakiensis</i> , <i>Erythrobacter longus</i> , <i>Erythrobacter aquimaris</i>	98%
18	ND	ND	1,57	<i>Erythrobacter ishigakiensis</i> , <i>Erythrobacter longus</i> , <i>Erythrobacter aquimaris</i>	98%

¹ Valores que correspondem à percentagem total relativa de cada amostra

² ND - não detectada

RESULTADOS

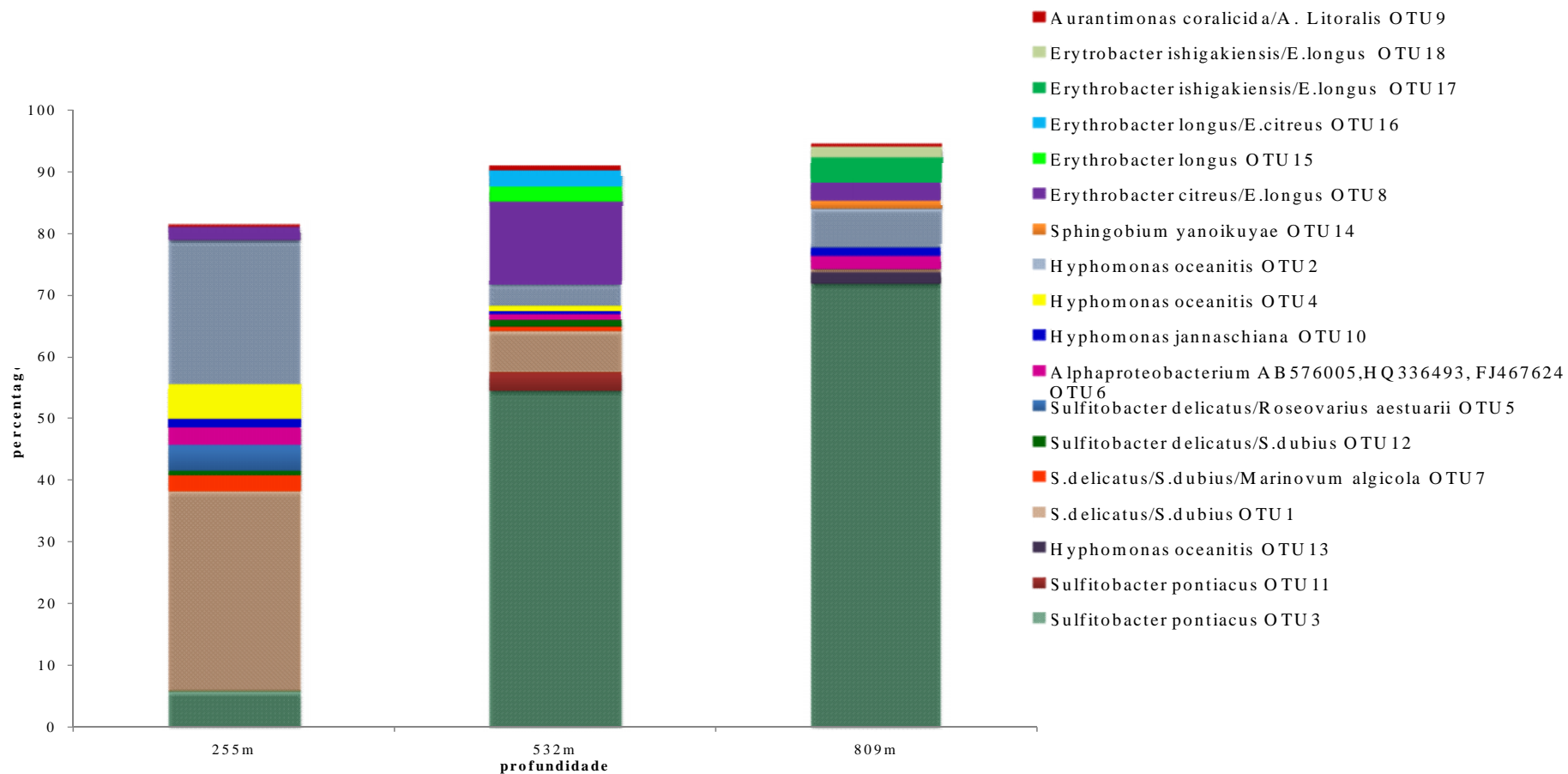


Figura 19- Gráfico de barras referente aos valores de percentagem relativa das diferentes OTUs maioritárias, determinadas para o Domínio *Bacteria*, nas diferentes profundidades. Os valores absolutos são os apresentados na Tabela XI.

3.2.3. Classificação taxonómica das OTUs determinadas para o Domínio

Archaea nas diferentes amostras

A classificação taxonómica das pirosequências obtidas nas diferentes profundidades realizada no *RDP Classifier* distribuiu-as em três grupos, dois puderam ser classificados como pertencendo aos Filos *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota* (Figura 20; Tabela XII). O filo *Euryarchaeota* englobou um total de 38,52%, 37,98% e 46,84% das pirosequências nas profundidades 255m, 532m e 809m, respectivamente, enquanto que o filo *Crenarchaeota* compreendeu um valor de 1,38%, 1,28% e 1,29% das pirosequências para as profundidades 255m, 532m e 809m, respectivamente (Figura 20 e Tabela XII). Porém o terceiro grupo representou uma grande percentagem de pirosequências que não foi filogeneticamente classificada, uma vez que não apresentavam suficiente relação filogenética com isolados do Domínio *Archaea* para que tal acontecesse. Assim foram denominadas por “unclassified- Archaea”, obtendo-se 59,12%, 59,46% e 49,61% das pirosequências determinadas para as profundidades 255m, 532m e 809m, respectivamente (Figura 20 e Tabela XII).

As pirosequências determinadas para a profundidade 255m foram distribuídas por 84 OTUs, das quais 18 foram consideradas maioritárias (mais detectadas), pois apresentavam um valor igual ou superior a 1,92% (74 pirosequências 1,92% do total das pirosequências determinadas). Já as pirosequências pertencentes à profundidade 532m foram dispostas por 12 OTUs, todas elas foram consideradas representativas das populações determinadas. Finalmente, as pirosequências obtidas para a profundidade 809m foram distribuídas por 36 OTUs em que 18 foram consideradas maioritárias uma vez que apresentavam um valor percentual igual ou superior a 1,66% (36 pirosequências 1,66% do total das pirosequências determinadas).

