NATASCHA MENEZES BERGO

Abundância e Distribuição Espacial de Micro-organismos na Plataforma Continental Sudeste e Área Oceânica Adjacente

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Oceanografia Biológica.
Orientadora: Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari

São Paulo

2015

Universidade de São Paulo

Instituto Oceanográfico

Abundância e Distribuição Espacial de Micro-organismos na Plataforma Continental Sudeste e Área Oceânica Adjacente

Natascha Menezes Bergo

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Oceanografia Biológica.

VERSÃO CORRIGIDA

Julgada em 07/04/2015

_____ _____

Prof(a). Dr. Vivian Helena Pellizari Conceito

_____ _____

Prof(a). Dr. André Lima Conceito

_____ _____

Prof(a). Dr. Frederico Brandini Conceito

“Estou disposto a ir para qualquer lugar desde que seja para a frente.”

Livingstone

SUMARIO

AGRADECIMENTOS vii

INDICE DE FIGURAS ix

INDICE DE TABELAS xii

LISTA DE ABREVIAÇÕES xiii

RESUMO xiv

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVO GERAL 5

2.1. Objetivos Específicos 5

3. ÁREA DE ESTUDO 6

3.1. Localização 6

3.2. Correntes oceânicas e Massas d'água na PCSE 7

3.3. Frentes Térmicas, Ressurgências e Produção Primária na PCSE 9

4. MATERIAL E MÉTODOS 12

4.1. Amostragem 12

4.2. Coleta de dados físico–químicos e elementos nutrientes 12

4.3. Filtragem de amostra de água para: extração de DNA, RNA e análise por citometria de fluxo 13

4.4. Citometria de Fluxo 13

4.4.1. Cálculo da Biomassa 14

4.4.2. Análise Estatística 14

4.5. Análise Molecular 14

4.5.1. Extração do DNA total das amostras de água filtradas 14

4.5.2. Extração do RNA total das amostras de água e Transcrição em cDNA 16

4.5.3. PCR em tempo real (qPCR) 17

4.5.4. Amplificação dos genes de interesse para a construção da curva padrão para quantificação em PCR em tempo real 17

4.5.5. Clonagem dos fragmentos amplificados (ligação e transformação) para a construção da curva padrão para quantificação em PCR em tempo real 18

4.5.6. Construção da curva padrão para o PCR em tempo real (qPCR) 19

4.5.7. Quantificação dos genes de interesse pela PCR em tempo real (qPCR) 20

4.5.8. Análise Estatística 22

4.6. Variáveis físico–químicas 23

4.6.1. Salinidade, Temperatura e Fluorescência 23

4.6.2. Elementos Nutrientes 26

4.6.2.1. Carbono Orgânico Dissolvido 26

4.6.2.3. Fosfato 30

4.6.2.4. Silicato 30

4.7. Variáveis Biológicas 32

4.7.1. Citometria de Fluxo 32

4.7.1.1. *Prochlorococcus spp*. 32

4.7.1.2. Synechococcus spp. 33

4.7.1.3. Picoplâncton Eucarioto 34

4.7.1.4. Nanoplâncton Eucarioto 35

4.7.1.5. Bactérias Heterotróficas 36

4.7.1.6. Biomassa picoplanctônica e abundância relativa 37

4.7.1.7. Análise de Componentes Principais (PCA) 41

4.7.2. Biologia Molecular 43

4.7.2.1. Domínio Bacteria 43

4.7.2.2. Domínio Archaea 44

4.7.2.3. Clado Sar11 45

4.7.2.4. Análise de Componentes Principais (PCA) 46

4.7.2.5. PCR em tempo real dos Genes Funcionais 47

4.7.2.6. Rubisco 49

4.7.2.7. Proteorodopsina 51

4.7.2.8. Análise Estatística 52

5. DISCUSSÃO 53

5.1. Variáveis físico–químicas e elementos nutrientes 53

5.2. Abundância de Fotoautótrofos e de Bactérias Heterotróficas 56

5.3. Biomassa Picoplânctonica 61

5.4. Abundância dos domínios Archaea e Bacteria e do clado Sar11 62

5.5. Expressão Gênica de Rubisco e Proteorodopsina 65

6. CONCLUSÕES 67

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

APÊNDICE 85

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, amor e cuidado.

À minha família, em especial minha avó, que praticamente me obrigou a sair de Santa Catarina e buscar novos rumos na minha vida.

À Universidade de São Paulo, em especial ao Instituto Oceanográfico, pela oportunidade.

À prof. Dra. Vivian Helena Pellizari por acreditar e confiar no meu potencial, às vezes até mais do que eu mesma. Principalmente por incentivar uma oceanógrafa a seguir carreira em microbiologia marinha.

Aos meus companheiros de Lecom 24 horas, Adriana Maria Torres-Ballesteros, Amanda Bendia, Diego Castilio Franco, Felipe Nóbrega, Francielle Peres, Luciano Queiroz, Rubens Duarte, pelos nossos momentos filosóficos e de alegria e de coleta. Em especial a amada Rosa Gamba, por todo seu amor e carinho incondicional ao Lecom e por mim.

Aos meus acessores científicos Adriana Maria Torres-Ballesteros, Amanda Bendia, Catherine Gerikas Ribeiro Diego Castilio Franco e Rubens Duarte. Obrigada pela extrema paciência para ensinamentos de PCR, PCR em tempo real, estatística e principalmente pela boa vontade em me ajudar a tornar este trabalho melhor.

Ao projeto INCT-OCEANOS/CARBOM intitulado Caracterização Ambiental e Avaliação dos Recursos Biogênicos Oceânicos e da Margem Continental Brasileira e Zona Oceânica Adjacente e, em seu nome, ao coordenador Dr. Frederico Brandini, por permitir que eu fizesse parte das pessoas dedicadas e esforçadas que integram este projeto.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao prof. Dr. André Megali Amado da Universidade Federal do Rio Grande do Norte que processou as amostras de nutrientes.

À empresa BD Biosciences Brasil e sua funcionária Melissa Silva por emprestar o citometro de fluxo.

Aos professores e funcionários do IOUSP, por toda a ajuda prestada.

Ao Daniel Moraes Frota e sua família, pelo amor, carinho e amizade. Daniel, obrigada pela confiança e respeito. Gosto de você e gosto de ficar com você. Meu sorriso é tão feliz contigo. O meu melhor amigo é o amor (Tribalistas).

E todos aqueles que mesmo não mencionados, contribuíram de alguma forma para a realização deste projeto.

Muito obrigada!!!

