

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caracterização molecular de arqueias em rejeitos siderúrgicos

ORIENTADA: Monalisa Maria Avelar

ORIENTADORA: Prof.^a Andréa Maria Amaral Nascimento

CO- ORIENTADOR: Prof. Edmar Chartone-Souza

BELO HORIZONTE

Março - 2013

Monalisa Maria Avelar

Caracterização molecular de arqueias em rejeitos siderúrgicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de mestre em Genética.

Orientadora: Prof.^a Andréa Maria Amaral Nascimento
Co-Orientador: Prof. Edmar Chartone de Souza

BELO HORIZONTE

Março 2013

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”

Marcel Proust

Agradecimento Especial

À idealizadora deste sonho, quem eu tenho certeza de que, de onde estiver, está repartindo comigo a alegria deste momento. Estou realizando um sonho meu e seu, e só consegui porque a tenho dentro de mim. *Amarei sempre você, minha querida mãe.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por ter a certeza de que Ele esteve presente em todos os momentos dessa jornada, e me deu força para continuar até nos momentos mais difíceis de minha vida.

À minha mãe por ser minha maior fonte de força e perseverança.

Ao meu marido Thiago pelo incentivo, paciência e amor incondicional. Obrigada por ser esse anjo lindo que Deus colocou na minha vida. Te amo muito!

À minha família pelo carinho e apoio constantes.

À minha orientadora Andréa Amaral, por cada minuto a mim dispensado, pela sua compreensão e paciência.

Ao meu co-orientador Edmar Chartone pelos seus ensinamentos sempre tão úteis.

Ao pessoal do LGM - Clárisse, Paulo, Patrícia, Raiana, Marcelle, Alexandre, Maria Luíza (Malu), Luiza (Lulu), Magna, Marcelo, Breno, Ana Paula - pelos momentos que tivemos a oportunidade de compartilhar e por tornar os meus dias mais alegres. Foi muito bom estar com vocês! E a você, Mariana, por você ser alguém que me ensinou a ver a vida com outros olhos, deu rumo as minhas perturbações, encheu de alegria meus dias, deu incentivo aos meus planos e ofereceu-me seu ombro amigo; sem pedir nada, simplesmente minha amizade. Muito obrigada, amiga!

Às demais professoras do laboratório – Mônica Bucciarelli Rodriguez e Adlane Villas-Boas – pela constante disponibilidade em ajudar e pelos conhecimentos passados.

À Andréa Reis, Maria Rosa e Paixão pelo apoio técnico.

À FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Coleta da amostra de dois tipos de rejeitos recém-produzidos (RRP) no interior da indústria e exterior da indústria.....	28
Figura 2 - Coleta da amostra de rejeito depositado (RD).....	28
Figura 3 - Curva de rarefação representando a cobertura da biblioteca de clones do rejeito recém-produzido (RRP). Os clones foram agrupados em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) no nível de 97% de similaridade.....	44
Figura 4 - Distribuição filogenética (em %) de sequências de rDNA das amostras de RRP.....	48
Figura 5 - Árvore filogenética mostrando as 13 OTUs obtidas em rejeitos recém-produzidos (RRP). A topologia gerada por Neighbour-Joining (1000 repetições de bootstrap) e bootstrap >50%, utilizando sequências de genes de RNAr 16S, mostra as relações filogenéticas entre os clones derivados de RRP.....	54
Figura 6 - Árvore filogenética mostrando a OTU obtida em rejeitos depositados (RD). A topologia gerada por Neighbour-Joining (1000 repetições de bootstrap) e bootstrap >50%, utilizando sequencias de genes de RNAr 16S, mostra as relações filogenéticas entre os clones derivados de RD.....	54
Figura 7 – Curvas padrão para arqueia(A) e bactéria (B).....	57
Figura 8 – Curvas de diluição para arqueia (A) e bactéria (B).....	57
Figura 9 - Valores de Ct e amplificação dos genes de RNAr 16S de arqueia (A) e bactéria (B).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Condições da termociclagem para amplificação do gene de RNAr 16S de arqueias.....	30
Tabela 2 - Condições da termociclagem para PCR quantitativa do gene de RNAr 16S de arqueias e bactérias.....	34
Tabela 3 - Caracterização química (%) dos rejeitos siderúrgico recém-produzidos (RRP).....	36
Tabela 4 - Análise dos clones, diversidade das sequências e cobertura das bibliotecas de clones do gene de rRNA 16S dos rejeitos recém-produzidos (RRP) e depositados (RD). Dados foram estimados pelo programa DOTUR usando 97% de similaridade do gene de rRNA 16S.....	42
Tabela 5 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones de arqueias em rejeitos recém-produzido (RRP).....	46
Tabela 6 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones de arqueias em rejeitos depositados (RD).....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE	Abundance-based coverage estimator
ATCC	American Type Culture Collection
CaO	Óxido de Cálcio
Cr	Cromo
cm	Centímetro
cm ³	Centímetro cúbico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA _r	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EA	Escória de Aciaria
ETE	Estação de Tratamento de Efluente
g	Gramma
K	Potássio
Kb	Quilobase
Kg	Quilograma
L	Litro
M	Molar
Mn	Manganês
mg	Miligramma
Mg	Magnésio
MgO	Óxido de Magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
µg	Microgramma
µl	Microlitro
N	Nitrogênio
NH ₄	Amônia
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanogramma (10 ⁻⁹)
NPW	Newly Produced Waste
ONU	Organização das Nações Unidas

OTU	Unidade Taxonômica Operacional
P	Fósforo
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCRq	PCR quantitativa
pH	Potencial Hidrogeniônico
PTG	Pré-Tratamento de Gusa
P ₂ O ₅	Pentóxido de fósforo
RD	Rejeito Depositado
RDP	Ribosomal Database Project II
RML	Refinamento de Metal com Lança
RNA	Ácido ribonucléico
RNAr	Ácido ribonucléico ribossômico
RRP	Rejeito Recém-Produzido
S	Enxofre
SiO ₂	Óxido de silício
WD	“Waste Deposited” – Rejeito Depositado
Zn	Zinco

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO ESPECIAL	I
AGRADECIMENTOS.....	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
SUMÁRIO	VII
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 – INTRODUÇÃO	5
1.1 – Justificativa.....	6
1.2 – Ecologia microbiana.....	9
1.3 - O RNA ribossômico.....	11
1.4 – O Domínio <i>Archaea</i>	13
1.5-Técnicas moleculares como ferramentas para acessar a diversidade.....	19
2 – OBJETIVOS	24
2.1 - Objetivo Geral.....	25
2.2 - Objetivo Específico.....	25
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 -Amostragem.....	27
3.2 - Análise química dos rejeitos.....	29
3.3 – Extração do DNA total.....	29
3.4 - Amplificação por PCR do gene de RNAr 16S e construção das bibliotecas de clones.....	29

3.5 - Validação da biblioteca dos clones.....	31
3.6 - Sequenciamento do gene de RNAr 16S e análise filogenética.....	31
3.7 - PCR quantitativa (PCRq).....	33
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 - Composição Química dos Rejeitos.....	36
4.2 - Diversidade de arqueias.....	39
4.3 – Composição filogenética das bibliotecas de clones.....	44
4.4 - Quantificação dos genes de RNAr 16S de procariotos	56
5 – CONCLUSÃO.....	59
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

Resumo

A mineração e as atividades dela decorrentes, como a siderurgia, são consideradas fundamentais para o desenvolvimento econômico sendo porém, responsáveis por inúmeros danos ao ambiente. O processo siderúrgico gera 700 Kg de rejeitos por tonelada de aço, os quais possuem altas concentrações de metais indesejáveis, que dificultam sua reciclagem, com impacto negativo na economia e no ambiente. A diversidade microbiana de ambientes impactados por atividades antrópicas tem sido amplamente estudada, devido à possibilidade de recuperação de diversos metais como também do ambiente. Usando uma abordagem independente de cultivo, o presente estudo investigou a diversidade de arqueias de rejeitos siderúrgicos, recém-produzido (RRP) e depositado (RD) há quatro anos em área adjacente à siderurgia. As bibliotecas de clones do gene de RNAr 16S de arqueias foram construídas a partir do DNA ambiental destes rejeitos. As 158 sequências das bibliotecas de clones construídas a partir dos dois rejeitos se agruparam em 14 OTUs (unidade taxonômica operacional), sendo 13 de RRP e apenas uma de RD. Análise filogenética de sequências parciais do gene de RNAr 16S de arqueias revelou que as OTUs foram afiliadas a três filos: Crenarchaeota, representado nas duas bibliotecas, enquanto Euryarchaeota e Thaumarchaeota foram exclusivos da biblioteca RRP. Os índices de diversidade de Shannon e de Simpson mostraram diversidade limitada de arqueias, embora a biblioteca RRP apresentasse maior diversidade quando comparada com RD. Apenas uma OTU, encontrada em RRP, foi identificada em nível de espécie, sendo afiliada à *Halobacterium salinarum*, encontrada em ambientes extremamente salinos. Além disso, uma OTU afiliada ao filo Thaumarchaeota foi detectada em nível de família, Cenarchaeaceae, que possui membros que desempenham papel fundamental na nitrificação. Por outro lado, a grande maioria das OTUs de RRP pode representar novas

classes destes três filos. A única OTU encontrada em RD foi afiliada com uma crenarchaea não cultivável. A análise de PCRq revelou maior abundância de arqueias em RRP e de bactérias em RD. Portanto, os dados obtidos demonstram a diversidade de arqueias nesses dois tipos de rejeitos. Este estudo apresenta as primeiras informações sobre a filogenia de arqueias em rejeitos siderúrgicos, abrindo perspectivas para estudos sobre a estrutura e função de comunidades de arqueias indígenas nesse ambiente e, possivelmente, estabelecer possíveis mecanismos e ciclo de elementos químicos.

Abstract

Mining and activities arising from it, such as steel, are considered crucial to economic development, but is responsible for many environmental damage. The steelmaking process generates 700 kg of wastes per ton of steel and these tailings have high concentrations of undesirable metals, which hinder their recycling, with a negative impact on the economy and environment. The microbial diversity of environments impacted by human activities has been widely studied due to the possibility of recovery of various metals as also the environment. Using an independent approach to cultivating the present study investigated the diversity of wastes in steel arches, newly produced (RRP) and deposit (RD) four years ago in an area adjacent to the steel industry. The clone libraries of the 16S rRNA gene of the archaea were constructed from environmental DNA of these tailings. The 158 sequences from clone libraries constructed from the two tailings were grouped into 14 OTUs (operational taxonomic unit), 13 of RRP and only one RD. Phylogenetic analysis of gene fragments of 16S rRNA of archaea revealed that OTUs were affiliated to three phyla: Crenarchaeota represented in both libraries, while Euryarchaeota and were Thaumarchaeota exclusive library RRP. The Shannon diversity index and Simpson showed limited archaeal diversity, although the library RRP present greater diversity compared with RD. Only one OTU found in RRP was identified at the species level, being affiliated with *Halobacterium salinarum* species, found in extremely salty. Furthermore, an OTU affiliated with Thaumarchaeota was identified in the family level, Cenarchaeaceae which has members that play a fundamental role in the nitrification. Moreover, the great majority of OTUs of RRP may represent new classes of these three phyla. The only OTU found in RD was affiliated with a crenarchaea uncultivable. The analysis revealed

PCRq greater abundance of archaea in RRP and bacteria in RD. Therefore, the data obtained demonstrate the diversity of archaea in these two types of tailings. This study provides the first information about the phylogeny of archaea in steelmaking wastes, opening new perspectives for studies on the structure and function of archaea indigenous communities in this environment, and possibly establish possible mechanisms and cycle chemicals.

1 - Introdução

1.1 – Justificativa

A mineração utiliza recursos naturais e é considerada como a principal atividade subsidiária dos processos de urbanização e crescimento econômico (DINIZ, 2010). Entretanto, sabe-se que as atividades de mineração resultam em impactos ambientais imediatos, bem como de longo prazo. Os principais problemas gerados pela mineração são: áreas degradadas, poluição da água e do ar (MACHADO, 1989; BITAR, 1997; DIAS, 2001). Além disso, a liberação de resíduos em pó e produtos químicos gera grandes amontoados em áreas vizinhas (SILVA, 2007, ASSIS *et al.*, 2011).

Devido à sua grande extensão territorial e reservas minerais, o Brasil destaca-se no cenário internacional, sendo o segundo maior produtor de minério de ferro do mundo (com 19% da produção mundial total), o principal produtor mundial de nióbio, o sétimo produtor de estanho e o décimo terceiro produtor de ouro. Com crescimento de 28%, a produção mineral brasileira alcançou o patamar dos US\$ 50 bilhões em 2011, impulsionada pelo desempenho recorde do segmento de ferro. Foram produzidas 467 milhões de toneladas de minério de ferro no país, o que representou o maior crescimento anual da história. Este cenário não deve ser diferente em 2012, quando há previsão de um aumento de 5% da produção (IBRAM, 2012).

O minério de ferro é o de maior produção e consumo no planeta sendo que a maioria das jazidas, encontradas em poucos países, como Rússia, Austrália, EUA e Brasil, detém 77% dessas reservas. O Brasil possui a quarta maior reserva do mundo, equivalente a 29 bilhões de toneladas. Além disso, as reservas de minério de ferro do Brasil e da Austrália apresentam o maior teor de ferro – 60%; entretanto, contém impurezas, como óxido de silício (SiO_2), óxido de alumínio (Al_2O_3), fósforo (P), dentre outros (ROSIÈRE, 1992).

A siderurgia dedica-se à fabricação e tratamento de aços e ferros fundidos. O aço é uma liga metálica formada essencialmente por ferro e carbono, com percentagens deste último variando entre 0,008 e 2,11%. Distingue-se do ferro fundido, que também é uma liga de ferro e carbono, mas com teor de carbono entre 2,11% e 6,67%. O processo de produção do aço envolve um composto chamado coque (carvão processado). O coque é usado como combustível e agente redutor nos altos-fornos e é dele que provém o carbono adicionado ao ferro, gerando o aço., o alto forno pode chegar a temperaturas de até 1300° C. O aço é produzido a partir da "purificação" do ferro gusa, sendo que este é constituído de minério de ferro, coque e cal. A fabricação do aço pode ser dividida em quatro etapas: preparação da carga (adição de cal e coque), redução (transformação do minério de ferro em um metal líquido: o ferro gusa), refino (remoção do carbono contido no gusa e solidificação) e laminação (processamento em laminadores) (IABr, 2011).

A *World Steel Association* relatou um aumento de 6,8% na produção de aço em 2011, resultando em 1,5 bilhão de toneladas, dos quais o Brasil contribuiu com cerca de 35,2 milhões de toneladas. A indústria brasileira do aço ocupa posição estratégica na estrutura produtiva do país. De acordo com estudo desenvolvido em 2011 sobre este setor da economia brasileira, o valor de produção do segmento corresponde a 4,8% do total da economia, gerando um impacto de 4% no PIB nacional. Espera-se encerrar 2012 com produção de 36 milhões de toneladas de aço bruto (IABr, 2012).

Entretanto, em todas as etapas de obtenção do aço, são gerados pós, lamas, escórias de alto forno e aciaria, carepas de laminação, etc. Para cada tonelada de aço produzido, estima-se que as indústrias siderúrgicas geram 700 kg de rejeitos, os quais apresentam concentrações relativamente altas de P, K, S, Cr e Zn, que,

consequentemente, dificulta sua reciclagem. Portanto, torna-se necessário a reciclagem destes rejeitos. Atualmente, tem-se utilizado a escória na pavimentação de estradas, dentre outros setores da construção civil. Entretanto, as empresas não têm grandes preocupações em separar e processar estes rejeitos devido aos custos das análises e processamentos (BRANCO, 2004). Dessa forma, são gerados grandes amontoados de rejeitos nos terrenos de depósitos que podem gerar impactos negativos para a economia, o ambiente e a saúde (SILVA, 2007). Portanto, a recuperação e reutilização destes rejeitos devem ser consideradas como prioridade nos processos de mineração e siderurgia (ALMEIDA, 1992; DIAS, 2001).