RESULTADOS

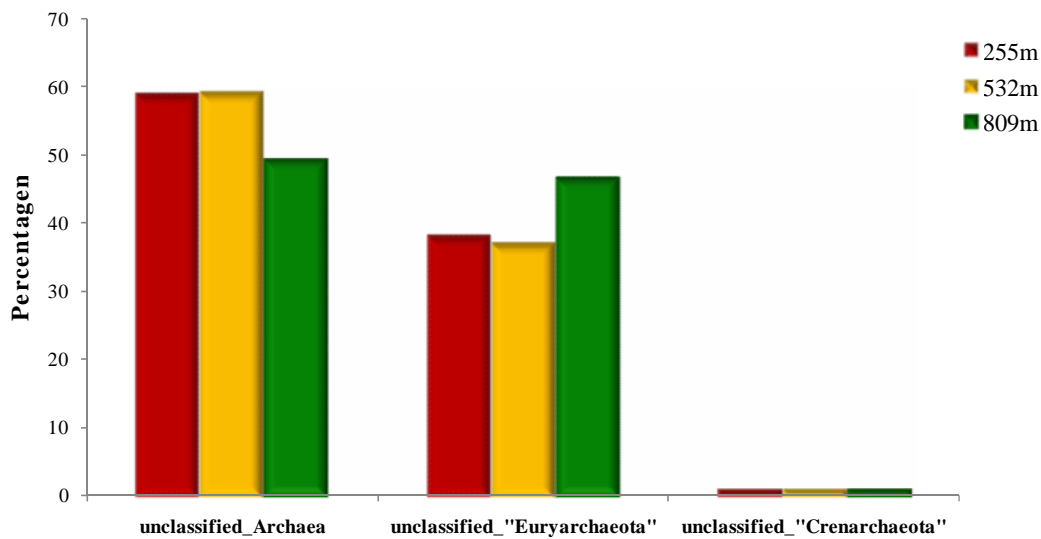


Figura20- Classificação taxonômica das pirosequências de *Archaea* obtidas nas diferentes profundidades, realizada no *RDP Classifier*

É possível verificar que na profundidade 532m há uma diminuição da diversidade microbiana, pois esta profundidade é a que apresenta menor número de OTUs contrastando com o maior número de OTUs determinadas nas profundidades 255m e 809m, sendo a profundidade 255m a que apresenta maior diversidade microbiana (Figura 21). Embora haja esta discrepância no número de OTUs de cada profundidade, a relação filogenética dessas OTUs mantém-se praticamente a mesma, estando sempre relacionadas com os mesmos grupos de sequências de não cultivados, ou as mesmas sequências de organismos não cultiváveis (Tabela XVIII). No entanto, todas as OTUs determinadas nas diferentes profundidades estão filogeneticamente relacionadas com sequências determinadas a partir de amostras recolhidas de ambientes marinhos (Tabela XVIII).

Tabela XII- Afiliação filogenética das pirosequências determinadas para o Domínio *Archaea* nas diferentes profundidades

Afiliação filogenética					Amostras		
Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	255m	532m	809m
ND ²	ND	ND	ND	unclassified_Archaea	59,12 ¹	59,46	49,61
Euryarchaeota	ND	ND	ND	unclassified_"Euryarchaeota"	38,57	37,98	46,84
Euryarchaeota	Thermoplasmata	Thermoplasmatales	ND	unclassified_Thermoplasmatales	0,65	0,40	1,76
Euryarchaeota	Thermoplasmata	Thermoplasmatales	Thermoplasmatales_incertae_sedis	Thermogymnomonas	0,21	0,32	0,18
Euryarchaeota	Methanomicrobia	ND	ND	unclassified_"Methanomicrobia"	0,03	0,40	0,23
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Halobacteriales	Halobacteriaceae	unclassified_Halobacteriaceae	0,05	0,00	0,05
Crenarchaeota	Thermoprotei	ND	ND	unclassified_Thermoprotei	1,38	1,28	1,29
Crenarchaeota	Thermoprotei	Desulfurococcales	ND	unclassified_Desulfurococcales	0,00	0,00	0,05

¹ Percentagem total das pirosequências obtidas em cada profundidade;

² Não aplicável;

RESULTADOS

Tabela XIII- Correlação encontrada entre as OTUs (determinadas para o Domínio *Archaea*) e as amostras (profundidade) a que foram observadas. A afiliação filogenética é apresentada para cada uma das OTUs determinadas

OTUs (percentagem)			Afiliação filogenética	% de similaridade
255m	532m	809m		
3 (6,29 ¹)				
13 (7,02)	1(32,24)	24 (5,54)	Uncultured marine crenarchaeote clones	90 - 100
36 (5,98)				
47 (7,67)				
4 (2,44)				
24 (3,41)	2(6,58)	2 (18,52)	Uncultured marine group I crenarchaeote	ND ²
16 (4,32)				
16 (4,33)	10 (2,33)	2 (18,52)	Uncultured marine group I crenarchaeote	ND
25 (1,92)		19 (2,63)		
39 (1,82)		15 (2,49)		
NE ³		26 (2,4)		
29 (2,81)	3 (15,8)	38 (4,39)	Uncultured marine group II euryarchaeote	89 - 99
		30 (3,83)		
28 (2,96)		14 (2,86)		
		5 (7,34)		

¹ Entre parênteses, percentagem total das pirosequências obtidas em cada profundidade

² Não determinada. As distâncias seriam dificilmente determinadas para todas as OTUs

³ Não encontrada

Tabela XIII (Cont.) - Correlação encontrada entre as OTUs (determinadas para o Domínio *Archaea*) e as amostras (profundidade) a que foram observadas. A afiliação filogenética é apresentada para cada uma das OTUs determinadas

OTUs (percentagem)			Afiliação filogenética	% de similaridade
255m	532m	809m		
10(3,59 ¹) 14(6,03)	4(12,51)	7(2,49)	Uncultured marine group I crenarchaeote	ND ²
27(4,5)	5(13,31)	1(9,47) 17(2,17)	Uncultured marine group I crenarchaeote	ND
NE ³	6(4,41)	27(1,66)	Uncultured archaeon clone 670m_Arch4_0,5 16S (EU817643)	90- 95
20(0,21) 9(0,68)	7(4,73)	9(7,85) 20(2,17)	Uncultured archaeon clone CWP-F10 (HQ529906)	87- 97
5(4,08)	8(0,88)	NE	Uncultured marine group I crenarchaeote	ND
7(4,42) 8(2,96)	9(6,34)	NE 11	Uncultured marine group I crenarchaeote	ND
12(3,77) 32(4,6)	11(0,64)	NE NE	Uncultured marine group I crenarchaeote	ND