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plataforma Continental Sudeste, delimitada ao norte por Cabo Frio, RJ e ao sul pelo Cabo de Santa Marta, SC. Em azul estão os pontos de coleta. 7
Figura 2. Estrutura oceanográfica da região sul-sudeste na época do verão. Fonte: Júnior (2008) adaptado de Matsuura (1986). 8
Figura 3. Diagrama de temperatura e salinidade, T-S (A) das estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano (B)..... 24
Figura 4. Distribuição dos valores de salinidade (A), temperatura (B), fluorescência (C), nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano (D). 25
Figura 5. Distribuição da concentração do carbono orgânico dissolvido nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano. 26
Figura 6. Distribuição das concentrações de nitrogênio dissolvido (A), amônio (B), nitrito (C), nitrato (D) nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano (E)..... 29
Figura 7. Distribuição das concentrações de fosfato (A) e silicato (B) nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano. 31
Figura 8. Citograma discriminando cinco populações: A - *Prochlorococcus spp*. (azul); *Synechococcus spp.* (verde); Picoplâncton Eucarioto (roxo) e Nanoplâncton Eucarioto (vermelho), sendo no eixo x, FL2-H (ficoeritrina) e no eixo y, FL3-H (clorofila). B - Bactérias heterotróficas totais, sendo no eixo x, SSC-H (tamanho) e no eixo y, FL1-H (ficobilina)..... 32
Figura 9. Distribuição de *Prochlorococcus spp*. na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano. 33
Figura 10. Distribuição de *Synechococcus spp*. na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano. 34
Figura 11. Distribuição de picoplâncton eucarioto na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano. 35
Figura 12. Distribuição de nanoplâncton eucarioto na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano. 36

Figura 13. Distribuição de bactérias heterotróficas na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano. 36
Figura 14. Biomassa de bactérias heterotróficas, picoplâncton eucariotos, *Synechococcus* spp. e *Prochlorococcus* spp. (µgC.L-1) nas profundidades de coleta de cada estação. 39
Figura 15. Abudância relativa (%) de bactérias heterotróficas, picoplâncton eucariotos, *Synechococcus spp*. e *Prochlorococcus spp.* (µgC.L-1) nas profundidades de coleta de cada estação. 40
Figura 16. Análise de componentes principais correlacionando dados obtidos por citometria de fluxo com parâmetros físico–químicos. 41
Figura 17. Distribuição do domínio Bacteria na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano. 44
Figura 18. Distribuição do domínio Archaea na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano. 45
Figura 19. Distribuição do clado Sar11 na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano. 45
Figura 20. Análise de componentes principais correlacionando dados obtidos por qPCR com parâmetros físico–químicos..... 46
Figura 21. Curva padrão (A1e B1), de amplificação (A1 e B1), de dissociação (A3 e B3) e equação da reta (A4 e B4) obtidas a partir da amplificação dos genes rubisco (A) e proteorodopsina (B) por qPCR, nas amostras de água. 48
Figura 22. Perfil de expressão gênica da enzima rubisco durante o dia (A), rubisco durante a noite (B), (C e D) mapa com as estações amostradas em cada período. 50
Figura 23. Perfil de expressão gênica da enzima proteorodopsina durante o dia (A), rubisco durante a noite (B), (C e D) mapa com as estações amostradas em cada período. 52
Figura 24. Curva padrão (A), de amplificação (B), de dissociação (C) e equação da reta (D) obtidas a partir da amplificação do gene do rRNA 16S de Bacteria por qPCR. Valores indicados na curva padrão (A) representam diluições do DNA plasmidial. 85
Figura 25. Curva padrão (A), de amplificação (B), de dissociação (C) e equação da reta (D) obtidas a partir da amplificação do gene do rRNA 16S de

Archaea por qPCR. Valores indicados na curva padrão (A) representam diluições do DNA plasmidial. 86
Figura 26. Curva padrão (A), de amplificação (B), de dissociação (C) e equação da reta (D) obtidas a partir da amplificação do gene do rRNA 16S de Sar11 por qPCR. Valores indicados na curva padrão (A) representam diluições do DNA plasmidial. 87

INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Estações amostradas, coordenadas geográficas e profundidade local. 6
Tabela 2. Relação de genes, *primers* (oligonucleotídeos iniciadores), sequências e condições de anelamento. 18
Tabela 3. Relação de *primers* (oligonucleotideos iniciadores), concentrações e temperaturas de anelamento, extensão e quantificação..... 21
Tabela 4. Relação das estações amostradas e suas respectivas isóbatas e período de coleta. 22
Tabela 5. Parâmetros físico-químicos e elementos nutrientes com coordenadas geográficas, profundidade local, profundidade de coleta obtidos. 88
Tabela 6. Abundância das populações de *Synechococcus spp*., *Prochlorococcus spp*., Picoplâncton Eucarioto, Nanoplâncton Eucarioto e Bactérias Heterotróficas detectados por citometria de fluxo nas estações e profundidades amostradas. 91
Tabela 7. Biomassa de bactérias heterotróficas, *Synechococcus spp., Prochlorococcus spp.,* picoplâncton eucarioto (µgC.L-1) obtida nas estações e profundidades amostradas. 93
Tabela 8. Concentração de DNA e cDNA das amostras quantificadas no Qubit®. 95
Tabela 9. Abundância dos genes de Bactéria, de Archaea, Sar11 detectados por qPCR a partir do DNA total das amostras de água das estações e profundidades amostradas. 97
Tabela 10. Abundância de transcritos das enzimas rubisco e proteorodpsina quantificados por qPCR a partir do cDNA total das amostras de água coletadas no período diurno. 99
Tabela 11. Abundância de transcritos das enzimas rubisco e proteorodpsina quantificados por qPCR a partir do cDNA total das amostras de água coletadas no período noturno. 100
Tabela 12. Correlação de *Spearman* entre os dados de expressão gênica (proteorodopsina e rubisco) e os parâmetros físico–químicos durante o dia (A) e a noite (B). 101

LISTA DE ABREVIAÇÕES

AC	Água Costeira
ACAS	Água Central do Atlântico Sul
AP	Água da Plataforma Continental
AT	Água Tropical
cDNA	*Complementary DNA*
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
CTD	*Conductivity, Temperature and Depth (*Condutividade, Temperatura e Profundidade*)*
DNA	*Desoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)
MOD	Matéria Orgânica Dissolvida
MOP	Matéria Orgânica Particulada
MSC	Máximo de Subsuperficiais de Clorofila–a
ND	Nitrogênio dissolvido
NOD	Nitrogênio orgânico dissolvido
PCA	*Principal Component Analyses (*Análise de Componentes Principais)
PCE	Plataforma Continental Externa
PCI	Plataforma Continental Interna
PCM	Plataforma Continental Média
PCR	*Polymerase Chain Reation* (Reação em Cadeia Polimerase)
PCSE	Plataforma Continental Sudeste
PR	Proteorodopsina
qPCR	PCR em tempo real
Rbcl	Rubisco
RNA	*Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)
rRNA	RNA ribossomal
RuBisCo	*Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* (Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase)

RESUMO

A ressurgência da massa de Água Central do Altântico Sul (ACAS) é o principal processo oceanográfico de disponibilização de nutrientes na zona eufótica da plataforma continental sudeste do Brasil (PCSE). Isto gera um acréscimo na população de organismos autotróficos e consequente de heterotróficos que produzem e oxidam a matéria orgânica gerada. O que possibilita um aumento no fluxo de carbono e consequentemente a manutenção dos recursos pesqueiros na região durante o verão. A abundância de micro-organismos autotróficos e heterotróficos planctônicos e a relação destes com as massas de água da PCSE foram avaliadas no verão de 2013. Para o tal, os micro-organismos autotróficos, menores que 20 µm foram quantificados por citometria de fluxo. Foram realizadas análises de abundância do gene 16S de bactérias, archaeas e do clado Sar11 e a expressão dos genes rubisco e proteorodpsina por meio de PCR em tempo real. O valor médio obtido de micro-organismos autrotróficos, *Prochlorococcus spp.* e Synechococcus spp. foi de 15.151 e de 8.313 células.ml^{-1}, respectivamente. E de bactérias heterotróficas de 7.4x10^{5} células.ml^{-1}. Em relação aos domínios, a distribuição de Bacteria ocorreu na superfície e de Archaea no fundo da região oceânica. Os resultados indicam que a distribuição dos micro-organismos ocorreu conforme as características físicas e a disponibilidade de nutrientes das massas de água. Bactérias heterotróficas foram abundantes em regiões costeiras provavelmente devido a maior disponibilidade de matéria orgânica, o que corrobora com o resultado encontrado de maior biomassa de carbono em região costeira.