Neste cenário, o estudo do impacto ambiental do setor extrativista mineral se faz necessário. Além disso, este setor é crescente e economicamente representativo no âmbito nacional e mundial. Dessa forma, há necessidade de alternativas para detoxificação e sua posterior liberação para o ambiente ou reutilização. Uma das estratégias para a reutilização dos rejeitos seria investigar a diversidade de procariotos, uma vez que eles desempenham um papel fundamental nos ciclos geoquímicos e na regulação de processos ecológicos. Além disso, é essencial entender as inter-relações entre os micro-organismos e o ambiente por meio do estudo da estrutura e da diversidade funcional das comunidades microbianas e como elas se comportam diante de distúrbios naturais ou antrópicos (RANJARD *et al*, 2000). Atualmente, a abordagem molecular independente de cultivo tem sido usada, facilitando o acesso à grande diversidade apresentada pelos procariotos, com ênfase nas arqueias. A prospecção da diversidade de arqueias, além de ampliar o conhecimento metabólico e taxonômico e das interações das comunidades nos ecossistemas pode resultar em aplicações biotecnológicas.

1.2 Ecologia microbiana

Os procariotos são considerados evolutivamente os mais primitivos seres vivos da Terra. Apesar de serem relativamente simples, podem sobreviver em ambientes onde seria impossível para outras espécies, sendo os mais abundantes organismos do planeta, com um número aproximado de $4-6 \times 10^{30}$ indivíduos (HUGENHOLTZ *et al*, 1998). A diversidade metabólica dos procariotos supera a de todos os outros organismos, podendo responder rapidamente às condições ambientais desfavoráveis, tornando-se resistentes, por exemplo, a altas temperaturas (LACEY, 1997, ALBEROLA *et al*, 1999). O sucesso dos procariotos é devido à plasticidade de seu genoma e consequente metabolismo diversificado, além de elevada taxa de divisão celular.

Os organismos procariontes são estruturalmente simples, unicelulares e microscópicos, podendo ser encontrados isolados ou formando agregados celulares (PACE, 1997; TORSVIK *et al.*, 2002; SCHLEIFER, 2004), colonizando os mais diversos ecossistemas (HUGENHOLTZ *et al*, 1998), distribuindo-se no oceano ($1,2 \times 10^{29}$), no solo ($2,6 \times 10^{29}$) e na superfície terrestre ($0,25 - 2,4 \times 10^{30}$) (XU, 2006). A longa história evolutiva pode explicar as diversidades genética, morfológica e fisiológica desses micro-organismos.

Avalia-se que a diversidade microbiana exceda, em ordens de magnitude, à diversidade de plantas e animais (WHITMAN *et al*, 1998; MCINERNEY *et al.*, 2002; OREN, 2004). Entretanto, atualmente, apenas uma ínfima fração dessa extraordinária diversidade da biosfera é conhecida. Estima-se, que mais de 99% de procariotos não são cultiváveis pelas técnicas de rotinas laboratoriais e, portanto, não estão acessíveis para a pesquisa básica e biotecnologia (RAPPÉ & GIOVANNONI, 2003; RODRIGUEZ-VALERA, 2002; STREIT e SCHMITZ, 2004; SHARMA *et al.*, 2005).

É bem estabelecido que as comunidades microbianas desempenham papel fundamental nos processos biogeoquímicos dos ecossistemas, pois constituem um grupo de organismos chave para o funcionamento da ciclagem de nutrientes, tendo um importante papel na manutenção da qualidade de solos, (LAMBAIS *et al.*, 2005), água e ar. Tem-se dado atenção especial aos micro-organismos do Domínio *Archaea* devido ao fato de, além de participarem desses ciclos, terem maior capacidade de sobrevivência em ambientes hostis, colaborando para o equilíbrio ambiental nas mais diversas áreas. Os procariotos em geral realizam a decomposição da matéria orgânica de forma que todos os nutrientes voltem ao solo e possam ser reabsorvidos, dando continuidade aos ciclos e trazendo de volta ao solo sais, água e outros minerais, como P, N, C e O.

No ciclo do nitrogênio, por exemplo, a oxidação da amônia é realizada tanto por bactérias como por arqueias (NICOL & SCHLEPER, 2006; PROSSER e NICOL, 2008). Durante mais de um século, as bactérias oxidantes de amônia (AOB, ammonia-oxidizing bacteria) foram consideradas as principais responsáveis por este processo na natureza, embora recentemente tenha sido demonstrado que grupos de arqueias podem desempenhar papel fundamental na nitrificação, sendo mais abundantes do que as AOB, em vários ambientes (FRANCIS *et al.*, 2005; LEININGER *et al.*, 2006; WUCHTER *et al.*, 2006; CAFFREY *et al.*, 2007; LAM *et al.*, 2007). Bactérias e arqueias estão envolvidas no processo de redução de compostos orgânicos complexos (LE MER & ROGER, 2001), na remoção de metais poluentes (CHEN *et al.*, 2008), na degradação de compostos xenobióticos (ZYLSTRA & GIBSON, 1991) e no tratamento de esgotos (PHILIPPI *et al.*, 2004) e efluentes industriais (SAYER & GADD, 2001).

Portanto, conhecer a diversidade microbiana é de grande relevância, pois são as espécies mais abundantes na Terra e mediadores dos principais processos

biogeoquímicos que sustentam a vida no planeta, como os ciclos do carbono, nitrogênio e de outros elementos. Além disso, o conhecimento dessa diversidade tem uma importante aplicação na biorremediação (WHITMAN *et al.*, 1998, CANHOS & MANFIO, 2001). O termo biodiversidade pode ser definido de várias maneiras. No contexto microbiológico pode se referir ao número de espécies e sua abundância relativa em uma dada comunidade em determinado habitat. Em termos ecológicos e moleculares, a biodiversidade pode ser definida como o número e a distribuição de sequências distintas presente no DNA extraído da comunidade microbiana de um determinado habitat (VAN ELSEAS, GARBEVA & VAN VEEN, 2004)

Com o advento de técnicas de análise do gene de RNAr 16S, os organismos são divididos em três domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eucharya* (WOESE, 1987; WOESE *et al.*, 1990), sendo os dois primeiros domínios constituídos por procariotos.

1.3 O RNA ribossômico

O RNAr é considerado um cronômetro molecular que surgiu a partir dos estudos filogenéticos dos procariotos, de modo a possibilitar as inferências sobre as relações evolutivas entre os micro-organismos. A análise dos genes ribossômicos é amplamente utilizada para essas inferências, especialmente de procariotos, aumentando assim o conhecimento sobre a diversidade procariótica em diversos ecossistemas (TOUROVA, 2003).

Os RNAs ribossômicos (RNAr) são moléculas antigas, elementos chave da maquinaria da síntese protéica e de amplo interesse evolutivo em ambos procariotos e eucariotos. Existem boas razões para o RNAr ser um marcador molecular útil e

confiável para análises filogenéticas: são universalmente distribuídos, apresentam funcionalidade constante, regiões altamente conservadas e variáveis entre espécies distantes; tamanho adequado; sendo menos afetado pela transferência gênica horizontal e de fácil manipulação (WOESE, 1987; ROSELLÓ-MORA *et al.*, 2001; NASCIMENTO, 2009).

Os procariotos apresentam três tipos de genes de RNAr (5S, 16S e 23S) que estão organizados no mesmo operon e presentes de 1 a 15 cópias por genoma bacteriano, podendo variar de bactéria para bactéria (TOUROVA, 2003). Dentre eles, o gene de RNAr 16S (de aproximadamente 1600 nucleotídeos) tornou-se o mais utilizado para análises filogenéticas (GRAHN *et al.*, 2003), por apresentar regiões altamente conservadas e variáveis entre as espécies, além de tamanho satisfatório (ROSELLÓ-MORA e AMANN, 2001). Inicialmente, o gene de RNAr 5S (de aproximadamente 120 nucleotídeos) foi utilizado para inferências filogenéticas, mas devido ao seu tamanho relativamente pequeno as informações contidas nesse gene são limitadas. O gene de RNAr 23S (de aproximadamente 2500 nucleotídeos) possui alto poder de resolução, pois apresenta maior número de sítios polimórficos. Contudo, estudos baseados nesse gene são restritos devido ao seu tamanho (OLSEN *et al.*, 1996; ROSELLÓ-MORA e AMANN, 2001).

Atualmente, o gene de RNAr 16S é amplamente utilizado em pesquisas taxonômicas devido ao grande número de sequências depositadas e, em consequência, fácil acesso aos bancos de dados, como GenBank, Ribosomal Database Project (RDPII – online), Silva e GreenGenes. Assim, esse gene tornou-se uma ferramenta extremamente comum e utilizada em inferências filogenéticas (WOESE, 1987; DUNBAR *et al.*, 1999; ROSELLÓ-MORA e AMANN, 2001; DAHLLÖF, 2002). Um

marco na utilização desse gene ocorreu na década de 1970, quando Woese mostrou que os seres vivos eram divididos em três domínios – *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* – (WOESE, 1987; WOESE *et al.*, 1990), baseado no sequenciamento dos genes de RNAr 16S, para procariotos, e de 18S, para eucariotos, de 500 organismos cultiváveis.

1.4 O Domínio *Archaea*

A maioria dos estudos microbiológicos ambientais tem focado a diversidade de bactérias e fungos. Por décadas, as arqueias foram classificadas como bactérias por possuírem características morfológicas semelhantes. Contudo, estudos moleculares posteriores demonstraram que arqueias e bactérias estão em domínios distintos (WOESE; *et al.*, 1990, ALLERS & MEVARECH, 2005). Estes procariotos podem ser diferenciados pelo RNAr, RNAt, membrana citoplasmática, composição da parede celular e características de adaptação a ambientes extremos (VALENTINE, 2007; CANHOS & VAZOLLER, 1999).

As arqueias possuem membrana citoplasmática composta de éteres de isopropanil de glicerol e apenas um envoltório celular; RNAt com 1-metil-pseudouridina no lugar de ribotimina; e vários cofatores diferentes dos relatados para bactérias (JURGENS, 2000). Além disso, as arqueias têm evoluído durante milhões de anos sob condições extremas de salinidade, temperatura e pH, levando a inferir que elas adaptam a tais condições para sobreviver (DELONG, 1992). Assim, estas características peculiares (VALENTINE, 2007), aliada a uma via metabólica diferenciada com enzimas catalisadoras exclusivas permitem a diferenciação entre arqueias e bactérias (SATO & ATOMI, 2011). Sabe-se, ainda, que as arqueias não são exclusivas de

ambientes extremos, mas convivem nos mais diferentes habitats terrestres com bactérias e outros micro-organismos.

As arqueias representam uma fração considerável da diversidade de micro-organismos em ecossistemas marinhos e terrestres, sendo também importante nos ciclos biogeoquímicos global (DELONG, 2006). Apesar da ampla distribuição das arqueias nos ambientes, grupos específicos são encontrados em locais geográficos e ecossistemas que possuem características geoquímicas particulares (SCHLEPER *et al.*, 2005).

Apesar do termo “*archaea*” ser geralmente relacionado a ambientes extremos, esta é uma visão limitada. Com base na análise de DNAr, o domínio *Archaea* abriga procariotos que se desenvolvem em ambientes variados, incluindo aqueles com altas temperaturas e salinidade, extremos de pH e ausência de oxigênio, água doce dos lagos (KEOUGH, 2003), solo (OCHSENREITER, 2003), raízes das plantas (SIMON, 2000), turfas (GALAND, 2005), aquíferos contaminados com petróleo (KLEIKEMPER, 2005) e boca e intestino humanos (LEPP, 2004), dentre outros. Apesar do pouco conhecimento das funções que as arqueias desempenham nos ambientes onde são encontradas, alguns grupos são relevantes no ciclo do C, como é o caso dos metanogênicos (KOTSYURBENKO *et al.*, 2004; GALAND *et al.*, 2005; CADILLO-QUIROZ *et al.*, 2008). A maioria das linhagens de arqueias conhecida é descrita por afiliações filogenéticas moleculares. Entretanto, ainda, permanecem as dificuldades de cultivo destes micro-organismos (SCHLEPER *et al.*, 2005).

Desde que as arqueias foram descritas como um domínio (WOESE, 1977) tornaram-se um dos mais interessantes objetos de estudo da microbiologia moderna, biologia molecular e bioquímica. Atualmente, são conhecidos cinco filos: Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota e Thaumarchaeota

(SPANG, 2010). Os três últimos ainda não são bem definidos, enquanto a maioria das espécies descritas é incluída nos dois primeiros filos. Os filos Crenarchaeota e Euryarchaeota formam ramificações separadas na árvore filogenética, sendo significativamente diferente na organização e expressão do genoma, replicação e, divisão celular e, em muitos outros processos genéticos básicos. Na última década foram propostos novos filos, porém a maioria das arqueias cultivadas pertencem a estes dois principais filos. Além disso, Crenarchaeota e Euryarchaeota correspondem a mais de um terço de todas as células procarióticas encontradas nos oceanos (KARNER *et al*, 2001). As sequências de arqueias encontradas em ambientes não extremos são divididas em três grupos, sendo o grupo I associado ao filo Crenarchaeota e os grupos II e III pertencentes ao filo Euryarchaeota (DELONG, 1992, DELONG *et al.*, 1998). Os filos Korarchaeota e Thaumarchaeota são caracterizados por diferentes combinações de características de Crenarchaeota e Euryarchaeota e também por características próprias (MARDANOV & RAVIN, 2012).

Crenarchaeota era inicialmente constituído por espécies aeróbias e anaeróbias, com ampla diversidade fisiológica, sendo conhecidas como hipertermófilas. Este filo é composto por organismos encontrados em ambientes extremos, como altas temperatura e salinidade (BUCKLEY *et al* 1998; CHABAN *et al*, 2006; PAGALING *et al*, 2007; BUHRING *et al* 2009), em ambientes marinho (DeLONG, 1992; MASSANA *et al.*; 1997; KARNER *et al*, 2001); solo (JURGENS & SAANO, 1999; BORNEMAN & TRIPLETT, 1997; NICOL *et al*, 2003), sedimentos de água doce (CLEMENTINO *et al.*, 2006), como também sedimento de estuário e manguezal (HOLGUIN *et al*, 2001; KIM *et al.*, 2005; CLEMENTINO *et al.*, 2006; CURY *et al.*, 2006; YAN *et al*, 2006). Sequências de DNAr 16S afiliadas com Crenarchaeota também foram identificadas em

águas subterrâneas de mina de ouro (TAKAI *et al* 2001). Além disso, um intron foi detectado no gene da sintetase de pseudouridina, sendo o primeiro relato em genes que codificam para proteínas (WATANABE, 2002), embora em arqueias introns sejam frequentemente encontrados em genes de RNAs ribossômicos e transportadores (KJEMS, 1988,1989). Todos os Crenarchaeota cultivados pertencem apenas à classe Thermoprotei, que em sua grande maioria é representada por arqueias termófilas e inclui três ordens: Thermoproteales, Sulfolobales e Desulfurococcales. Durante os anos 1980 e 1990, muitos gêneros de Crenarchaeota foram principalmente neutrófilos ou moderadamente acidófilos anaeróbios hipertermofílicos. Recentemente, alguns gêneros de Crenarchaeota têm sido descritos como novas ordens: Acidilobales (PROKOFEVA, 2009) e Fervidicoccales (PEREVALOVA, 2010).