¹ Entre parênteses, percentagem total das pirosequências obtidas em cada profundidade

² Não determinada. As distâncias seriam dificilmente determinadas para todas as OTUs

³ Não encontrada

RESULTADOS

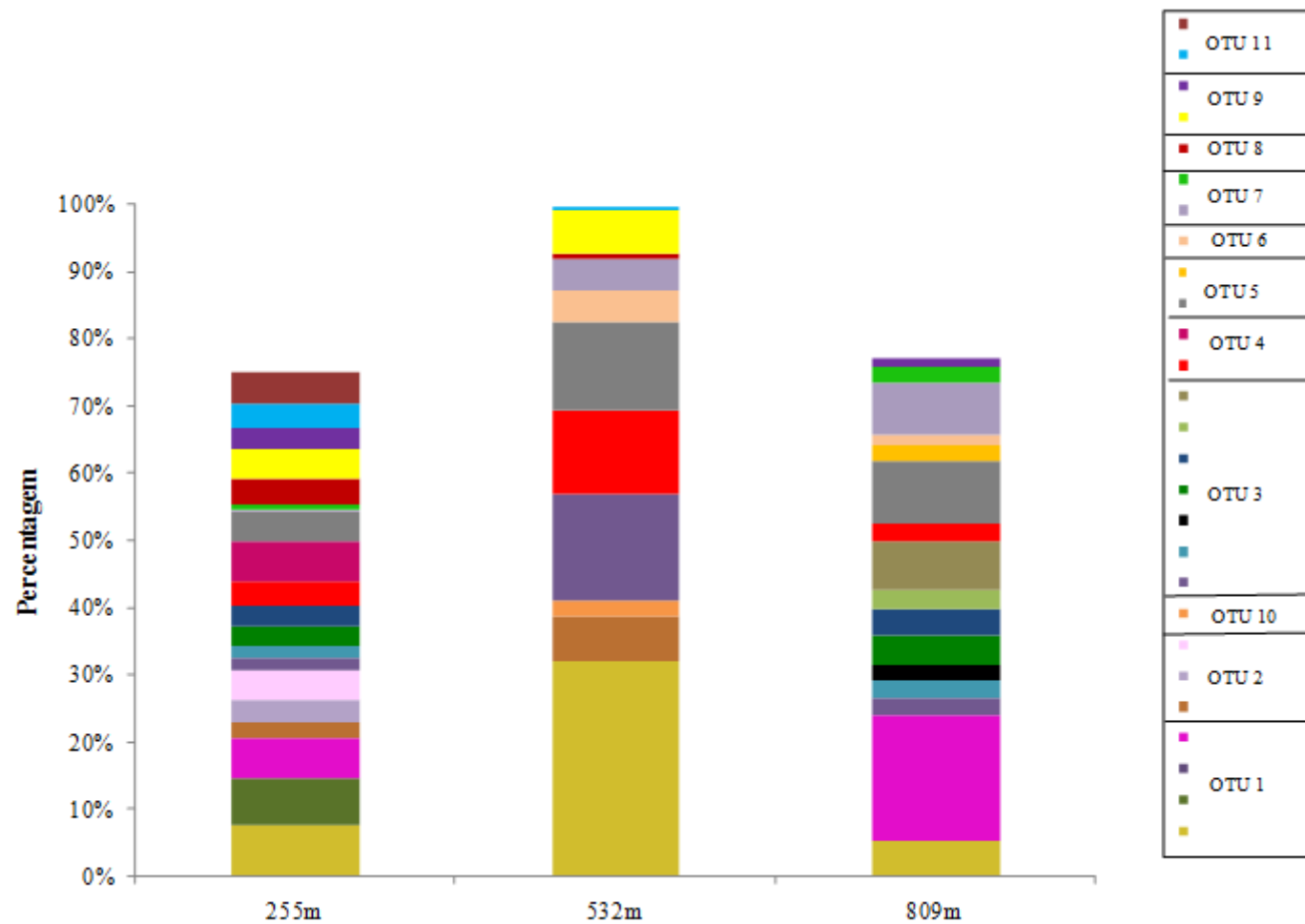


Figura 21- Gráfico de barras referente aos valores de percentagem relativa das diferentes OTUs maioritárias determinadas, para o Domínio *Archaea*, nas diferentes profundidades. Os valores absolutos são os apresentados na Tabela XIII

3.2.4. Análise estatística dos resultados obtidos por pirosequenciação

Os valores da análise estatística dos resultados da pirosequenciação para o Domínio *Bacteria* obtidos para as diferentes profundidades estão indicados na Tabela XIV. O valor calculado de “Coverage” indicou que, aparentemente, a maioria da diversidade bacteriana foi abrangida por este conjunto de dados. A análise das curvas de rarefacção construídas para as diferentes profundidades (Figuras 9, 10 e 11) mostrou que aparentemente o ponto de saturação foi encontrado (ao valor de *cutoff* de 0.05) para as diferentes profundidades. Os valores determinados para o índice de Shannon (H') e o valor máximo deste índice (H' Max) para as diferentes profundidades indicaram que um elevado nível de diversidade bacteriana foi obtido nas diferentes amostras (Tabela XIV). O valor obtido para a equitabilidade de Shannon mostrou a existência de algum grau de uniformidade nas populações determinadas, mas pode ser também interpretado como indicativo da presença de populações majoritárias nas diferentes profundidades (tabela XIV). A variação no número de OTUs (valor S na tabela XV) e as suas percentagens relativas determinadas para as diferentes profundidades (Tabela X) com um *cut-off* de 0.05 corrobora esta observação. O índice de similaridade de Sørensen entre as diferentes amostras foi determinado para o Domínio *Bacteria* (Tabela XVI). Os valores obtidos indicam a presença de relativa uniformidade na identidade das populações determinadas nas diferentes profundidades.