Palavras-chave: Plataforma Continental Sudeste, Ressurgência, Microbiologia Marinha, Citometria de fluxo e PCR em tempo real.

ABSTRACT

The resurgence of South Atlantic Central Waters (ACAS) is the main oceanographic process that involves availability of nutrients in the photic zone of the southeast continental shelf in Brazil. This causes an increase in the population of autotrophs and heterotrophic organisms (that produce and oxidizes the organic matter). The carbon flux increase and consequently the maintenance of fish resource in the region during the 2013 summer. The abundance of autotrophic and heterotrophic planktonic microorganisms was evaluated and also was studied their relation with the masses of water of the continental shelf. Thus, autotrophic microorganisms, smaller than 20 microns were quantified by flow cytometry. Using real time PCR were analysed 16S abundance of bacteria, archaea and SAR11 clade and the expression of the rubisco and proteorhodopsin gene. Autotrophic microorganisms, Prochlorococcus spp. and Synechococcus spp. had a mean value of 15.151 and 8.313 cell.ml-1, respectively. Heterotrophic bacteria had a mean value of 7.4x105 cell.ml-1. In relation to the domains, the distribution of bacteria occurred in the surface and the Archaea in the deep of the ocean region. The results indicate that the distribution of micro-organisms occur as the physical characteristics and the availability of nutrients of water masses. Heterotrophic bacteria were abundant in coastal areas probably due to increased of organic matter, which corroborates the result of higher biomass carbon in coastal region.

Keywords: Southeast Continental Shelf, Resurgence, Marine Microbiology, Flow Cytometry and Real Time PCR.

1. INTRODUÇÃO

A plataforma continental sudeste brasileira é uma zona de transição entre os climas subtropical e tropical (Longhurst *et al*., 2006). É constituída por massas de água com diferentes caractérisiticas fisícas e quimícas (Castro *et al*., 2006), a interação das massas de água com hidrodinâmica sazonal local cria nichos ecológicos de distribuição de micro-organismos marinhos na zona eufótica da plataforma.

A Plataforma Continental Sudeste (PCSE) pode ser dividida em setores: interna, média e externa. Em cada setor diversas fontes de nutrientes são necessárias para a produção primária marinha. Na porção interna, a drenagem continental e a regeneração de nutrientes do sedimento sustenta a produção durante o ano. Na plataforma média e externa, principalmente no verão, as intrusões da massa de Água Central do Atlântico Sul (ACAS) disponibiliza nutrientes na base da zona eufótica suficiente, para a formação de máximos de subsuperficiais de clorofila–a (MSC's) (Brandini, 2006;Castro *et al.,* 2006; Conti & Araújo, 2009).

MSC's são núcleos de alta produção fotossintética, formados na base da zona eufótica, entre a zona de mistura e o limite superior da nutriclina (Gaeta *et al.,* 2006). O dióxido de carbono fixado pela fotossíntese nos MSC´s é convertido em matéria orgânica particulada e dissolvida (Fenchel, 2008; Madigan *et al.,* 2011). Parte desta matéria orgânica é transferida a níveis tróficos superiores, oxidada por micro-organismos e uma fração pequena é perdida para os sedimentos marinhos (Ducklow & Carlson, 1992). Os MSC's são fundamentais para a manutenção dos estoques pesqueiros na PCSE, uma vez que, a maior parte dos peixes desovam no mesmo período (Gaeta *et al.,* 2006).

Do ponto de vista molecular, organismos autotróficos com atividade da enzima RuBisCO (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase) contribuem com a entrada de carbono inorgânico no oceano por meio da fotossíntese. No ambiente marinho, os micro-organismos autotróficos, denominados de fitoplâncton são constituídos de algas microscópicas e protistas fotossintetizantes (fito) unicelulares, que vivem a mercê da dinâmica das massas de água e correntes (plâncton). De acordo com Sieburth e

colaboradores (1978), o fitoplâncton pode ser dividido conforme suas dimensões, nas seguintes categorias: picoplâncton (0,2-2,0 µm, bactérias, arqueias, cianobactérias e alguns eucariotos); nanoplâncton (2,0-20 µm, flagelados nus, cocolitoforídeos, pequenas diatomáceas e dinoflagelados); microplâncton (20-200 µm, diatomáceas, dinoflagelados, silicoflagelados, cocolitoforídeos e cianobactérias de grande porte). Os gêneros de cianobactérias marinhas, *Prochlorococcus* e *Synechococcus,* dominam o picoplâncton e representam aproximadamente 60% de toda a biomassa autotrófica dos oceanos (Mann & Lazier, 2006).

Os micro-organismos picoplanctônicos também são compostos por organismos heterotróficos, representados por bacterias e arqueias. Estes oxidam a matéria orgânica gerada pelos MCS's, organismos maiores ou pelo agregamento da mesma (neve marinha). Assim, nutrientes e outros compostos são disponibilizados novamente para a produção primária nos diferentes setores e profundidades da PCSE.

Dentre os micro-organismos heterotróficos destaca-se o clado Sar11, pertencente à classe *Alphaproteobacteria,* representa mais de 25% das células do picoplâncton encontrado em regiões costeiras e oceânicas (Morris *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 2008). Seu sucesso ecológico é devido capacidade de converter radiação solar em trifosfato de adenosina (ATP) suprindo o seu metabolismo energético (Madigan *et al.*, 2011; Yutin *et al.*, 2007). Isto é feito por meio da enzima proteorodpsina que codifica o pigmento rodopsina e converte a energia luminosa em ATP.

Devido à classificação por tamanho do plâncton e a presença de pigmentos fluorescentes, cianobactérias (*Prochlorococcus* spp., *Synechococcus* spp.) picoplâncton e nanoplâncton eucarioto e micro-organismos heterotróficos (batérias e archaeas), podem ser rapidamente quantificados e discriminados de partículas não vivas na coluna de água do mar, por meio da técnica citometria de fluxo (Glazer & Wedemayer, 1995).