O filo Euryarchaeota é considerado o mais diversificado filogeneticamente, incluindo procariotos metanogênicos, que crescem em nichos estritamente anaeróbios, além de halófilos e também termófilos (VETRIANI *et. al.*, 1999; BROCHIER-ARMANET *et al.*, 2008). As metanogênicas são anaeróbias obrigatórias e utilizam um limitado número de substratos, compreendendo ácido acético, hidrogênio /dióxido de carbono, ácido fórmico, metanol, metilaminas e monóxido de carbono. Na digestão anaeróbia elas utilizam os substratos produzidos pelas bactérias acetogênicas para a produção de metano e CO₂ (FORESTI, 1997; SPEECE, 1996; FERRY, 1993). Em função de sua afinidade pelo substrato e magnitude de produção de metano, as metanogênicas são divididas em dois grupos principais: um que forma metano a partir de ácido acético ou metanol (acetoclásticas), e o outro que produz metano a partir de hidrogênio e dióxido de carbono (hidrogenotróficas). Podem ser encontradas em sedimentos marinhos e de água doce, pântanos e solos

profundos, trato intestinal dos animais e estações de tratamento de esgoto. As arqueias metanogênicas têm despertado grande interesse por serem os únicos produtores de metano, sendo responsável pela maioria do gás natural (combustível fóssil) que é explorado como fonte de energia para uso doméstico ou industrial (TODAR, 2009). *Methanococcus jannaschii*, por exemplo, é um metanogênico isolado de fontes hidrotermais submarinas (JONES *et al.*, 1983). Outros membros do filo Euryarchaeota, os halófilos extremos vivem em ambientes naturais, como o Mar Morto, o Great Salt Lake, ou lagoas de evaporação da água do mar, onde a concentração de sal é muito alta (5 - 25 M de NaCl). Essas arqueias requerem NaCl para seu crescimento, vivendo em baixas concentrações deste sal. Esses organismos são heterotróficos, normalmente apresentam respiração aeróbica, porém a alta concentração de NaCl no ambiente limita a disponibilidade de O₂ para a respiração, de modo que eles para complementar sua produção de ATP convertem energia luminosa em ATP (TODAR, 2009). Arqueias termofílicas são termófilas extremas ou hipertermófilas requerendo alta temperatura (80°C a 105°C) para seu crescimento. Suas membranas e enzimas são estáveis a estas altas temperaturas. A maioria delas requer enxofre elementar para seu crescimento (respiração e fonte de energia). Normalmente crescem em pH baixo (< 2), porque acidificam seu próprio ambiente por oxidação de S⁰ (enxofre) para SO₄ (ácido sulfúrico). Hipertermófilos são habitantes de ambientes associados com vulcanismo, como fontes termais, gêiseres e fendas do fundo do oceano (placas tectônicas) (TODAR, 2009). *Thermus aquaticus* é um membro desse grupo que inovou o campo da biologia, como fonte da enzima Taq polimerase utilizada na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (INNIS *et al.*, 1988). O filo Euryarchaeota inclui um grupo diversificado de halófilos extremos, hipertermofílicos e metanogênicos. *Methanosarcina* e *Methanosaeta* estão envolvidas na produção de metano a partir de acetato contido no

sedimento (MEUER *et al.*, 2002). Além disso, os membros de Euryarchaeota em sedimentos de água doce e marinhos são organismos oxidantes que apresentam relação simbiótica com bactérias redutoras de sulfato (BOETIUS *et al* 2000; ORPHAN *et al* 2001; BRIÉE *et al* 2007).

Algumas sequências de genes RNAr 16S não foram afiliadas aos filios de arqueias conhecidos baseado no nível de homologia sendo proposto o novo filo, Korarchaeota. A separação de Korarchaeota como um novo filo foi confirmada por sequenciamento e análise do genoma completo de *Korarchaeum cryptofilum*, que foi o primeiro membro deste grupo obtido em uma cultura de enriquecimento estável (ELKINS, 2008). Sequências de DNAr do filo Korarchaeota foram obtidas a partir de ambientes hipertermofílicos semelhantes aos habitados por Crenarchaeota, mas já foram encontrados em vários ambientes (TODAR, 2009). Com iniciadores de PCR específicos, membros de Korarchaeota têm sido detectados em águas termais da Islândia e da Kamchatka (REIGSTAD *et al.*, 2010; GUMEROV, 2011)

O filo Thaumarchaeota foi inicialmente classificado como Crenarchaeota mesófilo (PESTER *et al*, 2011). Este filo foi confirmado recentemente, baseado em análises genômicas e de comparação filogenética entre três genomas de arqueias oxidantes de amônia, oriundas de ambientes marinhos e termofílicos (KRUPOVIC, 2011). Genes de Thaumarchaeota, incluindo o RNAr 16S e os que codificam a enzima que participa da oxidação da amônia, têm sido detectados em diferentes ambientes, tais como solo (LEININGER *et al.*, 2006; TREUSCH *et al.*, 2005), estuários, plâncton marinho, fontes termais terrestres e aquáticas (SPANG *et al.*, 2010), o que evidencia a participação ativa deste grupo no ciclo biogeoquímico do nitrogênio, especialmente na nitrificação.

O filo Nanoarchaeota consiste de arqueias hipertermófilas de tamanho nanométrico (HUBER, 2002) e sendo simbioses de *Ignicoccus* (WATERS *et al.*, 2003). São as menores arqueias e seus representantes são simbióticos, sendo *Nanoarchaeum equitans* o seu principal representante (ALLERS; MEVARECH, 2005). Sequências do gene de RNAr 16S têm sido identificadas em ambientes, como sedimentos marinhos e fontes hidrotermais (HOHN *et al.*, 2002).

Nunoura *et al.* (2011) descreveu o primeiro genoma completo de um representante do *cluster* HWCGI, que forma um grupo irmão de Thaumarchaeota e Crenarchaeota hipertermofílicos em árvores de genes de RNAr 16S. Seu genoma mostrou-se claramente distinto de outras arqueias, sendo 'Aigarchaeota' proposto como um novo filo. *Candidatus Subterraneum Caldiarchaeum* possui características intermediárias de arqueias hipertermofílicas e mesofílicas, sendo aparentemente incapaz de oxidar amônio para a geração de energia, mas pode crescer quimiolitotroficamente em monóxido de carbono.

1.5 Técnicas moleculares como ferramentas para acessar a diversidade

Durante muito tempo a diversidade das comunidades de micro-organismos foi investigada por meio de técnicas baseadas no cultivo e isolamento. A metodologia clássica utilizada na identificação de bactérias inclui análises fenotípicas da célula como, morfologia, metabolismo, fisiologia e química sendo assim limitada por não considerar relações filogenéticas (NASCIMENTO, 2009) e ser reconhecidamente seletiva, não abrangendo a maior parte da comunidade microbiana. Dessa forma, entre 0,1-1% das bactérias são cultiváveis em laboratório, devido às condições de crescimento

desfavoráveis e também da dependência intrínseca de outros micro-organismos (HANDELSMAN, 2004; ROSADO, 2002). Assim, avanços nas técnicas moleculares, incluindo extração de DNA, reação de polimerase em cadeia – PCR, clonagem e sequenciamento, têm possibilitado o desenvolvimento de técnicas não dependentes de cultivo, o que reduz os problemas associados com as técnicas convencionais. As técnicas moleculares têm revelado uma grande diversidade microbiana que não era detectada previamente com a metodologia clássica (HUGHES *et al.*, 2001). Essas novas ferramentas têm permitido o desenvolvimento de pesquisas com menor custo e tempo, e com maior capacidade de produção de dados (RANJARD *et al.*, 2000). Além disso, a análise das sequências de DNA por meio de marcadores genéticos evolutivamente estáveis é considerada uma estratégia eficiente para o estudo da diversidade microbiana e análise filogenética (TRINGE & HUGENHOLTZ, 2008).

A maior parte da enorme diversidade das comunidades microbianas não se desenvolve em meios de cultura comumente usados e disponíveis comercialmente (SAIT & JANSSEN, 2002; DIALLO *et al.*, 2004). Portanto, estudar a diversidade microbiana de maneira independente de cultivo tornou-se possível só após o advento das técnicas baseadas na análise total de DNA extraído diretamente das amostras ambientais. A abordagem metagenômica permite a análise de amostras de DNA diretamente do ambiente. Estudos recentes têm avaliado a distribuição e diversidade de fragmentos específicos de genes de uma amostra ambiental, muitos tendo como foco a subunidade menor do ribossomo – genes de RNAr 16S para procariotos e RNAr 18S para eucariotos (PACE *et al.*, 1985; WOESE, 1987; XU, 2011) A estratégia de clonagem de DNA diretamente de amostras ambientais foi proposta por Pace e colaboradores (1985), sendo que em 1991 foi reportada a primeira clonagem utilizando

um fago como vetor (SCHIMIDT *et al.*, 1991). O próximo avanço foi a construção de uma biblioteca metagenômica com DNA derivado de uma mistura de organismos de ervas secas enriquecidas em laboratório (HEALY *et al.*, 1995). Clones expressando atividade celulolítica foram encontrados nestas bibliotecas (HEALY *et al.*, 1995). O trabalho do grupo de DeLong (1996) definiu o campo da metagenômica ao relatarem bibliotecas construídas a partir de procariontes de água do mar. Eles identificaram um clone de 40 kb, que continha um gene de RNAr 16S de uma arqueia que não havia ainda sido cultivada.

Atualmente, existem diferentes estratégias para o estudo da diversidade genética microbiana em amostras ambientais. Essas estratégias se baseiam em técnicas moleculares que consistem em isolar amostras ambientais das comunidades e submetê-las à análise de seu DNA (DAHLÖF, 2002; RODRIGUEZ-VALERA, 2002). O DNA total pode ser obtido por meio de extração, e os genes de interesse podem ser amplificados pela técnica de PCR e analisados por diversas metodologias, como: clonagem-sequenciamento, hibridização *in situ*, eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*denaturing gradient gel electrophoresis* - DGGE), polimorfismo do fragmento de restrição terminal (*terminal gradient gel electrophoresis*- T-RFLP), bibliotecas metagenômicas e DNA *microarrays* (*microchip* de DNA). Assim, demonstrou-se que os organismos cultiváveis de diferentes ambientes representam apenas uma ínfima fração da comunidade microbiana, e passou-se a perceber a imensa importância dos micro-organismos não cultiváveis (TORVISK *et al.*, 2002; KELLER e ZENGLER, 2004; KEMP e ALLER, 2004; RODRIGUEZ-VALERA, 2004; SHARMA *et al.*, 2005).

A clonagem e sequenciamento dos fragmentos amplificados do gene de RNAr 16S de amostras ambientais levam à identidade taxonômica, afiliação filogenética e maior conhecimento da diversidade dos membros de determinada comunidade. Como alternativa às estratégias de clonagem, pode-se usar *fingerprinting* de comunidades microbianas, através da técnica Nested-PCR-DGGE – Denaturant gradient gel electrophoresis – (FISCHER & LERMAN, 1979, 1983) de fragmentos do gene de RNAr 16S amplificados por PCR, usando iniciadores específicos para o RNAr 16S (MUYZER *et al*, 1993).

Outra importante técnica é a PCRq (PCR quantitativa) , que quantifica a abundância das populações microbianas presentes numa amostra da comunidade (SANZ & KOCHLING, 2007) e promove um resultado acurado e efetivo. Ela baseia-se no monitoramento da fluorescência emitida pelo acúmulo de amplicons após cada ciclo, de modo que o sinal de intensidade emitido seja proporcional à concentração do DNA alvo da amostra (CAREY, 2006). Isto ocorre devido à ligação do corante no amplicon, emitindo uma fluorescência que quantifica o produto da reação (KUBISTA, 2006).

Baseado nas informações obtidas pelas técnicas descritas é possível revelar a diversidade microbiana de uma comunidade e seu papel em determinado ecossistema. Neste cenário, a ecologia microbiana vem sofrendo profundas mudanças com o acúmulo de informações biológicas e de parâmetros ambientais (RAMETTE, 2007). Assim, a análise da diversidade microbiana é importante para aumentar o conhecimento dos recursos genéticos em uma comunidade, entender sua distribuição relativa dos microorganismos, ampliar o conhecimento da diversidade funcional, identificar diferenças na diversidade associada à manipulação ambiental, entender a regulação da biodiversidade e o funcionamento e a sustentabilidade dos ecossistemas (OVREAS, 2000).

Dada a importância do estudo dos micro-organismos, foi criado um projeto multidisciplinar para a análise das comunidades microbianas em todo o planeta. O *Earth Microbiome Project* objetiva analisar 200.000 amostras nos mais diferentes ecossistemas, utilizando metagenômica, metatranscriptômica e sequenciamento. Será criado um atlas genético global que descreverá proteínas espaciais, modelos metabólicos ambientais para cada bioma, cerca de 500 mil genomas microbianos serão reconstruídos, um modelo metabólico global e um portal de análise de dados para visualização de todas as informações obtidas (EMP, 2012).

Freitas *et al* (2008) realizou o primeiro estudo da diversidade bacteriana em rejeitos de siderurgia. A análise revelou uma alta diversidade em rejeitos recém-produzidos e depositados. Assim, levando-se em consideração a escassez de estudos microbiológicos nesses ambientes, a diversidade de habitats das arqueias, sua necessidade de estudos e a importância ambiental desses micro-organismos, o trabalho proposto é o primeiro a analisar a diversidade de arqueias em rejeitos de siderurgia.

2 - Objetivos

2.1 – Objetivo Geral

Identificar e avaliar a diversidade de arqueias em dois rejeitos siderúrgicos, sendo um recém- produzido e outro depositado por quatro anos em área adjacente à siderurgia, por abordagem independente de cultivo.

2.2 – Objetivos Específicos

2.2.1 - Obter sequências do gene de RNAr 16S de arqueias, diretamente das amostras dos rejeitos, e construir bibliotecas de clones;

2.2.2 – Analisar a diversidade dos clones das bibliotecas por meio do sequenciamento parcial dos genes de RNAr 16S;

2.2.3 – Identificar e classificar taxonomicamente as arqueias dos rejeitos;

2.2.4 – Construir árvores filogenéticas;

2.2.5 – Quantificar por PCR em tempo real os procariotos predominantes nas comunidades de cada rejeito amostrado;

2.2.6 – Comparar a diversidade de arqueias dos rejeitos recém-produzidos e depositados.

3 – Material e Métodos

3.1 - Amostragem

Neste trabalho investigou-se a composição de comunidades de aqueias de rejeitos de uma indústria siderúrgica. As amostras de rejeitos foram coletadas na Acesita Cia Aços Especiais (Timóteo, Minas Gerais, Brasil). Os rejeitos estudados foram provenientes das seguintes etapas de produção do aço: lama de alto forno (LAF), pré-tratamento de gusa (PTG), processo de refinamento de metal com lança (RML), escória de aciaria (EA) e estação de tratamento de efluentes (ETE). Para o estudo da diversidade de arqueias, as amostras foram coletadas após sua liberação imediata no ambiente e misturadas em uma única amostra designada RRP (rejeito recém-produzido) (Figura 1). A outra amostra foi constituída pela mistura dos mesmos rejeitos, entretanto depositados em área externa adjacente à indústria e coletada quatro anos após sua liberação sendo designada RD (rejeito depositado) (Figura 2). Este depósito recebia diariamente cerca de 100 toneladas desses rejeitos.

As amostras, obtidas em triplicata, dos rejeitos recém-produzidos no interior da siderúrgica foram coletadas, em 2006, usando frascos esterilizados.



Figura 1: Coleta da amostra de dois tipos de rejeito recém-produzido (RRP) no interior e exterior da indústria.



Figura 2: Coleta da amostra de rejeito depositado (RD)

3.2 - Análise química dos rejeitos

A análise química dos rejeitos foi efetuada pela Acelor-Mittal usando Mössbauer e raio-X. A espectroscopia Mössbauer é baseada no chamado efeito Mössbauer, que consiste na absorção ressonante de radiação gama nuclear sem recuo nuclear. Uma fonte radioativa adequada é utilizada para emitir radiação gama, que por sua vez pode ser absorvida por núcleos específicos presentes na amostra (MAGALHÃES, 2008).