Tabela XIV- Índices de similaridade aplicados aos resultados obtidos por pirosequenciação para as diferentes profundidades para o Domínio *Bacteria*

Análise estatística	Amostras		
	255m	532m	809m
Coverage	97,85	98,38	98,38
Índice de Shannon (H')	2,15	2,83	2,36
S = número total de OTUs	58	41	34
H max = ln de S	4,06	3,71	3,53
Equitabilidade de Shannon	0,53	0,76	0,67

RESULTADOS

Os valores da análise estatística dos resultados da pirosequenciação para o Domínio *Archaea* obtidos para as diferentes profundidades estão indicados na Tabela XV. O valor calculado de “Coverage” indicou que, aparentemente, a maioria da diversidade de arqueias foi abrangida por este conjunto de dados. A análise das curvas de rarefacção construídas para as diferentes profundidades (Figuras 15, 16 e 17) mostrou que aparentemente o ponto de saturação foi encontrado (ao valor de *cut-off* de 0.1) para as diferentes profundidades. Os valores determinados para o índice de Shannon (H) e o valor máximo deste índice (H' Max) para as diferentes profundidades indicaram que um elevado nível de diversidade de arqueias foi obtida nas profundidades 255m e 809m, e que embora elevado, um menor nível de diversidade foi determinado na profundidade 532m (Tabela XV). O valor obtido para a equitabilidade de Shannon mostrou existir um elevado grau de uniformidade nas populações determinadas nas profundidades 255m e 809m, contrastando com o que pode ser interpretado como indicativo da presença de populações maioritárias na profundidade 532m (Tabela XV). A variação no número de OTUs (valor S na tabela XV) e as suas percentagens relativas determinadas para as diferentes profundidades (Tabela XIII) com um *cut-off* de 0.1 corrobora estas observações. O valor do índice de similaridade de Sørensen entre as diferentes amostras foi determinado para o Domínio *Archaea* (Tabela XVI), indicando a presença de uniformidade na identidade das populações determinadas nas diferentes profundidades.

Tabela XV- Índices de similaridade aplicados aos resultados obtidos por pirosequenciação para as diferentes profundidades para o Domínio *Archaea*

Análise estatística	Amostras		
	255m	532m	809m
Coverage	97,81	99,04	98,17
Índice de Shannon (H)	4,47	1	3,87
S = número total de OTUs	84	12	36
H max = ln de S	4,43	2,48	3,58
Equitabilidade de Shannon	0,97	0,40	0,95

Tabela XVI - Índice de similaridade de Sørensen aplicado aos resultados obtidos por pirosequenciação para as diferentes profundidades para os Domínios *Bacteria* e *Archaea*.

Amostras	Versus		
	255m	532m	809m
255m	-	0,75 ^b	0,7 ^b
532m	0,89 ^a	-	0,77 ^b
809m	0,87 ^a	0,85 ^a	-

^a valores que correspondem ao Domínio *Archaea*

^b valores que correspondem ao Domínio *Bacteria*

3.3. Ciclo Calvin- Benson- Bassham (ciclo CBB)

Os genes que codificam duas das formas distintas de RubisCO, nomeadamente os genes *cbbL* e *cbbM* que codificam a forma I e II, respectivamente, foram pesquisados nas amostras das diferentes profundidades a fim de verificar a presença do ciclo CBB. A especificidade da abordagem foi confirmada, uma vez que todos os clones sequenciados eram afiliados com sequências de RubisCO. A forma II não foi detectada nas diferentes profundidades apesar da realização de vários programas de PCR sujeitos a diferentes condições. A forma I de RubisCO foi detectada, e todas as sequências obtidas dos vários *set* de primers formavam um cluster com vários “phylotypes”. Este cluster tinha uma alta afiliação filogenética com sequências de bactérias pertencentes ao Filo *Proteobacteria*, e mais especificamente à sequência de *cbbL* encontrada em bactérias quimiolitotróficas da espécie *Thiobacillus sajanensis* (Figura 22).