A citometria de fluxo vem sendo aplicada em estudos sobre micro-organismos planctônicos no ambiente marinho, principalmente por ser uma técnica rápida, sensível, quantitativa e permitir a análise de diversos parâmetros simultaneamente (Andrade *et al.,* 2003; Jellett *et al.,* 1996; Castberg, 2001; Kamiya *et al.*, 2007). Reação em Cadeia Polimerase

quantitativo (qPCR) pode ser usada para complementar e validar os dados obtidos por citometria de fluxo (Cottrell & Kirchman, 2009).

Durante os últimos 15 anos, os estudos moleculares têm caracterizado a diversidade de procariontes marinhos planctônicos por meio da análise de sequências genéticas que codificam a molécula 16S rRNA (Madigan *et al.,* 2011). A técnica de PCR em tempo real (qPCR), além de amplificar o gene RNA ribossomal, pode quantificar também o número de cópia de transcritos de genes funcionais. Por meio dessa técnica é possível detectar e enumerar sequências únicas de ácidos nucleicos indicativos de organismos específicos, genes funcionais representativos de processos metabólicos e outros marcadores genéticos em amostras coletadas em diversos ambientes (Novais & Pires-Alves*,* 2004; Labrenz *et al.*, 2004).

Muitas pesquisas têm aplicado a técnica qPCR para determinar micro-organismos planctônicos no ambiente marinho (Countway & Caron, 2006; Labrenz *et al.*, 2004; Cottrell & Kirchman, 2009; Corte *et al.,* 2009; Coci *et al.*, 2010), devido a maior precisão, sensibilidade, reprodutibilidade e maior velocidade de análise no processamento das amostras quando comparado a técnicas tradicionais (Novais & Pires-Alves*,* 2004; Labrenz *et al.*, 2004).

No Brasil, trabalhos para determinar a abundância e a biomassa bacteriana em ecossistemas marinhos utilizaram métodos tradicionais, como a contagem em placas, coloração de células e determinação de peso seco (Riviera *et al.,* 2008). O método de citometria de fluxo também tem sido empregado em regiões costeiras do estado do Rio Janeiro e oceânicas do país (Andrade *et al.,* 2007; Andrade *et al.,* 2003, Silveira *et al.,* 2011, Gonzalez *et al.*, 2006; Cury *et al.,* 2011; Alves *et al.,* 2014). No entanto, estes estudos não avaliaram a abundância microbiana e o seu papel funcional na plataforma continental sudeste do país e na região oceânica adjacente do Atlântico Sul.

É de suma importância a compreensão da abundância e da distribuição dos micro-organismos planctônicos autotróficos e heterotróficos, pois estes constituem a base da cadeia alimentar marinha e são essenciais na produção e consumo da matéria orgânica dissolvida e particulada. A aquisição de informações sobre esta abundância e funcionalidade pode auxiliar na exploração sustentável de recursos pesqueiros e biotecnológicos. É importante, avaliar a abundância de micro-organismos planctônicos autotróficos e

heterotróficos e a interação destes com os parâmetros físico-químicos e elementos nutrientes, na Plataforma Continental Sudeste (PCSE). Estes resultados, obtidos pela primeira vez na PCSE, servirão também de base de dados para futuros monitoramentos que poderão registrar possíveis alterações da comunidade microbiana em decorrência de mudanças climáticas globais.

Neste contexto, esta dissertação vem atender à necessidade de quantificar micro-organismos planctônicos autotróficos e heterotróficos e avaliar a expressão de genes relacionados à fixação do carbono (rubisco) e da degradação da matéria orgânica (proteorodopsina), associados intrusão da ACAS na Plataforma Continental Sudeste no verão de 2013, utilizando as técnicas de qPCR e citometria de fluxo.

Este estudo foi desenvolvido como parte do projeto “Caracterização Ambiental e Avaliação dos Recursos Biogênicos Oceânicos da Margem Continental Brasileira e Zona Oceânica Adjacente” (INCT-OCEANOS/CARBOM), coordenado pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

2. OBJETIVO GERAL

O presente estudo avaliou a abundância dos micro-organismos planctônicos autotróficos, heterotróficos e de genes relacionados ao ciclo do carbono, juntamente com a dinâmica dessas comunidades durante a intrusão da Água Central do Atlântico Sul, na Plataforma Continental Sudeste no verão de 2013.

2.1. Objetivos Específicos

- Determinar a abundância e descrever os padrões de distribuição de Bactérias Heterotróficas, das cianobactérias *Synechococcus spp. e Prochlorococcus spp., e do* Picoplâncton e Nanoplâncton Eucarioto em relação aos parâmentros ambientais.
- Determinar a abundância e descrever os padrões de distribuição de dos genes 16S rRNA de Arqueias, Bactérias e Sar11 em relação aos parâmentros ambientais.
- Determinar a contribuição de Bactérias Heterotróficas, *Synechococcus spp., Prochlorococcus spp.,* Picoplâncton Eucarioto para o reservatório de carbono orgânico particulado na Plataforma Continental Sudeste.
- Analisar como os parâmetros físico-quimicos controlam a expressão dos genes proteorodopsina de Sar11 e rubisco de *Synechococcus spp*.

3. ÁREA DE ESTUDO

3.1. Localização

A Plataforma Continental Sudeste Brasileira (PCSE) extende-se desde Cabo Frio, no Rio de Janeiro (40º58'W e 21º59'S) até o Cabo de Santa Marta, em Santa Catarina (48º48'W e 28º36'S) com cerca de 1.100 km de comprimento e área total de aproximadamente 150.000 km² (Figura 1), (Castro *et al.*, 2006).

Sua porção mais larga está localizada em frente a Santos, São Paulo, com 230 km estreitando-se nas suas extremidades (Cabo Frio com 50 km e Cabo de Santa Marta, com 70 km). A profundidade da quebra da Plataforma varia entre 120 e 180 m (Castro *et al.,* 2006).

A área de estudo corresponde a um transecto perpendicular à costa de Santos, SP, formado por 9 estações localizadas entre as isobatas de 50m a 2500 de profundidade Figura 1. Na Tabela 1 estão resentadas as coordenadas geográficas dos pontos de amostragem.

Tabela 1. Estações amostradas, coordenadas geográficas e profundidade local.

Estação	Latitude	Longitude	Isobata local (m)	Região
1	-24.3553333	-46.01416667	50	Costeira
2	-24.669500	-45.84778333	75	Costeira
3	-25.1481667	-45.59766667	100	Costeira
4	-25.4153333	-45.46001667	130	Costeira
5	-25.7678333	-45.28373333	200	Oceânica
6	-26.0276667	-45.15410000	1500	Oceânica
7	-26.1838333	-45.07508333	2000	Oceânica
8	-26.1848333	-45.07546667	2000	Oceânica
9	-26.7153333	-45.78820000	2500	Oceânica