3.3 – Extração do DNA total

O DNA metagenômico foi extraído das amostras utilizando Megaprep Power Max™ Soil KIT (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de DNA foi determinada pelo espectrofotômetro Nanodrop Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 (Labtech International, Reino Unido), e sua qualidade avaliada através das razões A260/A280 e A260/A230 e armazenado a -20°C, até posterior processamento.

3.4 - Amplificação por PCR do gene de RNAr 16S e construção das bibliotecas de clones

Fragmentos do gene de RNAr 16S foram amplificados utilizando os iniciadores 16SaF (5'TTATTGGGCCTAAAGCRT3') e 1400aR (5'CGGCGAATTCGTGCAAGGAGCAGGGAC 3') (CLEMENTINO *et al.* 2007), para a construção da biblioteca de clones. A amplificação foi realizada sob as condições descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Condições da termociclagem para amplificação do gene de RNAr 16S de arqueias.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min.)
Desnaturação inicial	94	2
Desnaturação	94	1
*Anelamento dos iniciadores	55	1
Extensão	72	3
Extensão final	72	30

* O último ciclo repete 30 vezes.

Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml). A banda alvo (850 pb) foi excisada e purificada utilizando-se Silica Gel Extraction Kit (Fermentas, Canada), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram ligados no TMCloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas, Canada) e transformados em células de *E. coli* XL1-Blue eletrocompetentes.

Os clones foram selecionados em placas contendo meio Luria Bertani-LB (SAMBROOK *et al.*, 1989), suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C por 24 horas. A presença do inserto levou à perda da função letal do gene, fazendo com que fosse identificado o crescimento apenas das colônias contendo os plasmídios com os insertos de interesse. Essas colônias foram coletadas com palitos esterilizados e depositadas em microplacas com 96 poços, contendo 250 µL de meio LB suplementado

com ampicilina (50 µg/ml) e glicerol (15% v/v). As placas foram seladas, incubadas a 37°C por 24 horas e, posteriormente, estocadas em ultrafreezer a - 80°C.

3.5 - Validação da biblioteca dos clones

Todos os clones de cada biblioteca foram analisados para a presença do inserto contendo os genes de RNAr 16S. A cultura dos clones foi utilizada como molde em reações de PCR tendo como iniciadores pJET-2F (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') e pJET-2R (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG - 3') que se anelam no vetor que flanqueia a região do inserto clonado. Os amplicons foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), visualizados sob luz ultra-violeta.

3.6 - Sequenciamento do gene de RNAr 16S e análise filogenética

As reações de sequenciamento foram realizadas com os mesmos iniciadores utilizados para a amplificação por PCR utilizando-se o Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied BioSciences) com o sequenciador de DNA (ABI Prism 3130, Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. As sequências parciais foram analisadas quanto à qualidade, alinhadas e montadas a fim de produzir um consenso utilizando-se os programas Phred v.0.020425 (ERWIING & GREEN, 1998), Phrap v.0.990319 (GREEN, 1994) e Consed 12,0 (GORDON *et al.* 1998), em sistema operacional Linux. As bases produzidas com baixa qualidade foram removidas (índice de qualidade < 20), gerando uma sequência consenso de alta qualidade

Sequências resultantes da edição foram verificadas através do software Bellerophon (HUBER *et al.* 1994) sendo as quimeras excluídas das análises posteriores.

As sequências foram comparadas nos bancos de dados usando as ferramentas de pesquisa disponíveis no GenBank BLASTN e RDP Classifier para determinar suas afiliações filogenéticas. As sequências de DNAr 16S referência foram identificadas ou importados para o banco de dados ARB-SILVA (versão 108) (<<http://www.arb-silva.de/>>). A árvore de consenso 16S DNAr baseou-se na distância de matriz (ARB neighbor-joining). Sequências relacionadas foram identificadas pela ferramenta do GreenGenes usando o banco de dados Silva (DeSantis *et al.*, 2006). Relações filogenéticas foram inferidas com o software ARB (LUDWIG *et al.*, 2004) usando o método de neighbor-joining (SAITOU & NEI, 1987). Para as análises estatísticas, as sequências obtidas foram alinhadas, usando os programas CLUSTAL W e MEGA 4,0 (KUMAR *et al.*, 2004). As OTUs (unidade taxonômica operacional) foram definidas a partir do programa DOTUR (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2005), considerando o nível de distância genética de 0,03 ou 3%, uma vez que níveis $\geq 97\%$ de similaridade entre sequências têm sido proposto para classificar um micro-organismo no nível de espécie (DRANCOURT *et al.*, 2000), gerando curvas de rarefação. O programa DOTUR foi aplicado também para calcular riqueza, diversidade, e estimar a representação de OTUs de modo a caracterizar a diversidade de arqueia nas amostras. Neste programa, cada *dataset* correspondeu a uma área amostral (RRP e RD). Já agrupadas e alinhadas, as sequências foram usadas para gerar matrizes de distância (*Phylog Distance Matrix*), utilizadas para obter índices de riqueza (Chao1), diversidade (Shannon e Simpson) e cobertura (ACE). O índice de Chao1 usa o número de OTUs com uma ou duas sequências para estimar o número de espécies raras, pois de acordo com o autor, essa informação está presente nas OTUs (CHAO, 1984). O índice de Shannon é determinado pela riqueza de OTU, sendo um índice geral de diversidade sensível a riqueza e abundância relativa de espécies (ATLAS; BARTHA, 1998).

Enquanto que o índice de Simpson é altamente influenciado pela abundância da OTU mais comum encontrada na amostra (HUGHES & BOHANNAN, 2004). O índice ACE estima a cobertura baseada na abundância. A cobertura da biblioteca foi calculada utilizando-se a equação $C = 1 - (n/N)$, onde n indica o número de OTUs únicas e N o número de sequências analisadas na biblioteca (GOOD, 1953)

3.7 - PCR quantitativo (PCRq)

Para a análise da abundância relativa de procariotos, os genes de RNAr de 16S de arqueia e bactéria foram quantificados utilizando-se os iniciadores 344f (RASKIN *et al.* 1994) e 518r (MUYZER *et al.* 1993, modificado) e 338f e 518r (MUYZER *et al.*, 1993), respectivamente. As amplificações foram realizadas com o SYBR green PCR Master Kit (Applied Biosystems). Todas as amplificações de qPCR foram realizadas em triplicata no sistema de detecção de sequências ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, Calif.)

As condições de ambas as reações estão descritas na Tabela 2. Curvas padrão foram geradas a partir de sete diluições, em triplicata, dos amplicons do gene de RNAr 16S obtidos com PCR convencional de *Halococcus morrhuaea* ATCC 17082 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Uma reação controle sem DNA molde foi incluída em cada ensaio de qPCR. Para determinar o número de cópias do gene de RNAr 16S acessou-se <http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html> (STAROSCIK, 2004).

Tabela 2: Condições da termociclagem para PCR quantitativa do gene de RNAr 16S de arqueias e bacterias.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	95	10'
*Desnaturação	95	15''
*Anelamento dos iniciadores	60	1'
Desnaturação	95	15''
Extensão	60	15''
Desnaturação final	95	15''

As etapas marcadas com * repetem 40 ciclos.

4 – Resultados e Discussão

4.1 - Composição Química dos Rejeitos

A caracterização química das amostras de rejeitos siderúrgicos recém-produzidos (RRP), coletadas no interior da indústria, está apresentada na Tabela 3. A análise química mostrou que os rejeitos possuem diferentes composições. Os dados da Tabela 3 são referentes a cada etapa do processo de obtenção do aço, sendo PTG, pré-tratamento de gusa; RML, refinamento de metal com lança; EA, escória de aciaria; ETE, estação de tratamento de efluentes. Quantidades maiores de SiO₂ foram encontradas em PTG, de CaO em EA, de MgO em EA, de Cr em RML, de S em ETE e de P₂O₅ em EA.

Tabela 3: Caracterização química (%) dos rejeitos siderúrgico recém-produzidos (RRP).

Rejeitos	Elementos/óxidos (%)					
	SiO ₂	CaO	MgO	Cr	S	P ₂ O ₅
PTG	20,73	9,05	1,88	0,14	0,61	0,11
RML	1,39	13,55	1,6	9,7	0,01	0,02
EA	11,7	47,94	8,72	0,83	0,3	2,11
ETE	0,81	21,4	2,28	3,1	10,3	0,119

Nota: PTG, pré-tratamento de gusa; RML, refinamento de metal com lança; EA, escória de aciaria; ETE, estação de tratamento de efluentes.

O cromo é um elemento essencial requerido em pequenas quantidades no metabolismo dos seres vivos, mas em excesso pode trazer problemas para a saúde,

podendo afetar o sistema respiratório e causar câncer. Em altas concentrações, pode contaminar o ambiente e por bioacumulação afetar a cadeia alimentar (RIBEIRO *et al*, 2009). A quantidade máxima permitida deste metal em solos é de 125 mg/Kg (CONAMA, 1986). O Cr é classificado na classe 1 dentre os resíduos sólidos considerados perigosos pela Norma Brasileira 10004 (CONAMA, 2004), o que torna de grande importância seu estudo ambiental. Portanto, a alta proporção de Cr encontrada no rejeito RML merece atenção. O SiO₂ (óxido de silício), um dos componentes da areia não é tóxico ao ambiente, porém suas partículas, se inaladas em grande quantidade, têm efeito carcinogênico além de causar silicose e tuberculose, dentre outras doenças (FILHO & SANTOS, 2006).

No geral, as poeiras minerais contendo sílica livre cristalizada podem propiciar o desenvolvimento de fibrose pulmonar. O setor mineral é um dos maiores responsáveis por aposentadorias de trabalhadores por doenças respiratórias. O CaO (óxido de cálcio), também conhecido como cal virgem, é um óxido básico que, ao reagir com a água, forma hidróxido de cálcio. Sua alta proporção no ambiente pode mudar o pH para alcalino, e pode modificar a composição da comunidade microbiana presente neste ambiente, já que possui propriedades antimicrobianas (FOREMAN & BARNES, 2007). O MgO (óxido de magnésio) pode provocar irritações à pele e mucosas, febre e reações adversas ao pulmão. Não se encontra relacionado nas Resoluções do CONAMA para este óxido qualquer padrão de emissão específico ao agente de risco (EMBRAPA, 2007). Na forma em que foi encontrado nos rejeitos estudados, o S (enxofre) não é tóxico ao ambiente. O enxofre encontra-se no estado sólido à temperatura ambiente. É um elemento químico essencial para todos os organismos vivos, sendo constituinte importante de muitos aminoácidos. Entretanto, o dissulfeto de carbono, o sulfeto de

hidrogênio e o dióxido de enxofre devem ser manuseados com cuidado por serem bastante tóxicos. O dióxido de enxofre, que pode ser formado com a reação do S com o oxigênio do ar, reage com a água da atmosfera produzindo chuva ácida. e, em altas concentrações, reage com a água dos pulmões, provocando hemorragia. O P_2O_5 (pentóxido de fósforo) reage rapidamente com o oxigênio do ar atmosférico. De forma geral, todos os metais e seus compostos possuem toxicidade, ou seja, a capacidade inerente que um elemento químico tem para causar efeitos adversos sobre os organismos vivos. O fator-chave é o grau de exposição que afeta o organismo. A exposição está relacionada tanto com a quantidade envolvida como com o tempo de exposição (GOYER, 1996; GOYER & CLARKSON, 2001). De fato, para a Organização Mundial da Saúde — órgão da ONU —, “poluição ou contaminação ambiental é uma alteração do meio ambiente que pode afetar a saúde e a integridade dos seres vivos”.

Portanto, o estudo químico de um determinado ambiente se faz necessário. Além disso, as relações entre os seres vivos e as condições do ambiente assumem determinadas características cujo estudo possibilita entender e, algumas vezes, até fazer previsões diante de determinadas intervenções propostas para esse espaço. Assim, o estudo dos fatores bióticos e abióticos pode apontar as relações entre os elementos físicos do ambiente e sua influência na distribuição espacial dos seres vivos. Uma interessante diversidade de micro-organismos tem sido verificada em ambientes ricos em metais, tanto comunidades nicho-específicas como ainda não relatadas nestes ambientes (STEIN *et al.*, 2002).

4.2 - Diversidade de arqueias

O domínio *Archaea* abriga membros metabolicamente diversos e adaptados a ambientes extremos. São também encontradas no solo, oceanos e água doce desempenhando papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos desses ambientes (GRIBALDO & BROCHIER-ARMANET, 2006). Devido à dificuldade de isolar e cultivar arqueias presentes em ambientes naturais, a abordagem independente de cultivo tem sido amplamente utilizada como ferramenta para acessar sua diversidade. Além disso, deve-se considerar as grandes limitações de cultivo desses micro-organismos e a enorme quantidade de sequências do gene de RNAr 16S disponível em bancos de dados.

Assim, para identificação e análise filogenética de arqueias indígenas, bibliotecas de clones de genes de RNAr 16S foram construídas a partir das amostras de dois diferentes tipos de rejeito, sendo RRP (rejeito recém-produzido) e RD (rejeito depositado) e suas sequências foram comparadas com aquelas presentes nos bancos de dados. Neste estudo, foram obtidas 158 sequências parciais do gene de rRNA 16S, após a remoção de sequências quiméricas. Essas sequências foram agrupadas em OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais), que são objetos de comparação para inferir filogenia, usando o programa DOTUR (97% de similaridade). Neste programa, cada conjunto de dados corresponde a uma das amostras (RRP e RD). Sequências agrupadas e alinhadas foram usadas para gerar matrizes de distância (Phylip Distance Matrix). Estas sequências foram agrupadas em 14 OTUs, sendo 13 de RRP e 1 de RD (Tabela 4), indicando contrastante diferença entre a diversidade das comunidades de arqueias. Este dado é suportado pelo fato de RRP ser um ambiente extremo e RD ser não extremo para esses micro-organismos. Altos valores de cobertura foram obtidos por estas bibliotecas,

sendo 90,8% para RRP, e 100% para RD, indicando que a diversidade em ambas bibliotecas foi plenamente detectada.

A diversidade de clones das bibliotecas (RRP e RD) do gene de rRNA 16S foi avaliada através dos índices de Shannon, Simpson, Chao1 e ACE (Tabela 4). Estes índices, dentre outros, são vastamente utilizados para análise da diversidade. O índice de Shannon é uma ferramenta muito útil para comparar a diversidade (riqueza de OTUs) entre comunidades. Este índice varia de 0 a 5 e quanto maior o valor encontrado maior será a diversidade e menor a abundância de determinados grupos. O índice de Simpson, altamente influenciado pela abundância da OTU mais comumente encontrada na amostra, mostra a probabilidade que dois indivíduos tomados aleatoriamente em uma comunidade pertençam a uma mesma espécie. Este índice varia de 0 a 1 e quanto menor o valor encontrado menor será a probabilidade que dois indivíduos tomados ao acaso na amostra pertençam a uma mesma espécie (HUGHES & BOHANNAN, 2004). O índice não-paramétrico ACE (Abundance-based Coverage Estimator) avalia as espécies observadas, as quais são separadas em grupos de espécies raras e abundantes. Apenas o grupo de espécies raras é utilizado para estimar o número de espécies ausentes. O índice não-paramétrico Chao1 também estima a riqueza total de espécies, sendo um método que utiliza o número de OTUs *singletons* (OTU recuperada uma única vez) e *doubletons* (OTU recuperada duas vezes) para estimar o número de espécies ausentes (CHAO, 1984).