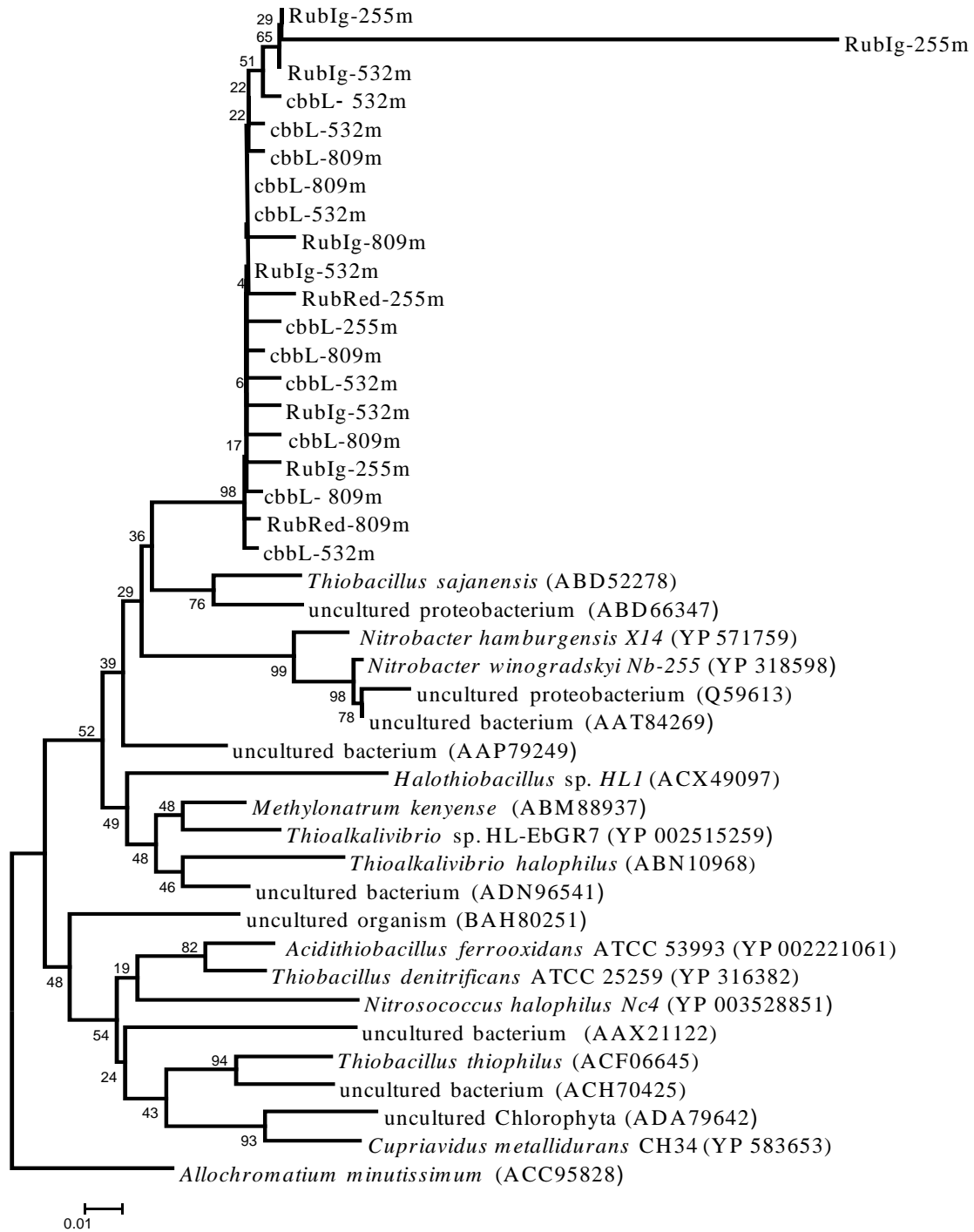


Figura 22 - Análise filogenética das sequências traduzidas do gene *cbbL* de clones obtidos para as diferentes profundidades em relação a sequências traduzidas do gene *cbbL* obtidas do GenBank. Os valores *bootstrap* de 1000 réplicas são indicados antes de cada ponto da ramificação da árvore. A barra da escala representa o número calculado de alterações por posição de amino ácido.

4.DISSCUSSÃO E CONCLUSÕES FINAIS

4.1. Análise dos resultados obtidos por DGGE e pirosequenciação dos Domínios Bacteria e Archaea

A simples observação dos perfis de DGGE (Figura 5) obtidos, permitiu verificar que, para ambos os Domínios: *Bacteria* e *Archaea*, estavam presentes os mesmos grupos filogenéticos nas diferentes profundidades no *spot* estudado. Esta observação foi corroborada pelos resultados obtidos da análise por pirosequenciação do gene 16S RNAr. No que diz respeito aos resultados obtidos por DGGE directo e DGGE reamplificado, de facto não se observam diferenças entre os perfis e isto pode ser indicativo de que a utilização de um *set* de primers universais que cobrem quase a totalidade do gene 16S RNAr para uma primeira amplificação, seguido de uma reamplificação com os primers específicos para a análise de DGGE não influencia a determinação da diversidade microbiana obtida por esta técnica, pelo menos neste ambiente.

Em relação à análise dos dados obtidos por pirosequenciação, a presença de populações dominantes foi verificada no Domínio *Bacteria*, e esta observação foi suportada pelos valores obtidos na análise da equitabilidade de Shannon's determinada para cada profundidade: 0,53, 0,76 e 0,67 para as profundidades 255m, 532m e 809m respectivamente.

As populações que parecem constituir a esmagadora maioria da comunidade bacteriana na zona mesopelágica estudada são filogeneticamente afiliadas com a Classe *Alphaproteobacteria* que são muito frequentes em ecossistemas marinhos. Bactérias pertencentes ao grupo geralmente designado por *Roseobacter* que incluem, entre outras, as bactérias da família *Rhodobacteraceae* constituem cerca de 15-20% das populações bacterianas presentes nos oceanos, distribuindo-se quer por zonas costeiras quer em oceano aberto e fundos marinhos. Bactérias deste grupo são encontradas quer “livres”,

quer associadas a partículas inorgânicas ou a organismos marinhos de vários tipos (Buchan *et al.*, 2005). Curiosamente estudos recentes levantam a hipótese de membros das *Rhodobacterales* poderem constituir colonizadores primários de superfícies de vários tipos (Dang *et al.*, 2008). A colonização de superfícies por bactérias parece representar uma estratégia importante e universal em ambientes aquáticos nomeadamente marinhos (Dang *et al.*, 2008). Este facto, e as características destes grupos bacterianos podem, talvez, explicar a dominância de *Rhodobacterales* encontrada no *spot* estudado. Neste local particular, o fundo oceânico encontrava-se muito próximo da profundidade a que foi realizada a amostragem de 809 m (a profundidade máxima verificada foi de 863 m). Assim pode colocar-se como hipótese que a movimentação do ROV, que sempre causa algum distúrbio, possa eventualmente ter levantado sedimentos que poderiam ajudar a explicar as variações quer de percentagem quer de afiliação filogenética da principal OTU detectada na amostragem realizada a maior profundidade.

As populações obtidas nas diferentes profundidades estavam, maioritariamente, filogeneticamente afiliadas com o género *Sulfitobacter* (ordem *Rhodobacterales*). Este género foi, sem dúvida, o grupo mais dominante, compreendendo um valor de 34,62%, 67,62% e 77,26% do total das pirosequências determinadas para as profundidades 255m, 532m e 809m, respectivamente estando representado pelo maior número de OTUs nomeadamente pelas OTUs 1, 3, 5, 11, 12 e 13. Os membros deste género são heterotróficos, oxidam sulfito, enxofre e Mn(II) e têm sido isolados de *habitats* tais como o mar mediterrâneo e lagos hipersalinos (Prabakaran *et al.*, 2006; Templeton *et al.*, 2005; Sorokin. 2002).

O facto de certas populações só surgirem numa determinada profundidade como é o caso de *Bacillus*, *Streptococcus*, *Zunongwangia*, *Methylobacterium*, *Pelomonas*,

Methylophaga e bactérias do grupo *GPI* (apenas detectadas a 255m), *Maribacter*, *Alcanivorak*, *Idiomaria* e *Pseudoalteromonas*, (apenas detectadas a 532m) e *Veillonella*, *Sphingobium*, *Roseovarius* e *Halomonas* (apenas detectadas a 809m) pode ser indicativo de uma resposta desses microrganismos a variações encontradas nas diferentes profundidades da zona mesopelágica. Por outro lado, a estratificação vertical foi verificada nas diferentes profundidades pelas OTUs : 1, 2, 3, 6, 8, e 10 que compreendiam os géneros *Sulfitobacter*, *Hyphomonas* e *Erythrobacter*. O género *Sulfitobacter* aumentava a sua proporção com a profundidade, enquanto que o género *Hyphomonas* foi mais abundante na profundidade 255m, diminuindo nas profundidades seguintes. Já o género *Erythrobacter*, mantinha-se constante nas duas profundidades mais elevadas, sendo a sua proporção menor na profundidade 255m.