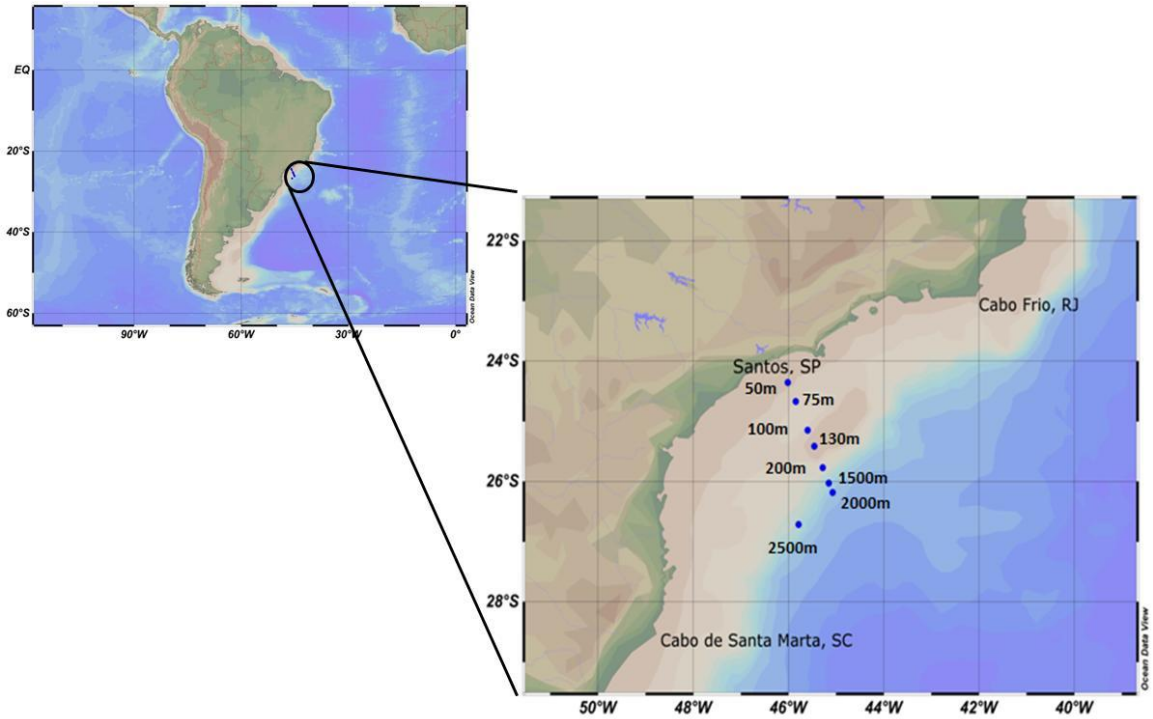

Figura 1. Plataforma Continental Sudeste, delimitada ao norte por Cabo Frio, RJ e ao sul pelo Cabo de Santa Marta, SC. Em azul estão os pontos de coleta.

3.2. Correntes oceânicas e Massas d'água na PCSE

A costa do Brasil recebe a corrente Sul Equatorial, que se movimenta no sentido leste-oeste na latitude do Equador, dividindo-se ao alcançar à costa nordeste do Brasil. Uma corrente flui para o norte, denominada corrente das Guianas (e/ou corrente Norte do Brasil) e outra corrente flui em direção ao sul, corrente do Brasil.

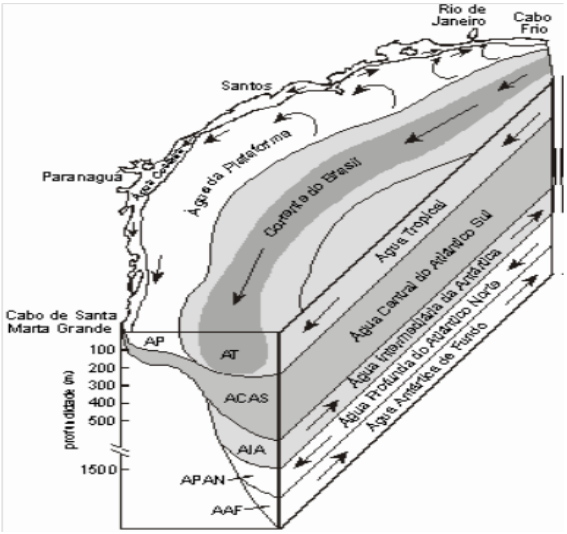

Figura 2. Estrutura oceanográfica da região sul-sudeste na época do verão. Fonte: Júnior (2008) adaptado de Matsuura (1986).

A corrente do Brasil (de contorno oeste) flui sobre a plataforma continental até aproximadamente 38° de latitude sul, onde se encontra com a corrente das Malvinas e ambas se afastam da costa em direção ao leste (Silveira *et al.,* 2000).

De acordo com Rezende (2003) são detectadas às seguintes massas de água na zona eufótica da costa sul-sudeste do Brasil, Figura 2:

- Água Costeira (AC): formada pela diluição de águas provenientes da drenagem continental, massas de água de plataforma e oceânicas. A salinidade (S< 34) e a temperatura variam ao longo das estações climáticas devido à influência da drenagem continental.
- Água da Plataforma Continental (AP): observada acima da plataforma e também assume características continentais.
- Água Tropical (AT): oligotrófica e com baixa concentração de oxigênio dissolvido, caracterizada por salinidade > 36 e temperatura > 20°C. Transportada pela Corrente do Brasil para o sul-sudeste ao longo do talude continental (Emílson, 1961). Formada em regiões com intensa radiação solar e excesso de evaporação em relação à precipitação. Pode ocupar até 200 metros de profundidade (Mirada, 1982; Silveira *et al.,* 2000; Pedrosa *et al.,* 2006).
- Água Central do Atlântico Sul (ACAS): caracterizada por temperaturas entre 6°C e 20°C, salinidade entre 35.9 e 34.6, rica em nutrientes inorgânicos e com altas concentrações de oxigênio dissolvido. É encontrada na região da picnoclina com profundidade em torno de 200 e 500 m (Miranda, 1982). Formada na Convergência Subtropical do Atlântico Sul. Segundo Silveira *et al.* (2001), a ACAS entra no Giro Subtropical do Atlântico Sul a partir da corrente do Atlântico Sul, alcança a corrente de Benguela e retorna a costa brasileira pela corrente Sul Equatorial, aproximadamente ao sul da latitude 20°S. Como nas correntes superficiais, a ACAS se bifurca e um ramo que flui para norte rumo ao Equador e outro que flui para sul – sudoeste, abaixo da AT ao longo do talude continental e da quebra da plataforma e ao fundo da corrente do Brasil. Durante os períodos de verão, a ACAS se desloca em

direção à costa podendo chegar à superfície. Esse processo de avanço durante o verão é o mais influente na alta taxa de produção primária na plataforma continental (Matssura, 1986).

As massas de água presentes na PCSE são o resultado da mistura entre AT, AC e ACAS. O contato entre essas massas de água forma regiões frontais que podem separar as áreas da PCSE (Castro *et al.,*2006).

3.3. Frentes Térmicas, Ressurgências e Produção Primária na PCSE

De acordo com o modelo proposto por Castro & Miranda (1998), são identificadas duas frentes para a PCSE: Frente Térmica Profunda (FTP) e Frente Halina Superficial (FHS). As frentes caracterizam a divisão da PCSE em três áreas morfológicas: plataforma continental interna (PCI), média (PCM) e externa (PCE).

A separação entre a plataforma continental interna e a média é demarcada na região de máximo gradiente térmico de fundo (Frente Térmica Profunda). Esta frente é o local aonde a termoclina sazonal encosta no fundo, ou seja, separa a água mais quente (AC) da água mais fria (ACAS).