Considerando a escala de 0 a 5 do índice Shannon, as amostras dos rejeitos RRP e RD apresentaram baixos índices de diversidade no nível de espécie (97% de corte), 1,43 e 0,21, respectivamente (Tabela 4). Este índice é o mais amplamente usado em ecologia para diferentes tipos de organismos, onde valores típicos caem entre 1,5 e 4, com os maiores valores significando maior diversidade (SOLANO *et al*, 2009). Usando

o índice Simpson, a estimativa de diversidade no nível de espécie (97% de corte) para os rejeitos RRP e RD foi de 0,42 e 1, respectivamente. Estes valores representam as probabilidades de 42% e 100% de duas OTUs tomadas ao acaso das bibliotecas pertencerem à mesma espécie, o que evidencia a homogeneidade das amostras, principalmente a de RD. Com relação à riqueza de espécies estimada pelos índices ACE e Chao1, os valores foram maiores para a comunidade de arqueia da amostra RRP, em que quanto maiores os valores, maior a diversidade. O valor de 0 encontrado pelo índice ACE em RD está relacionado ao fato deste índice ser baseado no número de espécies raras, mais uma vez evidenciando a homogeneidade da amostra (Tabela 4).

Os dados observados contrastam com o trabalho de Freitas *et al* (2008) que observou uma grande diversidade de bactérias nos mesmos rejeitos amostrados no presente trabalho, sendo a diversidade maior em RD. Os clones foram agrupados em 101 OTUs, com alcance de 46% da diversidade da amostra (cobertura da biblioteca) e, em RRP, foram obtidas 22 OTUs e cobertura de 75%.

Tabela 4: Análise dos clones, diversidade das sequências e cobertura das bibliotecas de clones do gene de rRNA 16S dos rejeitos recém-produzidos (RRP) e depositados (RD). Dados foram estimados pelo programa DOTUR usando 97% de similaridade do gene de rRNA 16S .

Parâmetros	RRP	RD
Clones	82	84
Quimeras	6	2
OTUs	13	1
Cobertura da biblioteca	90,8%	100%
Shannon	1,43	0,21
Simpson	0,42	1
Chao1	23,5	1
ACE	24,3	0

Rarefação representa um poderoso método estatístico para calcular o número esperado de espécies em função do esforço amostral (exploração da amostra). Ela permite comparar a riqueza observada entre amostras dos ambientes que foram amostrados de forma desigual. Assim, a curva de rarefação fornece informações sobre a proporção de espécies na comunidade que foram detectadas e estima as diferenças de riqueza entre as amostras. Neste estudo, as curvas de rarefação das comunidades amostradas foram geradas pelas OTUS com 97% de similaridade do gene de RNAr 16S.

A curva de rarefação da biblioteca de clones de RRP mostrou tendência para saturação, sugerindo que o número de clones sequenciados foi suficiente para estimar a maior parte da diversidade de arqueias que colonizavam o rejeito RRP (Figura 3). Este resultado é também suportado pelo cálculo da cobertura desta biblioteca de 90,8%. Por outro lado, as sequências de RD agruparam-se em apenas uma única OTU, demonstrando uma baixíssima diversidade. Uma diversidade limitada foi encontrada em sub-superfícies de fontes termais radioativas, com temperatura média de 45,6°C e o pH em torno de 8. O número de OTUs (com 97% de similaridade) encontradas foi de apenas quatro para arqueias (WEIDLER *et al.*, 2007). A curva de rarefação gerada indicou que plena estabilidade foi alcançada. A análise da curva de rarefação está em concordância com os índices de diversidade de Chao1 e ACE (Tabela 4). Portanto, a análise dos índices de diversidade mostrou uma diferença significativa entre as duas bibliotecas de clones, indicando, ainda, limitada diversidade em ambos os rejeitos siderúrgicos. Observa-se, também, que a diversidade diminuiu com o tempo de depósito dos rejeitos, sendo 13 OTUs em RRP e apenas uma OTU em RD (Tabela 4).

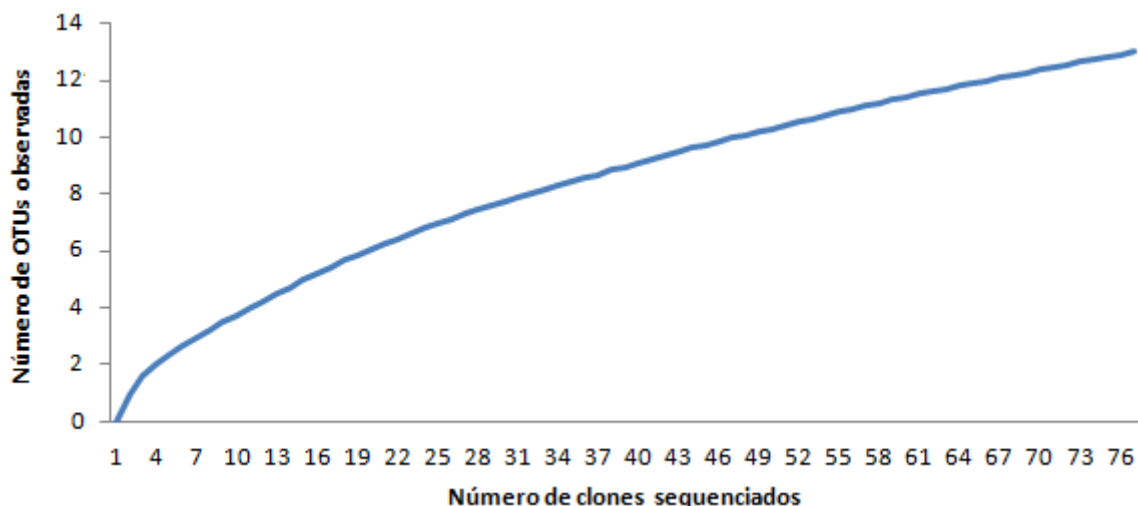


Figura 3. Curva de rarefação representando a cobertura da biblioteca de clones do rejeito recém-produzido (RRP). Os clones foram agrupados em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) no nível de 97% de similaridade.

4.3 – Composição filogenética das bibliotecas de clones

Nas duas últimas décadas abordagens independente de cultivo têm transformado o conhecimento da diversidade microbiana, especialmente de arqueias. Desde então, numerosos estudos usando diretamente o DNA ambiental têm revelado a distribuição global de arqueias, colonizando inclusive ambientes que superam os limites da vida. Entretanto, ao conhecimento do autor, este é o primeiro estudo de arqueias em rejeitos siderúrgico.

Para a análise da diversidade filogenética das sequências de DNAr 16S dos dois tipos de rejeitos foram selecionados aleatoriamente 156 clones (74 de RRP e 82 de RD, Tabelas 5 e 6). A análise filogenética das bibliotecas de clones RRP e RD revelou que a composição de arqueias dos rejeitos mudou ao longo do tempo. A distribuição e composição filogenética de arqueias em RRP são mostradas na figura 4. A biblioteca de

clones RRP abrigou 13 OTUs que foram classificadas em três filos: Crenarchaeota, Euryarchaeota e Thaumarchaeota. Crenarchaeota foi o filo predominante, com nove OTUs (70 clones), enquanto os filos Euryarchaeota e Thaumarchaeota foram representados por duas OTUs cada um. Por outro lado, a biblioteca de clones RD abrigou uma única OTU (82 clones) afiliada ao filo Crenarchaeota, tendo esse filo, uma prevalência de 100% em RD. As árvores filogenéticas são mostradas nas Figuras 5 e 6.

Tabela 5 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones de arqueias em rejeitos recém-produzido (RRP).

Filo	Número de clones	Arqueia relacionada	Número de acesso	Identidade (%)	Habitat da arqueia relacionada
Crenarchaeota	49	<i>Thermofilum pendens</i> str. Hrk 5	CP000505.1	83.23	Fontes termais na Nova Zelândia
	1	<i>Staphylothermus marinus</i>	X99560	80.95	Fontes termais submarinas
	5	<i>Thermofilum pendens</i> str. Hvv3DSM2475	NR_029214.1	81.08	Fontes termais na Nova Zelândia
	3	<i>Ignisphaera aggregans</i> str. AQ1.S1	DQ060321.1	82.37	Fontes termais na Nova Zelândia
	1	<i>Ignisphaera</i> sp. str. Tok37.S1	DQ060323.1	82.01	Fontes termais na Nova Zelândia
	7	<i>Ignisphaera</i> sp. str. Tok10A.S1	DQ060322.1	82.59	Fontes termais na Nova Zelândia
	1	<i>Ignisphaera aggregans</i> str. AQ1.S1	DQ060321.1	81.05	Fontes termais na Nova Zelândia
	2	<i>Ignisphaera aggregans</i> str. AQ1.S1	DQ060321.1	82.79	Fontes termais na Nova Zelândia

Tabela 5 - Continuação

Filo	Número de Clones	Arqueia relacionada	Número de acesso	Identidade (%)	Habitat da arqueia relacionada
Crenarchaeota	1	<i>Ignisphaera aggregans</i> str. AQ.S1	DQ060321.1	82.38	Fontes termais em Nova Zelândia
Euryarchaeota	1	<i>Methanocaldococcus vulcanius</i> str. M7	AF051404.1	80.00	Lagoa artificial de sal
	3	<i>Halobacterium salinarum</i> str. Cer6a	AY994198.1	99.87	Lagoa artificial de sal
Thaumarchaeota	1	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> str. SCM1	NC_010085.1	91.20	Água do Mar
	1	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> str. SCM1	CP000866.1	87.70	Água do Mar

Tabela 6 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones de arqueias em rejeitos depositados (RD)

Grupo Filogenético	Número de Clones	Sequencia/Micro-organismo relacionado	Número de acesso	Identidade (%)	Habitat da sequencia relacionada
Crenarchaeota	82	Crenarchaeota não cultivável	CU916928.1	98.00	Digestor anaeróbio mesofílico de tratamento de lodo de esgoto

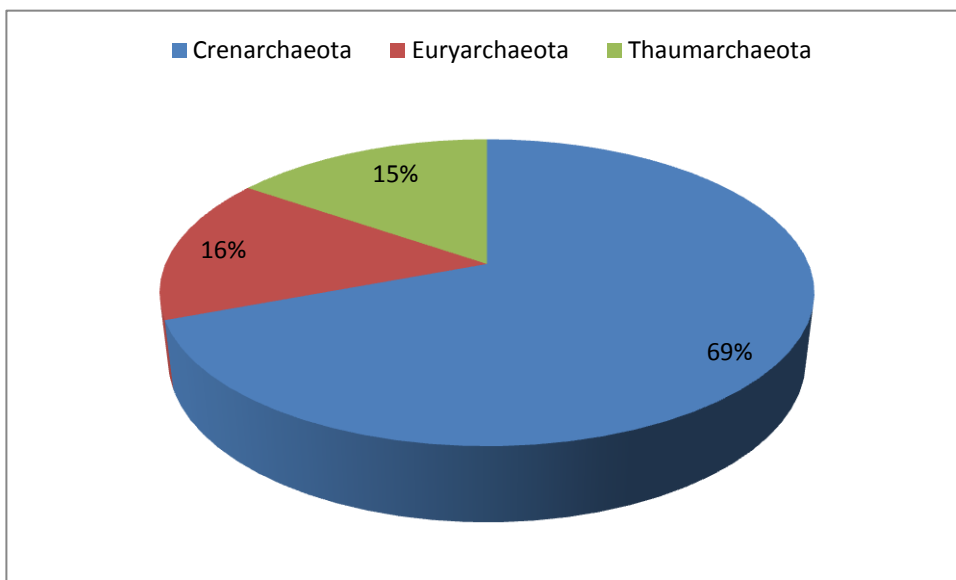


Figura 4 - Distribuição filogenética (em %) de sequências de DNAr das amostras de RRP.

A maioria das OTUs da biblioteca de RRP, exceto duas (do filo Thaumarchaeota), apresentaram maior identidade com arqueias encontradas em ambientes extremos, como altas temperaturas e altas concentrações de sais (Tabela 5). Apenas uma OTU desta biblioteca foi identificada no nível de espécie, sendo afiliada a *Halobacterium salinarum* (99,87% de identidade). Membros deste gênero são encontrados em ambientes extremamente salinos (FALB *et al.* 2008), podendo ser classificadas como: halofílicas moderadas, que crescem de 5 a 20% de NaCl, e halofílicas extremas, que crescem nas concentrações de 20 a 30% de NaCl (OLLIVER *et al.* 1994).

Todas as OTUs do filo Crenarchaeota não foram afiliadas a única classe Thermoprotei, indicando uma nova classe deste filo, dado este indicado pela baixa identidade encontrada (<84%). Os micro-organismos mais intimamente relacionados

com as OTUs verificadas neste trabalho foram *Ignisphaera aggregans*, com 66,6% de predominância, seguida por *Thermofilum pendens* (22,2%) e *Staphylothermus marinus* (11,1%) (Tabela 5). Os gêneros *Staphylothermus* e *Ignisphaera* pertencem à família Dessulfurococcacea e *Thermofilum* pertencem à família Thermofilaceae. O filo Crenarchaeota é encontrado em ambientes de temperaturas extremas (BUCKLEY, GRABER; SCHIMIDT, 1998), ambientes marinhos (DeLONG *et al.*, 1992), e solos (UEDA *et al.*, 1995), como também em não extremos (DELONG, 1992, DELONG *et al.*, 1998). Essa diversidade em habitats também é verificada dentro da classe Thermoprotei, que compreende principalmente organismos acidofílicos e termofílicos heterotróficos (REYSENBACH, 2001). Está dividida em quatro ordens: Thermoproteales (ZILLIG *et al.*, 1981), Caldisphaerales (GARRITY *et al.*, 2004), Desulfurococcales (HUBER & STETTER, 2001) e Sulfolobales (STETTER, 1989). Assim, devido à baixa identidade com os representantes dessa classe, as OTUs do filo Crenarchaeota da amostra de RRP podem pertencer a uma nova classe. Sequências de DNAr 16S de crenarchaeota constituíram 75% dos clones de arqueia em um córrego, historicamente impactado pela mineração, contaminado por metais (REIS *et al.*, 2013). Arqueias da ordem Thermoplasmatales foram verificadas em áreas ricas em sílica (Kaur *et al.*, 2011) e crenarchaeotas do grupo I foram identificadas em precipitados ricos em Ferro silicosos em fontes hidrotermais (LI *et al.*, 2012).

As duas OTUs afiliadas com Euryarchaeota foram representadas pelas espécies *Methanocaldococcus vulnanius* e *Halobacterium salinarum* que pertencem às classes Methanococci e Halobacteria, respectivamente (Tabela 5). O filo Euryarchaeota é também bastante diverso filogeneticamente e inclui micro-organismos halofílicos, termofílicos e metanogênicos (PESADRO & WIDMER, 2002). Foi pouco

representativo nos rejeitos de siderurgia, representando 15,4% dos clones de RRP. Methanococci e Halobacteria foram as classes verificadas nesse grupo. A baixa identidade de uma das OTUs (80%) não permite a identificação desta a nível de classe, podendo também representar uma nova classe do filo Euryarchaeota. Por outro lado, a alta identidade de uma OTU (> 98%) permite a afirmação de que se trata da espécie *Halobacterium salinarum*. A classe Halobacteria abriga micro-organismos de ambientes extremamente salinos (FALB *et al.* 2008), podendo ser classificadas como: halofílicas moderadas, que crescem de 5 a 20% de NaCl, e halofílicas extremas, que crescem nas concentrações de 20 a 30% de NaCl (OLLIVER *et al.* 1994). Espécies da família Halobacteriaceae e da ordem Haloanaerobiales têm despertado grande interesse, pois abrigam arqueias aeróbias e anaeróbias, uma vez que muitas arqueias anaeróbicas apresentam grande potencial biotecnológico para a produção de moléculas adaptadas aos processos industriais que operam com baixa tensão de oxigênio e com altas concentrações de sais (HORIKOSHI, 1999). Esses organismos desenvolveram estratégias para se adaptar à salinidade, sendo uma delas o ajuste da concentração dos solutos intracelulares de maneira a compensar o aumento da salinidade externa. Íons inorgânicos como K⁺ e Cl⁻ são os mais utilizados no equilíbrio da osmolaridade (GRANT 2004). O interesse em micro-organismos halofílicos produtores de compostos biologicamente ativos vem crescendo, mas a maior parte das espécies que compõem essas comunidades microbianas ainda não foi isolada em cultura pura. Como alternativa para a prospecção dessa biota, os metagenomas de ambientes halofílicos vem sendo utilizados com sucesso na identificação de genes alvos envolvidos na síntese de produtos naturais de interesse comercial (CARDOSO *et al.* 2003).