A diversidade microbiana bacteriana diminuía com a profundidade, pois o número de OTUs determinadas diminuía com a profundidade e pode ser comprovado pelo valor de *S* das diferentes profundidades: 58, 41 e 34 para as profundidades 255m, 532m e 809m, respectivamente. Isto dever-se-á, provavelmente à disponibilidade de oxigénio e nutrientes ser eventualmente mais escassa com o aumento da profundidade, a temperatura ser mais baixa e haver aumento da pressão, o que poderá condicionar, o estabelecimento de algumas populações microbianas (Qian *et al.*, 2010).

Em relação ao Domínio *Archaea*, a análise dos dados obtidos por pirosequenciação mostrou a presença de populações dominantes, especialmente na profundidade 532m, e esta observação foi suportada pela Equitabilidade de Shannon's determinada para cada profundidade: 0,97, 0,40 e 0,95 para as profundidades 255m, 532m e 809m respectivamente. A população microbiana de archaeas nas diferentes amostras foi dominada pelo Filo *Euryarchaeota*. Todas as OTUs determinadas nas diferentes profundidades estavam filogeneticamente afiliadas com sequências de microrganismos

não cultiváveis de ambientes marinhos. A OTU 1 determinada para a profundidade 532m, que compreendia 32,24% do total das pirosequências (correlacionada com a OTU 24 da profundidade 809m e com as OTUs 3, 13, 36 e 47 da profundidade 255m) apresentava sequências que estavam relacionadas com sequências que foram isoladas do Pacífico Sul e que lhes foi imputada uma possível actividade oxidativa da amónia.

A diversidade de archaeas foi mais elevada nas profundidades mais extremas, isto é nas profundidades 255m e 809m e foi mais baixa na profundidade intermédia.

Algumas limitações técnicas podem ter afectado os resultados, nomeadamente no que diz respeito ao Domínio *Archaea*, pois não foram classificadas uma grande percentagem de pirosequências, 59,12%, 59,46% e 49,61%, para as profundidades 255m, 532m e 809m, respectivamente. Tal facto, pode dever-se, provavelmente, à escolha do *set* de primers usados, e/ou às condições de amplificação do gene 16S RNAr que poderiam ter influenciado a diversidade microbiana detectada (Donachie *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2009). Outra explicação será, que esta grande percentagem de pirosequências não identificadas poderá reflectir uma comunidade desconhecida de archaeas no *spot* estudado.

A não ocorrência de cianobactérias era, como se compreende, um facto esperado, e a maioria das pirosequências detectadas relacionam-se com organismos heterotróficos embora muitos elementos das *Alphaproteobacteria* possuam metabolismos autotróficos.

4.2. Fixação autotrófica de carbono - Ciclo de Calvin- Benson- Bassham

(ciclo CBB)

Apenas sequências pertencentes à forma I de RubisCO foram detectadas nas três diferentes profundidades no *spot* estudado. Como previamente abordado na secção 1.3.1, a forma I de RubisCO tem alta afinidade para CO₂ contrastando com a baixa afinidade determinada para a forma II de RubisCO (Tabita *et al.*, 2007). A forma I de

RubisCO detectada pode estar melhor adaptada para microrganismos habitem em ambientes marinhos em que o CO₂ pode ser escasso, como provavelmente acontecerá na zona mesopelágica estudada. Embora a forma I de RubisCO seja a mais abundante na Biosfera (Tabita *et al.*, 2008), a diversidade encontrada no *spot* da zona mesopelágica foi baixa formando um cluster com vários “phylotypes, mas com elevada similaridade. De facto, a detecção de apenas este cluster da forma I de RubisCO poderá ser o resultado de pressões selectivas que levam à selecção natural de microrganismos com esta forma da enzima. Isto pode significar que: ou muito poucos organismos são adaptados para fixar CO₂ no *spot* (via ciclo CBB) e/ou que uma versão específica da forma I de RubisCO é mais adequada para realizar essa tarefa. Além disso, as populações autotróficas encontraram-se em tão baixa concentração que talvez, não puderam ser detectadas pela análise por pirosequenciação. No entanto, as populações maioritárias que foram anteriormente determinadas pertenciam ao Filo *Proteobacteria*, nomeadamente ao anteriormente referido grupo *Roseobacter* que inclui muitas linhagens com capacidade autotrófica (Newton *et al.*, 2010).

4.3. Conclusões Finais

Os resultados obtidos no presente estudo parecem confirmar, resultados de outros estudos que referem que a zona mesopelágica, não será seguramente a zona oceânica onde a produção primária, terá a relevância fundamental na sustentabilidade dos ecossistemas marinhos. Antes pelo contrário, tudo parece indicar que nesta zona existem populações microbianas que asseguram funções diversificadas no ecossistema. De facto, os principais grupos filogenéticos detectados foram também detectadas noutras zonas mesopelágicas estudadas (proteobactérias –linhagem das roseobactérias) e são consideradas “generalistas” do ponto de vista ecológico. Para além disso, foi

possível detectar algum grau de endemismo, uma vez que a análise filogenética mais detalhada parece demonstrar a existência de géneros (*Sulfitobacter*) que podem não ser muito comuns noutros locais, e mais, ainda se nota a existência de variações nas populações mais comuns a diferentes profundidades. Tal facto, deve estar associado com as características abióticas quer do local estudado, quer de variações dessas características em relação à profundidade.

Finalmente, deve reconhecer-se que o estudo aqui apresentado comporta, as dificuldades e limitações inerentes e comuns a estudos deste tipo, principalmente: dificuldades de amostragem, dificuldades de comparação com *spots* mais ou menos próximos, as limitações reconhecidas nas metodologias independentes de cultivo para o estudo de comunidades microbianas e até dificuldades de resolução filogenética da maioria dos grupos microbianos detectados neste tipo de ambientes. Neste contexto, ele deve ser encarado como mais um contributo, para a construção do grande “puzzle” que é a compreensão da diversidade e do funcionamento dos ecossistemas marinhos.