A divisão entre a plataforma continental média e a externa ocorre no gradiente máximo de salinidade (Frente Halina Superficial). Esta frente separa as regiões influenciadas pela AC (com baixa salinidade) das regiões sobre influência da AT (alta salinidade) da corrente do Brasil.

A plataforma interna é ocupada principalmente pela AC e seu reservatório de carbono orgânico particulado é continuo o ano inteiro, devido ao aporte de matéria orgânica de origem fluvial dos estuários de Cananeia, Paranaguá, do Rio da Prata e da Lagoa dos Patos (descarga sazonal, maior no inverno) e pela menor profundidade (regeneração de nutrientes no sedimento pela comunidade bentônica) (Burone *et al.*, 2010; Gaeta *et al.*, 2006; Castro *et al.,* 2006).

A plataforma média se apresenta em camadas, na qual a camada superior é formada por águas provenientes da mistura entre AT e AC, e a camada inferior, pela ACAS. Na plataforma externa a AT domina a camada superior (acima da termoclina) e a camada de fundo (abaixo da termoclina) é ocupada pela ACAS (Castro *et al.,*1998). A AT possui baixa produtividade,

refletindo suas condições oligotróficas (baixa concentrações de nutrientes), com regeneração de nitrogênio na zona eufótica (Gaeta *et al.,* 2006).

Nas porções média e externa da PCSE, os nutrientes em abundância provenientes da ACAS não podem ser assimilados para a produção primária por estarem em camadas afóticas. Quando a ACAS rompe a termoclina em movimentos ascendentes (ressurgências, vórtices ciclônicos e ondas internas), a produtividade na zona eufótica aumenta. A intrusão da ACAS sobre a plataforma continental gera os máximos subsuperficiais de clorofila–a (MSC's) na base da zona eufótica, entre a zona de mistura e o limite superior da nutriclina (Brandini et al, 2014; Gaeta *et al.,* 2006).

As ressurgências costeiras, ou no caso da PCSE, o afloramento da Água Central do Atlântico Sul (ACAS), podem ocorrer em toda a plataforma. No entanto, as intrusões são mais frequentes nos extremos da plataforma, principalmente ao norte (Cabo Frio). A instrução da ACAS ocorre em resposta aos ventos predominantes de nordeste (NE) e leste (E), que removem a massa de água superficial, permitindo o movimento vertical ascendente da ACAS. A intensidade, duração e frequência destes ventos variam em escala sazonal, sendo predominantes durante os meses de primavera e verão. (Castro, 1996). Meandros e vórtices que se desprendem da Corrente do Brasil também podem bombear a ACAS em direção à superfície. Isso ocorre mais frequentemente entre as isobata de 100 m e de quebra da plataforma (Campos, 1995; Castro & Miranda, 1998; Campos *et al.*, 2000; Castro *et al.,* 2006). Estes processos de meso-escala (da ordem 10km) podem elevar a produção primária na PCSE, pois disponibilizam nutrientes.

MSC's são comuns no verão devido ao crescimento de populações adaptadas a baixa intensidade luminosa e condições satisfatórias de nutrientes, também estão associados a altas concentrações de oxigênio dissolvido, sugerindo intensa atividade fotossintética (Brandini, 1988; Brandini, 2006; Brandini *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2006; Gaeta *et al.,* 2006). Além da importância ecológica, os MSC's são essenciais para a manutenção de recursos pesqueiros pelágicos e demersais da PCSE. Peixes de interesse comercial desovam no verão no mesmo período em que as MSC's se intensificam na plataforma média (Gaeta *et al.,* 2006).

Apesar do aporte de nutrientes provenientes da drenagem continental, do ambiente atmosférico e da regeneração *in situ* de nutrientes pela atividade microbiana, a maior disponibilidade de nutrientes na PCSE tem origem oceânica, na ACAS (Brandini, 2006).

Em escala temporal de minutos, ondas de gravidade internas na PCSE também podem provocar a ascensão da picnoclina/nutriclina, a exemplo do que ocorre em *South Atlantic Bight*, na costa sudeste (SE) dos EUA (Atkinson, 1977).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

A amostragem foi feita perpendicular à costa de Santos, SP, formado por 9 estações localizadas entre as isobatas de 50m a 2500 de profundidade Figura 1.

Os procedimentos de amostragem, filtragem e fixação foram realizados a bordo do Navio Oceanográfico "*Alpha Crucis*" do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP) no verão de 2013, entre os dias 25 e 31 de janeiro de 2013.

4.2. Coleta de dados físico–químicos e elementos nutrientes

Dados de dados de temperatura, condutividade (salinidade) e fluorescência foram obtidos desde a superfície até 200 m de profundidade com o auxílio do sensor CTD (*conductivity, temperature and depth*). A partir do perfil de florescência gerado pelo sensor CTD (como indicador de concentração de clorofila), garrafas de *niskin* com volume de 10L do sistema *rosette* foram fechadas em 6 profundidades distintas para cada ponto: duas na camada de mistura, duas no MSC e duas na camanda de fundo da termoclina, totalizando 54 amostras.

Seis níveis de profundidade de amostras água foram coletados em cada estação para análises *in vitro* de nutrientes inorgânicos (nitrato, nitrito, amônio, fosfato e silicato), Carbono e Nitrogênio Orgânico Particulado. As amostras foram enviadas para análise no Laboratório de Limnologia na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN aos cuidados do Prof. Dr. André Megali Amado.

Os dados físico–químicos e a concentração de nutrientes foram plotados no *software Ocean Data View*® gerando mapas de interpolação do tipo *Diva gridding.*

4.3. Filtragem de amostra de água para: extração de DNA, RNA e análise por citometria de fluxo

As amostras de água (10L) removidas das garrafas de *Niskin* foram filtradas com bomba peristáltica e mangueiras de silicone esterilizadas através de limpeza com ácido clorídrico (10%) e autoclavagem. Foram utilizados suportes de filtro swinex com membranas de 0,22 µm estéreis para a extração dos ácidos nucléicos.

Ao término de 15 min. de filtração para RNA (2L) e 30 min. para DNA (5L), os filtros foram removidos do suporte com o auxílio de uma pinça estéril e armazenados em um criotubo de 2 ml contendo tampão apropiado para estocagem (RNA - tampão RLT QIAGEN com β – mercaptoetanol na concentração de 10 µl por ml de tampão; DNA - 20 mM, Tris HCL, pH 8.0, 2 mM, EDTA, pH 8.0, 1.2% Triton X e 20 mg/ml de lisozima).

Simultaneamente foi fixado 1,5 ml de amostra de água em triplicata, com 0,2% de glutaraldeído e armazenado, segundo protocolo padrão descrito por Marie *et al.* (1999), para a análise por citometria de fluxo. Todas as amostras foram mantidas em nitrogênio líquido até o momento do processamento no Laboratório de Ecologia de Micro-organismos do Instituto Oceanográfico da USP (LECOM-IOUSP).