O filo Thaumarchaeota foi representado por 2 OTUs, as quais foram relacionadas à espécie *Nitrosopumilus maritimus* (Tabela 5). A menor ocorrência de

Thaumarchaeota em RRP pode ser explicada pelo fato de esse filo abrigar as arqueias não-extremófilas, antigamente relacionadas em Crenarchaeota. Arqueias pertencentes ao filo Thaumarchaeota (BROCHIER-ARMANET *et al.*, 2008; SPANG *et al.*, 2010) podem deter um papel fundamental na nitrificação, dado possuírem genes que codificam a enzima amônia monooxigenase (FRANCIS *et al.*, 2005; LEININGER *et al.*, 2006; WUCHTER *et al.*, 2006; CAFFREY *et al.*, 2007; LAM *et al.*, 2007). O filo foi proposto baseado em dados filogenéticos, como seqüência de RNA ribossômico, e a presença de uma forma de topoisomerase tipo I, que previamente só era encontrada em eucariontes (BROCHIER-ARMANET, *et al.* 2008). Durante mais de um século, as bactérias oxidantes de amônia (AOB, ammonia-oxidizing bacteria) foram consideradas as principais responsáveis por este processo na natureza, embora recentemente tenha sido demonstrado este papel por arqueias pertencentes ao novo filo Thaumarchaeota e dado estarem amplamente distribuídas, sendo extremamente abundantes em vários ambientes, por vezes ordens de magnitude mais abundantes que as AOB (BROCHIER-ARMANET *et al.*, 2008; SPANG *et al.*, 2010). Enquanto várias propriedades fisiológicas e metabólicas foram já descritas nas AOB, apenas recentemente foi demonstrado que as arqueias oxidantes de amônia (AOA, ammonia-oxidizing archaea) são efetivamente capazes de oxidar amônia de forma autotrófica em diversos ambientes, tais como em ambientes marinhos (KÖNNEKE *et al.*, 2005; WALKER *et al.*, 2010; BLAINEY *et al.*, 2011), em fontes termais (DE LA TORRE *et al.*, 2008; HATZENPICHLER *et al.*, 2008) e em diversos solos (OFFRE *et al.*, 2009 e 2011; PRATSCHER *et al.*, 2011; TOURNA *et al.*, 2011; XIA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011). Diversos estudos indicam que as AOA estão geralmente mais ativas em ambientes oligotróficos e/ou com baixos níveis de pH e oxigênio. (LAM *et al.*, 2007; NICOL *et al.*, 2008; ERGUDER *et al.*, 2009; DI *et al.*, 2009; DI *et al.*, 2010; GUBRY-RANGIN *et al.*,

2010; MOLINA *et al.*, 2010; VERHAMME *et al.*, 2011). Arqueias pertencentes ao filo Thaumarchaeota, potencialmente capazes de oxidar amônia, estão amplamente distribuídas (PRESTON *et al.*, 1996; NICOL *et al.*, 2005; KOCH *et al.*, 2007; NAKAGAWA *et al.*, 2007; AYTON *et al.*, 2009; KALANETRA *et al.*, 2009). Foram identificados grupos de Thaumarchaeota em solos da Sibéria (OCHSENREITER *et al.*, 2003) e em solos do Ártico canadense (STEVEN *et al.*, 2007 e 2008) e em solos de Svalbard (HØJ *et al.*, 2005, 2006 e 2008). *Nitrosopumilus maritimus* é o único representante do filo Thaumarchaeota isolado em cultura pura (KÖNNEKE *et al.* 2005). Este organismo que oxida amônia como fonte de energia, foi recentemente isolado da água de aquário marinho. O *Cenarchaeum symbiosum* (simbionte de esponjas) também é um Thaumarchaeota que habita temperaturas mais amenas, assim como outras Thaumarchaeotas mesofílicas dos ambientes marinhos (PRESTON *et al.* 1996). A OTU de Thaumarchaeota com 87% de similaridade com *Nitrosopumilus maritimus* foi classificada a nível de classe. A classe Thaumarchaeota (ainda não possui outra nomenclatura) é a única deste filo e abriga três ordens: Nitrosocadales, Nitrosopumilales e Cenarchaeales. A outra OTU desse filo (com 91% de identidade com uma sequência de *Nitrosopumilus maritimus* contida nos bancos de dados) pode ser classificada a nível de ordem, sendo que membros da ordem Nitrosopumilales são abundantes em ambientes marinhos, sendo encontrados também em outros ambientes (AYTON *et al.*, 2009; KALANETRA *et al.*, 2009).

Por outro lado, a única OTU obtida da biblioteca RD apresentou alta identidade com arqueia não cultivada e obtida de digestor anaeróbico mesofílico para tratamento de esgoto. Como esperado para esse ambiente, a sequência mais intimamente relacionada foi obtida de um ambiente não termofílico.

A ocorrência de diferentes comunidades de arqueias se deve provavelmente a diferenças ambientais sofridas pelas amostras: enquanto a amostra RRP foi coletada imediatamente após a sua produção (alta temperatura), a RD teve sua origem a partir do depósito, que foi submetido às diferentes condições climáticas (chuvas e épocas secas) por alguns anos.

A árvore filogenética de RRP (Figura 5) corrobora os dados apresentados na identificação taxonômica. As mesmas OTUs que afiliaram-se a Crenarchaeota, novamente foram similares geneticamente a esse filo. As duas pertencentes ao filo Thaumarchaeota também apresentaram similaridade com Crenarchaeota. Isso pode ser devido ao fato de Thaumarchaeota abrigar as arqueias anteriormente classificadas como Crenarchaeota mesófilas. Algumas árvores filogenéticas baseadas em RNAr apresentam as sequências de arqueias mesófilas agrupadas no filo Crenarchaeota (SCHELEPER *et al*, 2005. Robertson (2005) mostrou que as sequências do grupo I (encontradas em ambientes não extremos) formavam um grupo irmão, dividindo um ancestral comum com crenarchaeotas hipertermófilas, mas não formavam um grupo monofilético com estas. Brochier-Armanet (2008), a partir de árvores filogenéticas de proteínas ribossômicas, propôs que o grupo I fosse considerado um grupo relativo às crenarchaeotas mesófilas, denominando-o filo Thaumarchaeota.

Como apresentado na figura 6, a única OTU de RD mostrou similaridade com uma crenarchaeota não cultivável, que está distantemente relacionada aos anteriormente sequenciados (termofílicos). Esse fato demonstra, mais uma vez, que esta OTU está relacionada a uma arqueia não termofílica.

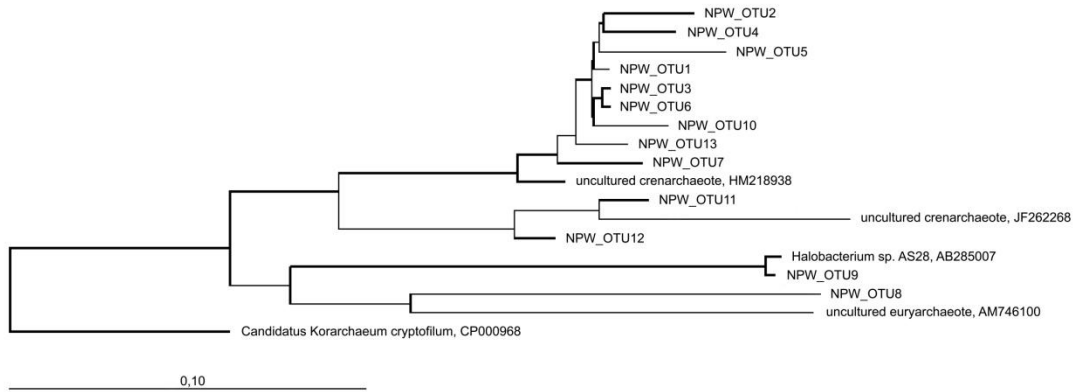


Figura 5 - Árvore filogenética mostrando as 13 OTUs obtidas em rejeitos recém-produzidos (RRP). A topologia gerada por Neighbour-Joining (1000 repetições de bootstrap) e bootstrap >50%, utilizando seqüências de genes de RNAr 16S, mostra as relações filogenéticas entre os clones derivados de RRP.

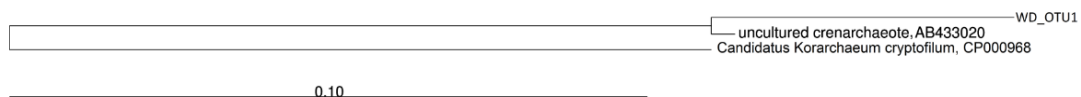


Figura 6 - Árvore filogenética mostrando a OTU obtida em rejeitos depositado (RD). A topologia gerada por Neighbour-Joining (1000 repetições de bootstrap) e bootstrap >50%, utilizando sequencias de genes de RNAr 16S, mostra as relações filogenéticas entre os clones derivados de RD.

Atualmente, são raros os estudos sobre a composição de comunidades procarióticas que habitam resíduos siderúrgicos. Freitas *et. al.* (2008) relatou a primeira

análise filogenética de bactérias nesse tipo de ambiente, e diferentemente deste estudo que usou a mesma amostra, encontrou maior diversidade em RD, sugerindo condição mais favorável para colonização de bactérias neste ambiente. É interessante destacar que RRP foi submetida a altas temperaturas. Com isso, pode-se inferir que em RRP, as arqueias foram favorecidas. A diferença da diversidade observada entre os domínios *Bacteria* e *Archaea* é devido colonização ao uso do ambiente por estes, que é mais restrito para arqueia do que para bactéria. Para as comunidades de arqueias, a riqueza de OTUs foi muito menor quando comparado com a riqueza das comunidades de bactéria, com isso a diversidade também tende a ser menor (ALLER & KEMP, 2008).

Na literatura não há estudos da ocorrência de arqueias em rejeitos de siderurgia, principalmente pelo fato da ecologia microbiana desse ambiente ainda ser pouco estudada. Contudo esses micro-organismos podem desenvolver importantes papéis na ciclagem dos compostos destes rejeitos, pois são micro-organismos que têm uma alta capacidade de se desenvolver em ambientes extremos (BUCKLEY *et al.* 1998), condição comum dessa classe de rejeitos. Em razão dos dados supracitados, faz-se importante a necessidade de se abranger o estudo desse grupo, especialmente esforços para o cultivo e conhecimento da fisiologia e, conseqüentemente, do papel ecológico desses grupos nos diversos ambientes em que são encontrados. O trabalho vem ainda crescer com dados de um ambiente pouco estudado, o conhecimento ainda insipiente sobre arqueias nesses ambientes. As sequências de nucleotídeos geradas serão depositadas no banco de dados GenBank.

4.4 - Quantificação dos genes de RNAr 16S de procariotos

Para avaliar a comunidade de procariotos nos rejeitos, utilizou-se PCR quantitativa em tempo real, como uma técnica molecular complementar para a determinação da abundância relativa de arqueias e bactérias. A PCRq foi realizada em triplicata, para se obter um valor preciso para a abundância do gene de RNAr 16S em cada tipo de rejeito. A quantificação de genes RNAr 16S de arqueias e bactérias gerou *slopes* de -3.00 e -3.33, e os valores de R² (Regressão logarítmica) foi de 0,98 e 0,99, respectivamente (Figuras 7A e B). A análise da PCRq demonstrou que a abundância de arqueias em RRP ($1,468 \times 10^5$ cel/g de rejeito; $3,67 \times 10^5$ cópias/g de rejeito) e em RD ($1,548 \times 10^5$ cel/g de rejeito; $3,87 \times 10^5$ cópias/g de rejeito) foi similar, enquanto que a abundância de bactérias em RD ($3,55 \times 10^6$ cel/g; $1,42 \times 10^7$ cópias/g de rejeito) foi 100 vezes maior do que em RRP ($4,95 \times 10^4$ cel/g de rejeito; $1,98 \times 10^5$ cópias/g de rejeito). A figura 8 apresenta a curva de diluição de ambas as ampliações. Além disso, os valores de Ct para cada amostra foram de 22 e 23 para arqueias e 15 e 21 para bactérias em RRP e RD, respectivamente (Figura 9).

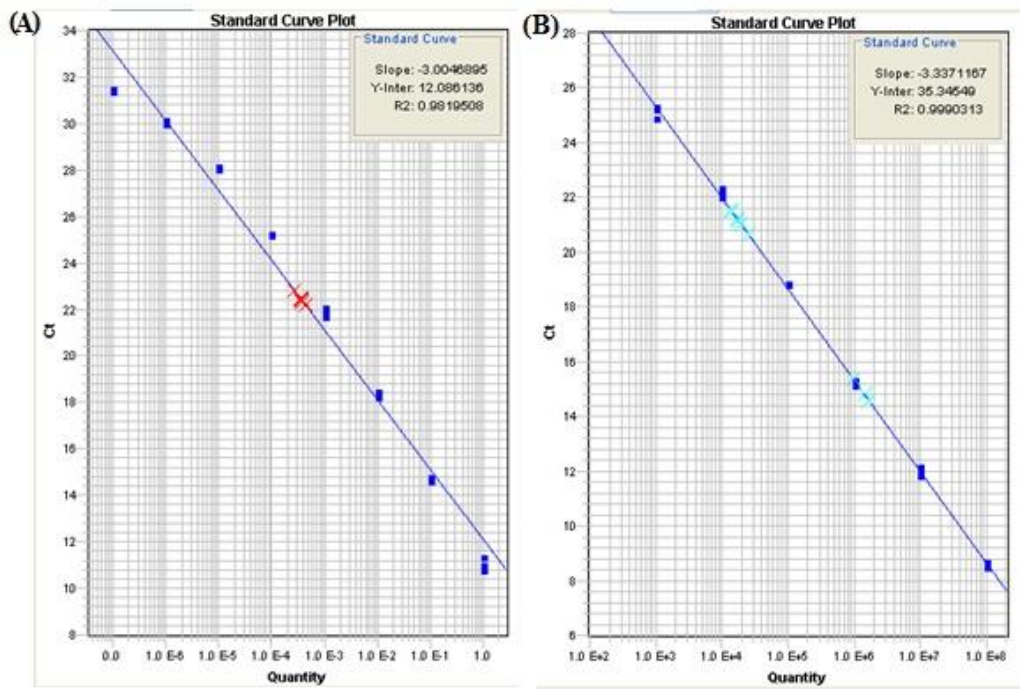


Figura 7 – Curvas padrão para arqueia(A) e bactéria (B).

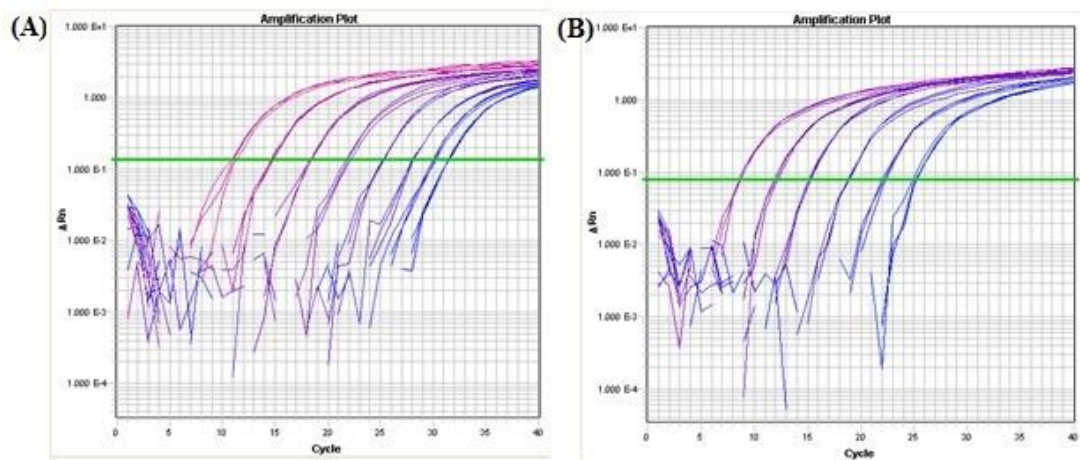


Figura 8 – Curvas de diluição para arqueia (A) e bactéria (B).