5.BIBLIOGRAFIA

- Acinas. S.G., Sarma-Rupavtarm. R., Klepac-Ceraj. V., Polz. M.F. (2005). "PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample". *Appl. Environ. Microbiol*, **71**, 8966-8969
- Alfreider. A., Vogt. C., Geiger-Kaiser. M & Psenner. R. (2009). "Distribution and diversity of autotrophic bacteria in groundwater systems based on the analysis of RuBisCO genotypes". *Syst Appl Microbiol*, **32**, 140-150.
- Auguet. J-C., Borrego. C. M., Bañeras. L. & Casamayor. E. O. (2008). "Fingerprinting the genetic diversity of the biotin carboxylase gene (accC) in aquatic ecosystems as a potential marker for studies of carbon dioxide assimilation in the dark". *Environ Microbiol*, **10**, 2527-2536.
- Badger. M.R., Beck. E.J. (2008). "Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO₂ acquisition by the CBB cycle". *Journal of Experimental Botany*, **59**, 1525–1541.
- Berg. I. A., Kockelkorn. D., Buckel. W & Fuchs. G. (2007). "A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in Archaea". *Science*, **318**, 1782-1786.
- Berg. I. A., Kockelkorn. D., Ramos-Vera. W. H., Say. R. F., Zarzycki. J., Hügler. M., Alber. B. E & Fuchs. G. (2010). "Autotrophic carbon fixation in archaea". *Nat Rev Microbiol*, **8**, 447-660.
- Buchan. A., González. J. M., Moran. M. (2005). "Overview of the Marine *Roseobacter* Lineage". *American Society for Microbiology*, **71**, 5665 – 5677.
- Callaway. T. R., Dowd S. E. (2009). "Evaluation of the bacterial diversity in cecal contents of laying hens fed various molting diets by using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing." *Poult Sci* **88**, 298-302.

BIBLIOGRAFIA

- Campbell. B. J., Cary. S. (2004). "Abundance of Reverse Tricarboxylic Acid Cycle Genes in Free-Living Microorganisms at Deep-Sea Hydrothermal Vents". *Applied and environmental microbiology*, **70**, 6282-6289.
- Campbell. B.J., Engel. A.S., Porter. M.L., Takai. K. (2006). "The versatile epsilonproteobacteria: key players in sulphidic habitats." *Nat Rev Microbiol*, **4**, 458-468.
- Campbell. B. J., Stein. J.L., Cary. S.C. (2003). "Evidence of chemolithoautotrophy in the bacterial community associated with *Alvinella pompejana*, a hydrothermal vent polychaete." *Appl Environ Microbiol*, **69**, 5070-5078.
- Dang. H., Li. T., Chen. M., Huang. G. (2008). "Cross-Ocean Distribution of *Rhodobacterales* Bacteria as Primary Surface Colonizers in Temperate Coastal Marine Waters", *American Society for Microbiology*, **74**, 52-60.
- DeLong. E. F., Preston. C.M., Mincer. T., Rich. V., Hallam. S. J., Frigaard. N., Martinez. A., Sullivan. M. B., Edwards. R., Brito. B. R., Chisholm. W., Karl. M. D. (2006). "Community Genomics Among Stratified Microbial Assemblages in the Ocean's Interior". *Science*, **311**, 496 - 502.
- Denis. M., Martin. V., Andersen. M. (2000). "Short-term variations of the vertical distribution of cyanobacteria in the open Mediterranean sea". *Scientia Marina*, **64**, 157-163.
- Donachie. S.P., Foster. J.S., Brown .M.V. (2007). "Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity". *ISME J*, **1**, 97-99.
- Dowd. S. E., Callaway. T. R. (2008). "Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP)." *BMC Microbiol* **8**, 125.
- Eloe. E. A., Fadrosch. D. W., Novotny. M., Allen. L. Z., Kim. M., Lombardo. M., Yee-Greenbaum. J., Yooseph. S., Allen. E. E., Lasken. R., Williamson. S. J., Bartlett.

- D. H. (2011). “Going Deeper: Metagenome of a Hadopelagic Microbial Community”. *Plos one*, **6**, 1-15.
- Ellis R.J. (1979). “The most abundant protein in the world”. *Trends Biochem. Sci.* **4**, 241–244.
- Elsaied. H., Naganuma. T. (2001). “Phylogenetic diversity of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit Genes from Deep-Sea Microorganisms”. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 1751-1765.
- Galand. P. E., Potvin. M., Casamayor. E. O., Lovejoy. C. (2010). “Hydrography shapes bacterial biogeography of the deep Arctic Ocean”. *International Society for Microbial Ecology*, **4**, 564 – 576.
- Giri. B. J., Bano. N., Hollibaugh. J. T. (2004). “Distribution of Rubisco genotypes along a redox gradient in Mono Lake, California”. *Appl Environmental Microbiology*, **70**, 3443-3448.
- Good. I.J. (1953). “The population frequencies of species and the estimation of population parameters”. *Biometrika*, **40**, 237- 264.
- Handelsman. J. (2004). “Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms”. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**, 669-685.
- Hanson T.E., Tabita F.R. (2001). “A ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO)-like protein from *Chlorobium tepidum* that is involved with sulfur metabolism and response to oxidative stress”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4397-4402.
- Hall. J., Mitchell K., Jackson-Weaver. O., Kooser. A., Cron. B., Crossey. L., Takacs-Vesbach. C. (2008). “Molecular characterization of the diversity and distribution of a thermal spring microbial community by using rRNA and metabolic genes”. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 4910-4922.