Todos os dados de variáveis biológicas obtidos foram plotados no *software Ocean Data View®* gerando mapas de interpolação do tipo *Diva gridding.*

4.4. Citometria de Fluxo

Para a enumeração de *Synechococcus spp., Prochlorococcus sp spp.,* nanoplâncton, picoplâncton e bactérias heterotróficas, 1,5 ml das amostras foram fixadas com glutaraldeído (0,2%) em triplicata e armazenadas em nitrogênio líquido até a análise no Laboratório de Ecologia de Micro-organismos no Instituto Oceanográfico da USP (LECOM-IOUSP) conforme o protocolo de Marie *et al.,* 1999.

Synechococcus spp., Prochlorococcus spp., nanoplâncton e picoplâncton foram discriminados com base na florescência intrínseca de pigmentos fotossintéticos fluorescentes (clorofila e ficoeritrina) e pelo tamanho celular utilizando o citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Accuri Cytometers, Ann Arbor, MI, USA) com velocidade de fluxo médio. Para reduzir o ruído foi aplicado *threshold* de 500 no FL3. Para contagem das bactérias heterotróficas, foi adicionado o corante de DNA, *SYBR Green I* (Invitrogen Life Technologies, Invitrogen, EUA) nas amostras e após 10 min. analisadas no citômetro de fluxo com velocidade de fluxo médio e *threshold* de 2.000 no FL1.

4.4.1. Cálculo da Biomassa

A partir dos dados de abundância gerados pelo citômetro de fluxo foi calculada a biomassa de *Prochlorococcus spp., Synechococcus spp.,* picoplâncton eucarioto e bactérias heterotróficas.

A biomassa foi determinada de acordo com os fatores de conversão volume – carbono de Buitenhius *et al.* (2012) para *Prochlorococcus spp.* (36 fgC.célula^{-1}), *Synechococcus spp*. (255 fgC.célula^{-1}) e picoplâncton eucarioto (2590 fgC.célula^{-1}) e para bactérias heterotróficas (20 fgC.célula^{-1}) de Lee & Furhrman (1987).

4.4.2. Análise Estatística

A análise dos dados obtidos por citometria de fluxo integrado aos paramétricos físico-químicos foi realizada pela técnica multivariada denominada de análise de componentes principais (PCA) no *software* Canoco®.

4.5. Análise Molecular

4.5.1. Extração do DNA total das amostras de água filtradas

A partir dos filtros armazenados em nitrogênio líquido foi realizada a extração dos ácidos nucleicos das 54 amostras coletadas. A extração contou

com o auxílio de *kits* de extração*: Qiagen DNeasy Tissue*, contendo os reagentes necessários (Suzuki, 2001; Eiler *et. al,* 2009). Para a extração de DNA utilizou-se o protocolo do kit com as seguintes adaptações:

a) Para o descongelamento, os filtros com amostra foram deixados em temperatura ambiente (37ºC) durante 1 hora, sendo homogeneizados a cada 15min com auxílio de vórtex; b) Posteriormente, adicionou-se 70 µl de proteinase K e 556 µl de tampão de ART em cada criotubo seguido de homogeneização no vórtex e aquecimento a 56°C por 30 min; c) Após a incubação foi adicionado 556 µl de etanol absoluto (100%) em cada criotubo e homogeneizado no vórtex; d) As amostras foram transferidas para as minicolunas Dneasy e centrifugadas a 8.000 rpm durante 1 min. em uma microcentrífuga. O sobrenadante foi descartado. Depois as colunas foram transferidas para tubos novos de coleta; e) Em seguida adicionou-se 500 µl de tampão de AW1 para cada coluna, centrifugando novamente a 8.000 rpm durante 1 min. e descartando o sobrenadante; f) Adicionou-se 500 µl de tampão de AW2 para cada coluna e centrifugado a 13.300 rpm durante 3 min.; g) Posteriormente os tubos de coleta foram descartados e as colunas colocadas em microtubos de 1,5 ml; h) Para eluir o DNA adicionou-se a cada tubo 100 µl de água ultrapura pré-aquecida (ou tampão AE), incubando à temperatura ambiente durante 1 min. e centrifugando a 8.000 rpm durante 1 min.; i) As amostras de DNA genômico foram armazenadas a -20 °C.

A qualidade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0 % (g/mL) em tampão TAE (Tris–Acetato–EDTA) 1X e padrão de peso molecular 1Kb *Plus* DNA *Ladder* (Invitrogen Life Technologies, EUA). Para visualização do material genético os géis de agarose foram corados por 15 min. com *SYBR safe* (Invitrogen Life Technologies, EUA), na concentração de 2 µg/ml e submetidos a um campo elétrico de 80 volts por 40 min. Os géis de agarose foram visualizados no *E-Gel Imager* (Invitrogen Life Technologies, EUA) com luz ultravioleta e fotografadas utilizando o software de imagens *Gel Capture* (Invitrogen Life Technologies, EUA).

A concentração total de cada amostra foi verificada no fluorímetro Qubit® (Life Technologies, EUA).

4.5.2. Extração do RNA total das amostras de água e Transcrição em cDNA

O material genético foi extraído a partir dos filtros armazenados em nitrogênio, com o auxílio dos kits de extração: *Qiagen RNeasy*, contendo os reagentes necessários (Zehr *et al.,* 2005). Para extração de RNA também se utilizou o protocolo do kit com as seguintes modificações:

a) Os criotubos contendo as amostras foram retirados do nitrogênio liquido e descongelados sobre gelo; b) Em seguida foram colocados no desruptor de célula e agitados na velocidade máxima por 30 segundos; c) Novamente, os criotubos foram colocados sobre gelo por aproximadamente 5 min. ou até esfriar; d) A agitação e o resfriamento foram repetidos por 3 vezes; e) Com os criotubos sobre o gelo adicionou-se 250 µl de etanol absoluto (100%) em cada amostra, misturando-se por pipetagem; f) Em seguida as amostras foram transferidas para a minicoluna RNeasy Qiagen e centrifugadas durante 15 segundos a 14.000 rpm; g) Posteriormente, 350 µl de tampão de RW1 foi pipetado na minicoluna e centrifugado por 15 segundos a 14.000 rpm descartando o material filtrado; h) Pipetou-se 80 µl do mix DNase (10 µl de DNase I, 70 µl de tampão RDD) em cada minicoluna e incubou-se na bancada durante aproximadamente uma hora; i) Em seguida foi pipetado 350 µl do tampão adicional de RW1 e centrifugado durante 15 segundos a 14.000 rpm; j) Adicionou-se 500 µl de tampão RPE e centrifugou-se durante 15 segundos a 14.000 rpm; l) Foi adicionado novamente 500 µl de tampão RPE na minicoluna e centrifugada durante 2 min. a 14.000 rpm; m) Posteriormente as minicolunas foram colocadas em microtubos (1,5 ml) pré-rotulados e pipetado 50 µl de água RNase e incubado por 2 min.; o) Finalmente foi centrifugada durante 1 min. a 14.000 rpm, para eluir o RNA.

O RNA foi transcrito para cDNA com o kit SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen Life Technologies, EUA) conforme as instruções do fabricante. A integridade do cDNA e a quantificação da concentração de cada amostra foi analisada conforme citado no item 4.5.1.