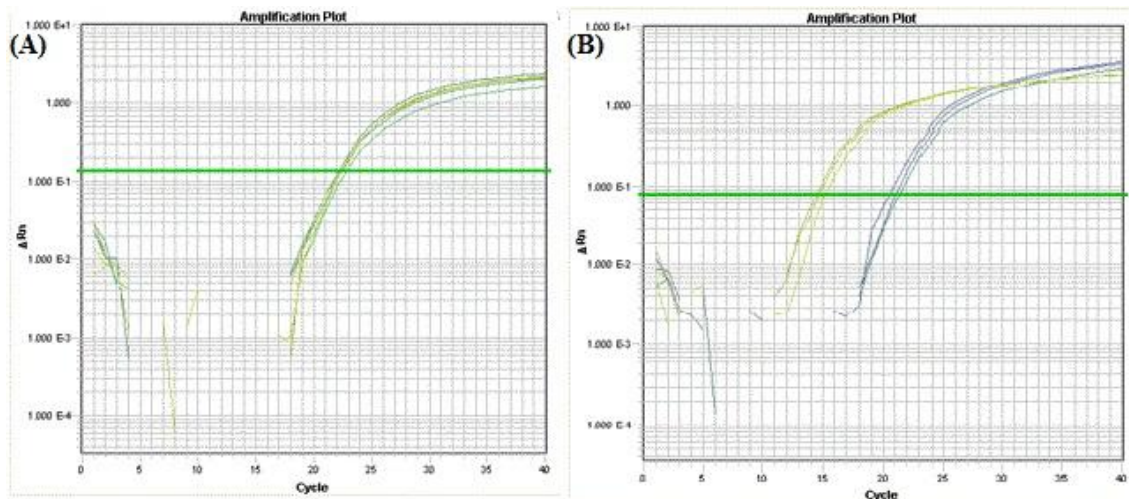


Figura 9 - Valores de Ct e amplificação dos genes de RNAr 16S de arqueia (A) e bactéria (B).

A análise de qPCR revelou uma abundância maior de arqueias em RRP e de bactérias em RD. Estes dados podem estar relacionados com a temperatura que inicialmente pode ter favorecido as arqueias e depois as bactérias. Dados da literatura indicam uma maior abundância de arqueias do que bactérias em ambientes termofílicos (WHITAKER *et al*, 2003; VALVERDE *et al*; 2012; STOTT *et al*; 2008). Além disso, vários estudos demonstram maior abundância de bactérias em ambientes terrestres (PICARDI *et al*, 1992; WURST *et al*, 2012) Apesar da abundância de bactérias ter sido maior em RD o número de cópias de DNAr é ainda inferior aos relatos da abundância de bactérias em amostras de solo (10^8 a 10^9 cópias/g solo) (HENRY *et al*, 2006), sugerindo que estes rejeitos apresentam um ambiente desfavorável a estes micro-organismos.

5 - Conclusão

A análise filogenética do gene de RNAr 16S permitiu caracterizar as comunidades de arqueias presentes nos rejeitos RRP e RD. Comunidades de arqueias distintas foram detectadas na bibliotecas dos rejeitos, refletindo, provavelmente, as diferenças na composição química e nas condições ambientais das amostras analisadas. Considerando que o conhecimento da composição taxonômica de comunidades ambientais é um indicador importante para sua função e ecologia, estes resultados poderão ser úteis para estudos mais completos, incluindo os aspectos ecológicos e melhor conhecimento dos micro-organismos pertencentes ao Domínio *Archaea*.

6 - Referências Bibliográficas

- Alberola T., Aptosoglou S., Arsenakis M., Bel Y., Delrio, Gellar D.J., Ferré J., Granero F.D., Guttman M., Koliais S., Martínezsebastián M.J., Prota R., Rubino S., Satta A., Scarpellini G., Sivropoulou A. & Vasara E. (1999)** “Insecticidal activity of strains of *Bacillus thuringiensis* on Larvae and Adults of *Bactrocera oleae* Gmelin (Dipt., Tephritidae)”. *J. Invertebrate Pathology*, 74: 127-136
- Allers T. & Mevarech M. (2005).** Archaeal genetics- the third way. *Nat Rev Genet.* 6:58-73.
- Almeida, A.S. (1992)** Controle e recuperação ambiental na mina de Cana Brava – Goiás. São Paulo, IPT. (Boletim IPT, 66).
- Assis H.F.S., Barbosa J.A.A. & Mota, T.S. (2011)** Avaliação dos impactos ambientais provocados pela atividade mineradora no município de Pedra Lavrada-PB. In: *Âmbito Jurídico*, Rio Grande, XIV, n. 90, jul 2011. Disponível em: http://www.ambitojuridico.com.br/site/?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=9925&revista_caderno=5. Acesso em dezembro 2012.
- Ayton J., Aislabie J., Barker G.M., Saul D., Turner S. (2010)** Crenarchaeota affiliated with group 1.1b are prevalent in coastal mineral soils of the Ross Sea region of Antarctica. *Environ Microbiol* 12: 689-703.
- Bintrim S.B., Donohue T.J., Handelsman J., Roberts G.P. & Goodman R.M. (1997)** Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94: 277-282.
- Bitar O.Y. (1997).** Avaliação da recuperação de áreas degradadas para mineração Região Metropolitana de São Paulo-SP
- Boetius A., Ravenschlag K., Schubert C.J., Rickert D., Widdel F., Gieseke A. (2000)** A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nat* 407:623-626
- Borneman J., Triplett E.W. (1997)** Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial populations shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 63, p. 2647-2653

- Branco V.T.F.C.** (2004) Caracterização de misturas asfálticas com o uso de escória de aciaria como agregado. Dissertação (Mestrado) – Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Brochier-Armanet C., Boussau B., Gribaldo S., Forterre P.** (2008) Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Microbiol* (3):245-252
- Brochier-Armanet C., Gribaldo S., Forterre P.** (2008). "A DNA topoisomerase IB in Thaumarchaeota testifies for the presence of this enzyme in the last common ancestor of Archaea and Eucarya". *Biol. Direct* 3: 54.
- Buckley D.H., Graber J.R., Schmidt T.M.** (1998) Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom Crenarchaeota and their diversity and abundance in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 64, p. 4333-4339,
- Buhring S.I., Smittenberg R.H., Sachse D., Di Lipp J.S., Golubia S., Sachs J.P., Hinrichs K.V., Summons R.E.** (2009) A hypersaline microbial mat from Pacific Atoll Kiritimati: insights into composition and carbon fixation using biomarker analyses and a C-13-labeling approach. *Geobiology*, Maldem, v. 7, n. 3, p. 308-323,
- Cadillo-Quiroz H., Yashiro E., Yavitt J.B., Zinder S.H.** (2008) Characterization of the archaeal community in a minerotrophic fen and terminal restriction fragment length polymorphism-directed isolation of a novel hydrogenotrophic methanoge *Appl Environ Microbiol.*(7):2059-68
- Caffrey J.M., Bano N., Kalanetra K., Hollibaugh JT** (2007) Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *ISME Journal*, New York, v. 1, n. 7, p. 660–662,
- Canhos, V.P., Vazoller, R.F.** (1999) *Microrganismos e vírus*. Document type: Book Source: Joly, C. A., Bicudo, C. E. M.. *Biodiversidade do Estado de São Paulo: síntese do conhecimento ao final do século XX* Press: São Paulo; s.n, 118.

- Canhos V.P. & Manfio G.P** (2001) Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. Disponível em: http://tamandua.inpa.gov.br/cpca/charles/pdf/Canhos-Manfio_Recbiol_2001.pdf. Acesso em novembro, 2012.
- Carey C.M., Kirk J.L., Ojha S. & Kostrzynska M.** (2006). Current and future uses of real-time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness. *Can. J. Microbiol.*, 53:537-550.
- Chaban B., Ng S.Y.M., Jarrell K.F.** (2006) Archaeal habitats from the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 52, p. 73-116,
- Chao A.** (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, Malden, v. 11, p. 265-270,
- Chen C. & Wang J.** (2008) Removal of Pb²⁺, Ag⁺, Cs⁺ and Sr²⁺ from aqueous solution by brewery's waste biomass. *Journal of Hazardous Materials* Volume 151, Issue 1, Pages 65–70.
- Clementino M.M., Fernandes C.C., Vieira R.P., Cardoso A.M., Polycarpo C.R. & Martins O.B.** (2007) Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region. *Journal of Applied Microbiology*, 103:141–151.
- Cury J.C.** (2006) Diversidade de Bacteria e Archaea em solos de mangue e marisma. 147p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba,.
- Dahllöf I.** (2002). Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr. Opinion Biotechnol.*, 13: 213-217.
- Delong E.F.** (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 89, n. 12, p. 5685–5689,
- Delong, E.F.** (2006) Archaeal mysteries of the deep revealed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 103, n. 17, n. 17, p. 6417-6418,

- Diallo M.D., Martens M., Vloemans N., Cousin S., Vandekerck-Hove T.T.** (2004) Phylogenetic analysis of partial bacterial 16S rDNA sequences of tropical grass pasture soil under *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Senegal. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, v. 27, n. 2, p. 238–252.
- Dias E.G.C.S.** (2001) Avaliação de impacto ambiental de projetos de mineração no Estado de São Paulo: a etapa de acompanhamento. Tese (Doutorado em Engenharia Mineral) Universidade de São Paulo.
- Diniz H. N., Galina M. H., Batista G. T. & Targa, M. S.** (2010) Hidrogeologia da Várzea do Rio Paraíba do Sul: estudo de caso de uma área de mineração no município de Tremembé, SP, Brasil. *Ambi-Agua*, Taubaté, 5:76-107.
- Dunbar J., Takala S., Barns S. M., Davis J. A. & Kuske C. R.** (1999). Levels of Bacterial Community Diversity in Four Arid Soils Compared by Cultivation and 16S rRNA Gene Cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4): 1662-1669.
- EMP** (2012) “Earth Microbiome Project” <http://www.earthmicrobiome.org/> . Acesso em dezembro, 2012.
- Elkins J.G., Podar M., Graham D.E., Makarova K. S., Wolf Y., Randau L., Hedlund B.P., BrochierArmanet C., Kunin V., Anderson I., Lapidus A., Richardson P., Keller M. and Stetter, K. O.** (2008) A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 8102 - 8107.
- Ferry J.G.** (1993) Methanogenesis. Ecology, physiology, biochemistry and genetics. Chapman & Hall, New York, N.Y.
- Filho M.T. & Santos U.P.** (2006) Silicosis. *J bras. pneumol.* vol.32 <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132006000800008> Acesso em novembro/2012
- Fischer S.G. & Lerman L.S.** (1979) Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell.* 16:191–200.
- Fischer S.G. & Lerman L.S.** (1983) DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci.* 80:1579–83.

- Foresti E.** (1997). Sistemas de tratamento anaeróbio. In: III Curso de tratamento biológico de resíduos. Santa Catarina, Florianópolis: UFSC.
- Foreman P.C., Barnes I.E.** (2007) A review of calcium hydroxide International Endodontic Journal
- Francis C.A., Roberts K.J., Beman J.M., Santoro A.E., Oakley B.B.** (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 102, n. 41, p. 14683–14688,.
- Freitas D.B., Reis M.P., Freitas L.M., Assis P.S., Chartone-Souza E., & Nascimento, A.M.A.** (2008). Molecular bacterial diversity and distribution in waste from a steel plant. *Canadian journal of microbiology*, 54(12), 996-1005.
- Galand P.E., Fritze H., Conrad R. & Yrjala K.** (2005). Pathways for methanogenesis and diversity of methanogenic archaea in three boreal peatland ecosystems. *Appl Environ Microbiol*, 71:2195-2198.
- Galvão L.A.C. & Corey G.** (1987) Mercurio. Metepec: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud (ECO/OPS). O Cromo e o Meio Ambiente
- Grahn N., Olofsson M., Ellnebo-Svedlund K., Monstein H. J. & Jonasson J.** (2003). Identification of mixed bacterial DNA contamination in broad-range PCR amplification of 16S rDNA V1 and V3 variable regions by pyrosequencing of cloned amplicons. *FEMS Microbiol. Lett.*, 219: 87-91.
- Gribaldo S. & Brochier-Armanet C.** (2006) The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 361:1007–1022.
- Goyer R.A., & Clarkson T. W.** (1996). Toxic effects of metals. *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, Fifth Edition, Klaassen, CD [Ed]. McGraw-Hill Health Professions Division, ISBN, 71054766.*
- Gumerov V.M., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Prokofeva M.I., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V. & Skryabin K.G.** (2011). Complete genome sequence of “*Vulcanisaeta moutnovskia*” strain 768-28, a novel member of the

hyperthermophilic crenarchaeal genus *Vulcanisaeta*. *Journal of bacteriology*, 193(9), 2355-2356.

Handelsman J. (2004). Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 669–685.

Healy M., Huong J., Bittner T., Lising M., Frye S., Raza S., Schrock R., Manry J., Renwick A., Nieto R., Woods C., Versalovic J. and Lupski J.R. (2005) Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 43, 199–207.

Hohn M.J., Hedlund B.P. & Huber H. (2002) Detection of 16S rDNA Sequences Representing the Novel Phylum “Nanoarchaeota”: Indication for a Wide Distribution in High Temperature Biotopes. *Systematic and Applied Microbiology Volume 25, Issue 4, 2002, Pages 551–554.*

Holguin G., Vazquez P., Bashan Y. (2001) The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems; an overview. *Biology and Fertility of Soils, Heidelberg, v. 33, p. 265-278.*

Huang Q., Dong C.Z., Dong R.M., Jiang H., Wang S., Wang G., Fang B., Ding X., Niu L., Li X., Zhan C. & Dong H. (2011). Archaeal and bacterial diversity in hot springs on the Tibetan Plateau, China. *Extremophiles* 15:549–563

Huber H., Hohn M.J., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V.C. & Stetter K.O. (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont, *Nature* 417:63-67

Hugenholtz P., Goebel B.M. & Pace N.R. (1998) Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal of Bacteriology*, 180: 4765–4774.

Hughes J.B., & Bohannon B.J. (2004) Application of ecological diversity statistics in microbial ecology. *Molecular microbial ecology manual*, 2, 1321-1344.

IBRAM, Instituto Brasileiro de Mineração (2012) Informações e análises da economia mineral brasileira, 4ª edição. Disponível em: <http://www.ibram.org.br/> . Acesso em: 03 de novembro, 2012.

- Innis M.A., Myambo K.B., Gelfand D.H. & Brow M. A.** (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:9436-9440
- Instituto Aço Brasil** (2012). A indústria do aço no Brasil: Encontro da Indústria para a Sustentabilidade. Disponível em: http://www.cnisustentabilidade.com.br/docs/IABR_RIO20_web.pdf . Acesso em novembro, 2012.
- Jones W.J., Leigh A.J., Mayer F., Woese C.R. & Wolfe R.S.** (1983) *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch Microbiol* (1983) 136:254-261
- Jurgens G., Glockner F., Amann R., Saano A., Montonen L., Likolammi M., & Munster U.** (2000). Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization. *FEMS Microbiol Ecol* 34: 45–56.
- Jurgens G. & Saano A.** (1999) Diversity of soil Archaea in boreal Forest before, and after clear-cutting and prescribed burning. *FEMS Microbiology Ecology*, Amsterdam, v. 29, p. 205-213,
- Kalanetra K.M., Bano N., Hollibaugh J.T.** (2009). Ammonia-oxidizing archaea in the Arctic ocean and Antarctic coastal waters. *Environ Microbiol* 11: 2434-2445.
- Kan J., Clingenpeel S., Macur R.E., Inskeep W.P., Loyalvo D., Varley J., Gorby Y., McDermott T.R., Nealson K.** (2011) Archaea in Yellowstone Lake. *The ISME Journal*, 1-12.
- Karner M.B., DeLong E.F. & Karl D.M.** (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, 409, 507-510.
- Kaur, G., Mountain, B. W., Hopmans, E. C., & Pancost, R. D.** (2011). Relationship between lipid distribution and geochemical environment within Champagne Pool, Waiotapu, New Zealand. *Organic Geochemistry*, 42(10), 1203-1215.