BIBLIOGRAFIA

- Hill. T.C.J., Walsh. K.A., Harris. J.A., Moffett. B.F. (2003). "Using ecological diversity measures with bacterial communities". *FEMS Microbiology Ecology*, **43**, 1-11.
- Hong. S., Bunge. J., Leslin. C., Jeon. S., Epstein. S.S. (2009). " Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity". *ISME J*, **3**, 1365-1373.
- Hugenholtz. P. (2002). "Exploring prokariotic diversity in the genomic era. Genome Biol." *REVIEWS0003*, 3.
- Hügler. M., Huber. H., Stetter. K. O & Fuchs. G. (2003). "Autotrophic CO₂ fixation pathways in archaea (*Crenarchaeota*)". *Arch Microbiol*, **179**, 160-173.
- Hügler. M., Sievert. S. M. (2011). "Beyond the Calvin Cycle: Autotrophic Carbon Fixation in the Ocean". *Annual Review of Marine Science*, **3**, 261-289
- Kennedy. J., Flemer. B., Jackson. S.A., Lejon. D.P. H., Morrissey. J.P., O’Gara. F., Dobson. A. D. W. (2010). "Marine Metagenomics: New Tools for the Study and Exploitation of Marine Microbial Metabolism". *Marine drugs*, **8**, 608-628.
- Kovaleva. O., Tourova. T., muyzer. G., Kolganova. T., Sorokin. D. (2010). "Diversity of rubisco and ATP citrate lyase genes in soda lake sediments". *FEMS Microbiol Ecol*, **75**, 37-47.
- Muyzer. G., de Waal. E.C., Uitterlinden. A.G. (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA". *Appl. Environ. Microbiol*, **59**, 695–700.
- Nakagawa. S. & Takai. K. (2008). "Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance". *FEMS Microbiol Ecol*, **65**, 1–14.
- Nei. M. & Kumar. S. (2000)." *Molecular Evolution and Phylogenetics.*" Oxford University Press, New York.

- Newton. R.J., Griffin. L.E., Bowles. K.M., Meile. C., Gifford. S., Givens. C. E., Howards. E.C., King. E., Oakley. C.A., Reisch. C.R., Rinta-Kanto. J. M., Sharma. S., Sun. S., Varaljay. V., Vila-Costa. M., Westrich. R. J., Moran. M. (2010). "Genome characteristics of a generalist marine bacterial lineage", *International Society for Microbial Ecology*, **4**, 784 –798.
- Nishitani. Y., Shosuke. Y., Masahiro. F., Kazuya. K., Takashi. D., Haruyuki. A., Tadayuki. I., Kunio. M. (2010). "STRUCTURE-BASED CATALYTIC OPTIMIZATION OF A TYPE III RUBISCO FROM A HYPERTHERMOPHILE". *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*, **10**, 1-21.
- Pace. N.R., Stahl. D.A., Lane. D.J., Olsen .G.J. (1985). "Analysing natural microbial populations by rRNA sequences." *ASM News*, **51**, 4-12.
- Paul W.J.J. van der Wielen (2006). "Diversity of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes in the MgCl₂-dominated deep hypersaline anoxic basin discovery". *FEMS microbial Lett*, **259**, 326-331.
- Prabakaran. S. R., Manorama. R., Delille. D., Shivaji. S. (2006). "Predominance of Roseobacter, Sulfitobacter, Glaciecola and Psychrobacter in seawater collected off Ushuaia, Argentina, Sub-Antarctica". *FEMS*, **59**, 342 – 355.
- Qian. P., Wang. Y., Lee. O., Lau. O., Yang. J., Lafi. F., Al-Suwailem. A., Wong. T. (2010). "Vertical stratification of microbial communities in the Red Sea revealed by 16S rDNA pyrosequencing". *International Society for Microbial Ecology*, 1-12.
- Saitou. N & Nei. M. (1987). "The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree". *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- 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). "Introduction mothur:

BIBLIOGRAFIA

- Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities”. *Appl Environ Microbiol*, **75**, 7537-7541.
- Singh. J., Tabita. F. R. (2009). “Roles of RubisCO and the RubisCO-Like Protein in 5-Methylthioadenosine Metabolism in the Nonsulfur Purple Bacterium *Rhodospirillum rubrum*”. *Journal of Bacteriology*, **192**, 1324–1331.
- Sørensen. T. (1948). “A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species and its application to analyses of the vegetation on Danish commons”. *Biologiske Skrifter/ Kongelige Danske Videnskabernes Selskab*, **5**, 1-34.
- Strauss.G. & Fuchs.G. (1993). “Enzymes of a novel autotrophic CO₂ fixation pathway in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, the 3-hydroxypropionate cycle.” *Eur. J. Biochem*, **215**, 633-643
- Takai. K., Campbell. B. J., Cary. S. C., Suzuki. M., Oida. H., Nunoura. T., Hirayama. H., Nakagawa. S., Suzuki. Y., Inagaki. F., Horokoshi. K. (2005). “Enzymatic and Genetic Characterization of Carbon and Energy Metabolisms by Deep-Sea Hydrothermal Chemolithoautotrophic Isolates of *Epsilonproteobacteria*”. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 7310-7320.
- Tamura, K., J. Dudley. M. Nei and Kumar. (2007). “Mega 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0.” *Mol Biol Evol*, **24**, 1596- 1599.
- Templeton. A. S., Staudigel. H., Tebo. B. M. (2005). “Diverse Mn(II)-Oxidizing Bacteria Isolated from Submarine Basalts at Loihi Seamount.” *Geomicrobiology Journal*, **22**, 127 – 139.
- Tesk. A., Hinrichs. K., Edgcomb. V., Gomez. A., Kysela. D., Sylva. S., Sogin. M., Tabita. F. R., Hanson. T. E., Li. H., Satagopan. S., Singh. J. & Chan. S. (2007).

“Function, structure, and evolution of the RubisCO-like proteins and their RubisCO homologs”. *Microbiol Mol Biol Rev*, **71**, 576-599.

Thompson. J., Gibson. T., Plewniak. F., Jeanmougin. F., Higgins D. (1997). “The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools”. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4876–4882.

Tourova. T.P., Spiridinova. E .M., (2009). “Phylogeny and Evolution of the Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Genes in Prokaryotes”. *Molecular Biology* **43**, 713-728.

Wang. F., Zhou. H., Meng. J., Peng. X., Jianga. L., Sunc. P., Zhang. C., Van Nostrand, J. D., Ye Denge, Hee. Z., Wue. L., Zhou. J., Xiaoa. X. (2009). “GeoChip-based analysis of metabolic diversity of microbial communities at the Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent”. *PNAS*, **12**, 4840 - 4845.

Wang. Q., Garrity. G. M., Tiedje. J.M., Cole. J.R. (2007). “Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacteria Taxonomy”. *Appl, Environ Microbiol*, **16**, 5261-5267.

Yeung. C.W., Lee. K., Whyte. L.G., Greer. C.W. (2010). “ Microbial community characterization of the Gully: a marine protected area”. *Can. J. Microbiol.*, **56**, 421-431.