- Keller M. & Zengler K.** (2004). Tapping into microbial diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 141-150.
- Kemp P.F. & Aller J.Y.** (2004). Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47: 161-177.
- Keough B.P., Schmidt T.M., Hicks R.E.** (2003). Archaeal nucleic acids in picoplankton from great lakes on three continents. *Microb Ecol*, 46:238-248.
- Kim B.S., Oh H.M., Kang H., Chun J.** (2005) Archaeal diversity in tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *Journal of Microbiology*, Seoul, v. 43, p. 144-151,
- Kjems J. & Garrett R.A.** (1988) Novel splicing mechanism for the ribosomal RNA intron in the archaeobacterium *Desulfurococcus mobilis*. *Cell.* 26;54(5):693-703.
- Kleikemper J., Pombo S.A., Schroth M.H., Sigler W.V., Pesaro M. & Zeyer J.** (2005) Activity and diversity of methanogens in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol*, 71:149-158.
- Koch M., Rudolph C., Moissl C., Huber R.** (2007). A cold-loving crenarchaeon is a substantial part of a novel microbial community in cold sulphidic marsh water. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 55-66.
- Kotsyurbenko O.R., Chin K.J., Glagolev M.V., Stubner S., Simankova M.V., Nozhevnikova A.N., Conrad R.** (2004) Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog. *Environ Microbiol* 6(11):1159-73.
- Krupovic M., Spang A., Gribaldo S., Forterre P. & Schleper C.** (2011) A thaumarchaeal provirus testifies for an ancient association of tailed viruses with archaea. *Biochemical Society Transactions*, 39(1), 82.

- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B.J., Strömbom L., Stahlberg A. & Zoric N.** (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27:95–125.
- Lam P. & Kuypers M.M.** (2010) Microbial nitrogen cycling processes in oxygen minimum zones. *Annual Review of Marine Science*, Palo Alto, v. 3, p. 317–345,
- Lambais M.R., Cury J.C., Maluche-Baretta C., Bull R.C., Vidal-Torrado P., Alleoni L.R.F., Vidal-Torrado P., Alleoni L.R.F. & Cardoso E.J.** (2005). Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas.; Cooper, M, 43-84.
- Lacey L.** (1997). “Manual of techniques in insect pathology” San Diego, Academic Press, 409 pp.
- Leininger S., Urich T., Schloter M., Schwark L., Qi J., Nicol G.W., Prosser J.I., Schuster S.C., Schleper C.** (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, London, v. 442, n. 7104, p. 806-809,
- Le Mer J. & Roger P.** (2001) Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review *European Journal of Soil Biology* 37:25–50.
- Lepp P.W., Brinig M.M., Ouverney C.C., Palm K., Armitage G.C. & Relman D. A.** (2004). Methanogenic Archaea and human periodontal disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:6176-6181.
- Machado I.F.** (1989). Recursos minerais, política e sociedade. São Paulo: Edgard Brücher. O meio ambiente e a mineração. In: Economia mineral do Brasil. Coord. Barboza, F. L. M. E Gurmendi, A. C. Brasília: DNPM.1995.
- Mardanov A.V., Ravin N.V.** (2012) The Impact of Genomics on Research in Diversity and Evolution of Archaea, *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 77, No. 8: 799-812.
- Massana, R.; Murray, A.E.; Preston, C.M.; Delong, E.F.** (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in Santa Barbara Channel. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 63, p. 50-56,

- McInerney J.O., Wernecke M., Mullarkey M. & Powell R.** (2002) Bacteria and Archaea: Molecular techniques reveal astonishing novel diversity. *Biodiversity* 3:3-10.
- Meuer J., Kuettner H.C., Zhang J.K., Hedderich R., Metcalf W.W.** (2002) Genetic analysis of the Archaeon *Methanosarcina barkeri* reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation. *Proc Natl Acad Sci* 99:5632-5637
- Miller S.R., Strong A.L., Jones K.L. & Ungerer M.C.** (2009) Bar-coded pyrosequencing reveals shared bacterial community properties along the temperature gradients of two alkaline hot springs in Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol* 75:4565–4572
- Muniz D.H.F. & Oliveira-Filho E.C.** (2006) Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente - Vol. 4, No 1/2 doi: 10.5102/ucs.v4i1.24
- 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 coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Nakagawa T., Mori K., Kato C., Takahashi R., Tokuyama T.** (2007). Distribution of cold-adapted ammonia-oxidizing microorganisms in the deep-ocean of the Northeastern Japan Sea. *Microbes Environ* 22: 365-372.
- Nascimento A.M.A.** (2009) Use of the rRNA operon and genomic repetitive sequences for the identification of bacteria. In: Bruijn J., Willey J. *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches.*
- Nicol G.W., Glover L.A., Prosser J.I.** (2003) The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. *Environmental Microbiology*, Oxford, v. 5, n. 3, p. 152-162,
- Nicol G.W., Schleper C.** (2006) Ammonia-oxidizing Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends in Microbiology*, Oxford, v. 14, p. 207–212

- Nunoura T., Takaki Y., Kakuta J., Nishi S., Sugahara J., Kazama H. & Takami H.** (2011). Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic acids research*, 39(8), 3204-3223.
- Ochsenreiter T., Selezi D., Quaiser A., Bonch-Osmolovskaya L., Schleper C.** (2003). Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environ Microbiol*, 5:787-797.
- Olsen G.J., Lane D.J., Giovannoni S.J. & Pace R.N.** (1996). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.*, 40: 337-365.
- Oren A.** (2004). Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 359:623-638.
- Orphan V.J, Hinrichs K.V, Ussler W., Paull C.K., Taylor L.T., Sylva S.P** (2001) Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulphate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 67:1922-1934
- Pace N.R.** (1997) A Molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 276: 734-740.
- Pagaling E., Haigh R.D., Grant W.D., Cowan D.A., Jones B.E., Ma Y., Ventosa A., Heaphy S.** (2007) Sequence analysis of an Archaeal virus isolated from a hypersaline lake in Inner Mongolia, China. *BMC Genomics*, London, v. 8, n. 410,.
- Perevalova A.A., Bidzhieva S.Kh, Kublanov I.V., Hinrichs K.U., Liu X.L., Mardanov A.V., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A.** (2010) *Fervidicoccus fontis* gen. nov., an anaerobic, thermophilic crenarchaeote from terrestrial hot springs, and proposal of Fervidicoccaceae fam. nov. and Fervidicoccales ord. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*. 60(9):2082-8.
- Pester M., Schleper C. & Wagner M.** (2011) The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current opinion in microbiology*, 14(3), 300-306.

- Picard C., Ponsonnet C., Paget E., Nesme X. & Simonet P.** (1992) Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* (58) 9: 2717-2722
- Preston C.M., Wu K.Y., Molinski T.F., DeLong E.F.** (1996). A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6241-6246.
- Prokofeva M.I., Kostrikina N.A., Kolganova T.V., Tourova T.P., Lysenko A.M., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A.** (2009) Isolation of the anaerobic thermoacidophilic crenarchaeote *Acidilobus saccharovorans* sp. nov. and proposal of *Acidilobales* ord. nov., including *Acidilobaceae* fam. nov. and *Caldisphaeraceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59(Pt 12):3116-22.
- Prosser J.I., Nicol G.W.** (2008) Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environmental Microbiology*, Oxford, v. 10, n. 11, p. 2931-2941,
- Ramette A. F.** (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *EMS Microbiol Ecol.* 62(2):142-60.
- Ranjard L., Poly F., Combrisson J., Richaume A., Gourbiere F., Thioulouse J. & Nazaret S.** (2000) Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach(RISA). *Microb Ecol* 39: 263–272.
- Rappé M.S. & Giovannoni S.J.** (2003). The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:369-394.
- Raskin L., Stromley J.M., Rittmann B.E. & Stahl D.A.** (1994). Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1232-1240.
- RDP. Ribosomal database project.** Disponível em: < <http://pyro.cme.msu.edu/>>.
Acesso em: 1 nov. 2011.
- Reigstad L.J., Jorgensen S.L. & Schleper C.** (2010) *ISME J.*, 4, 346356.

- Reis M.P., Barbosa F.A.R., Chartone-Souza E., Nascimento A.M.A.** (2013) The prokaryotic community of a historically mining-impacted tropical stream sediment is as diverse as that from a pristine stream sediment. *Extremophiles*
- Ribeiro I.C., Rosolem J.C., Grubhofer N.J., Andrades S.A.** (2009) O Cromo e o Meio Ambiente
- Rodríguez-Valera F.** (2002). Approaches to prokaryotic biodiversity: a population genetics perspective. *Environm Microbiol* 231: 153-158.
- Rosado A.S., Duarte G.F.** (2002) Utilização de Eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: Melo I.S., Valadares-Inglis M.C., Valois A.C.C. Recursos genéticos e melhoramento microrganismos. 97-128.
- Rosière C.A.** (1992) Classificação genética de minérios de ferro - problemas e vícios - Proposta de uma classificação tipológica para indústria. In: Seminário de Redução de Minério de Ferro, 28, 1997. Vitória. Anais . São Paulo: ABM, 295-302.
- Rosselló-Mora R. & Amann R.** (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 39-67.
- Sait M., Hugenholtz P., Janssen P.H.** Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environmental Microbiology*, Oxford, v. 4, n. 11, p. 654-666, 2002.
- Sanz J.L. & Kochling T.** (2007) Molecular biology techniques used in waster treatment: an overview. *Process Biochem.* 42:119–33.
- Sato T., Atomi H.** (2011) Novel metabolic pathways in Archaea. *Current Opinion in Microbiology*, London, v. 14, n. 3, p. 1–8,
- Sayer J.A. & Gadd G.M.** (2001). Binding of cobalt and zinc by organic acids and culture filtrates of *Aspergillus niger* grown in the absence or presence of insoluble cobalt or zinc phosphate. *Mycological Research* (105), 10: 261–1267.
- Schmidt T.M., DeLong E.F. & Pace N.R.** (1991). Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* 173:4371–4378.

- Schleper C., Jurgens G., Jonuscheit M.** (2005) Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature Publishing Group* 3:479-488
- Schleifer K.** (2004) Microbial Diversity: Facts, Problems and Prospects. *System. Appl. Microbiol.*,27: 3-9.
- Sharma R., Ranjan R., Kishor R.K. & Grover A.** (2005) ‘Unculturable’ bacterial diversity: An untapped resource. *Curr Science*, 89:72-77
- Silva J.P.S.** (2007) Impactos ambientais causados por mineração. *Revista espaço da sophia* - nº 08 — mensal – ano i
- Simon H.M., Dodsworth J.A. & Goodman R.M.** (2000) Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. *Environ Microbiol*, 2:495-505.
- Solano G., Rojas-Jiménez K., Jaspars M. & Tamayo-Castillo G.** (2009). Study of the diversity of culturable actinomycetes in the North Pacific and Caribbean coasts of Costa Rica. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(1), 71-78.
- Spang A.A., Hatzenpichler R., Brochier-Armanet C., Rattei T., Tischler P., Spieck E., Streit W., Stahl D.A., Wagner M. & Schleper C.** (2010) Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends Microbiol.* 18(8):331-40
- Speece R.** (1996). *Anaerobic /biothecnology for industrial wastewaters.* Archae Press, Tennessee, USA.
- Stein L.Y., Jones G., Alexander B., Elmund K., Wright-Jones C., Nealson K.H.** (2002) Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir. *Microbiol Ecol.* 2002 Dec 1;42(3):431-40.
- Stott M.B., Crowe M.A., Mountain B.W., Smirnova A.V., Hou S., Alam M. & Dunfield P.F.** (2008). Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand. *Environ Microbiol* 10:2030–2041

- Streit W.R. & Schmitz R.A.** (2004). Metagenomics – the key to the uncultured microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:492–498
- Takai K., Komatsu T., Inagaki F., Horikoshi K.** (2001) Chimney Structure Distribution of Archaea in a Black Smoker. *Environ. Microbiol.*, 67(8):3618.
- Todar K.** (2009) Archaea and Bacteria, *The Microbial World-Lectures in Microbiology* by Kenneth Todar PhD University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology
- Torsvik V., Ovreas L. & Thingstad T.F.** (2002) Prokaryotic Diversity – Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science.* 296: 1064-1066.
- Tourova T.P.** (2003) Copy Number of Ribosomal Operons in Prokaryotes and Its Effect on Phylogenetic Analyses. *Microbiology*, 72:389–402.
- Treusch A.H., Leininger S., Kletzin A., Schuster S.C., Klenk H., Schleper C.** (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, Malden, v. 7, n. 12, p. 1985–1995,
- Tringe S.G. & Hugenholtz P.** (2008) A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol.* 11: 442–6.
- Valentine D.L.** (2007) Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nat Rev Microbiol.* 5:316–323.
- Valverde A., Tuffin M. & Valverde D.A.C.** (2012). Biogeography of bacterial communities in hot springs: a focus on the actinobacteria. *Extremophiles* 16:669–679
- Vetriani C., Jannasch H. W., MacGregor B.J., Stahl D.A., Reysenbach A.L.** (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic Archaea in deep-sea sediments. *Appl Environ Microbiol.* 65(10):4375-84.
- Watanabe Y., Yokobori S., Inaba T., Yamagishi A., Oshima T., Kawarabayasi Y., Kikuchi H., Kita K.** (2002) Introns in protein-coding genes in Archaea. *FEBS Lett.* 510(1-2):27-30.

- Waters E., Hohn M.J., Ahel I., Graham D.E., Adams M.D., Barnstead M., Beeson K.Y., Bibbs L., Bolanos R., Keller M., Kretz K., Lin X., Mathur E., Ni J., Podar M.** (2003) The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(22):12984-8
- Whitaker R.J., Grogan D.W. & Taylor J.W.** (2003) Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* 301:976–978
- Whitman W.B., Coleman D.C. & Wiebe W.J.** (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95: 6578-6583.
- Woese C.R.** (1977) Endosymbionts and mitochondrial origins. *J Mol Evol.* Nov 25;10(2):93-6. **Woese C.R.** (1987) Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*. 51(2): 221-271.
- Woese C.R., Kandler O. & Wheelis M.L.** (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87: 4576–4579.
- Wuchter C., Abbas B., Coolen M.J.L., Herfort L., Van Bleijswijk J., Timmers P., Strous M., Teira E., Herndl G.J., Middelburg J.J., Schouten S., Damsté J.S.S.** (2006) Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v. 103, n. 33, p. 12317–12322,
- Wurst S., Deyn G.B.D. & Orwin K.** (2012) *Soil Biodiversity and Functions Book: Soil Ecology and Ecosystem Services*
- Xu J.** (2006) Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Mol Ecol* 15, 1713–1731.
- Yan B., Hong K. & Yu Z.N.** (2006) Archaeal communities in mangrove soil characterized by 16S rRNA gene clones. *The Journal of Microbiology*, Seoul, v. 44, n. 5, p. 566-571
- Zylstra G.J. & Gibson D.T.** (1991). Aromatic hydrocarbon degradation: a molecular approach. *Genet Eng (N Y)*. 1991;13:183-203.