4.5.3. PCR em tempo real (qPCR)

A PCR em tempo real é uma técnica com o princípio da reação em cadeia da polimerase (PCR) que consiste em fazer cópias de um DNA–molde, a partir dos elementos básicos da replicação celular natural. Além de copiar o DNA molde também o quantifica, por meio de um sinal gerado pela fluorescência de sondas (*TaqMan*) ou de corantes florescentes (*SYBR green*). O sinal emitido aumenta na proporção direta, da quantidade de cópias do DNA molde gerado em cada ciclo (Novais e Pires-Alves, 2004). Para a aplicação da técnica de PCR em tempo real foi necessário construir inicialmente uma curva padrão com concentrações conhecidas de DNA molde para o controle dos ciclos de amplificações. Os passos de construção da curva padrão são descritos a seguir.

4.5.4. Amplificação dos genes de interesse para a construção da curva padrão para quantificação em PCR em tempo real

A detecção e análise dos genes 16S rRNA de bactéria, archaea e sar11, rubisco e proteorodopsina no DNA e cDNA total foi realizada por meio da técnica de Reação em Cadeia Polimerase (PCR). Os genes de interesse foram amplificados a partir do DNA total extraído das amostras de água provenientes do transecto.

A reação de amplificação foi realizada com um volume final de 25 µl, contendo: 1X do tampão de reação (20mM Tris – HCL pH 8,4; 50 mM KCl); 1,5 mM de $MgCl^2$; 0,8 mM de DNTP´s; 0,8µM dos *primers* e 1U de *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, EUA). Todas as reações foram programadas com um passo inicial de desnaturação de 1 min. a 94°C, seguido de 35 ciclos (1 min. a 94°C), anelamento (Tabela 2) e 1 min. a 72°C de extensão. As condições de anelamento e os *primers* estão citadas na Tabela 2.

Tabela 2. Relação de genes, *primers* (oligonucleotídeos iniciadores), sequências e condições de anelamento.

Gene	*Primer*	Sequência do *primer*	Pares de bases	Temperatura de Anelamento	Referência
16S Archaea	1000F 340R	5 -GGCCATGCACYWCYTCTC-3' 5'-CCCTAYGGGGYGCASCAG-3'	660	55°C - 30 s	Gantner *et. al.,* 2011.
16S Bacteria	27F 1401R	5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3' 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	1374	56° C - 30 s	Lane, 1991.
16S Sar11	SAR11-433F SAR11-588R	5'-CTCTTTCGTCGGGGAAGAAA-3' 5'-CCACCTACGWGCTCTTAAGC-3'	100	59°C -1 min	Suzuki, *et al.,* 2001
PR (Proteorodopsina)	SARPR_125F SARPR_288R	5'-THGGWGGATAYTTAGGWGAAGC-3' 5'-CCCAACCWAYWGTWACRATCATTCT-3'	350	56°C - 30 s	Campbell, *et. al.,* 2008.
rbcL (RuBisCO)	RbcLF RbcLR	5'-GACTTCACCAAAGAYGACGAAAACAT-3' 5'-GAACTCGAACTTRATYTCTTTCCA-3'	700	54°C -30 s	Fewer, *et. al.,* 2007.

O tamanho dos produtos obtidos por PCR para cada um dos genes de interesse foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (g/mL) em tampão TAE 1X e padrão de peso molecular 1Kb *Plus* DNA *Ladder* (Invitrogen Life Technologies, EUA), conforme descrito no item 4.5.1.

4.5.5. Clonagem dos fragmentos amplificados (ligação e transformação) para a construção da curva padrão para quantificação em PCR em tempo real

Após a confirmação do tamanho dos produtos de PCR obtidos por eletroforese em gel de agarose, para cada um dos genes de interesse, os mesmos foram purificados utilizando o *kit* DNA *Clean Concetrator*™ (Zymo Research, EUA) e quantificados no fluorométrico Qubit® (Life Technologies, EUA).

A clonagem dos genes amplificados foi realizada segundo o protocolo do *TOPO® TA Cloning® Kit®* (Life Technologies, EUA). A reação de ligação inserto – vetor foi realizada em temperatura ambiente, durante 60 min. Dois microlitros da ligação de inserto – vetor foi utilizado para transformar 50 µL de células competentes de *E. coli* por choque térmico. As células transformadas foram recuperadas em 250 µL de meio S.O.C (triptona 20,0 g/L; extrato de levedura 5,0 g/L; NaCl 0,58 g/L; $MgSO_4.7H_2O$ 2,46 g/L; $MgCl_2$ 0,95 g/L) e

incubadas horizontalmente a 37°C por 60 min. a 225 rpm. Posteriormente, 100 µL das células transformadas foram inoculadas por espalhamento com alça de vidro em placas de petri contendo meio Luria Bertani – LB (triptona 10,0 g/L; extrato de levedura 5,0 g/L; NaCl 15 g/L), ampicilina (100 µg/mL) e 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside [X – Gal (40 µg/mL)] e incubadas a 37°C *overnight* para confirmar a transformação e o isolamento dos clones.

Após o período de incubação, as colônias transformadas (que não degradaram o substrato X – Gal) apresentam coloração branca. As mesmas foram transferidas individualmente com o auxílio de palitos a microtubos de 1,5 ml contendo 0,5 ml de meio Luria Bertani (LB) e ampicilina (100 µg/mL) e incubadas novamente a 37°C *overnight* a 180 rpm.

Para a confirmação dos insertos, o DNA plasmidial das culturas foi extraído utilizando o *kit Pure Link™ Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen Life Technologies, EUA). Dois microlitros desse volume foram utilizados para confirmar a presença do inserto em uma PCR. A reação de PCR, o programa de amplificação e a confirmação do tamanho dos fragmentos para cada um dos genes foi descrita anteriormente no item 4.5.4.

Os clones foram armazenados em tubos criogênicos a -20°C contendo 0,85 mL de meio cultura de cada clone (LB juntamente com ampicilina) com 0,15 mL de glicerol estéril.

4.5.6. Construção da curva padrão para o PCR em tempo real (qPCR)

Os produtos de PCR realizados a partir do DNA plasmidial (item 4.5.5), contendo o inserto de cada gene interesse, foram purificados com o *kit Pure Link™ Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen Life Technologies, EUA). Posteriormente foram encaminhados ao Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo para o sequenciamento usando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).*

As sequências nucleotídicas obtidas foram editadas no *software BioEdit* (Hall, 1999) para remoção do vetor e dos *primers*. Posteriormente as sequências foram comparadas com sequências disponibilizadas no banco de dados *GeneBank* do Centro de Informações Biotecnológicas (NCBI). Os

organismos com sequências mais similares aos grupos de interese foram selecionadas para a construção da curva padrão do PCR em tempo real.

A curva padrão foi construída a partir da diluição seriada (10^{-1} a 10^{-8} ng/ml) dos DNAs de plasmídeos de cada gene em água ultrapura livre de nucleases (Invitrogen Life Technologies, EUA).

4.5.7. Quantificação dos genes de interesse pela PCR em tempo real (qPCR)

Foram empregados os grupos de iniciadores e sondas segundo dados da literatura, apresentados na Tabela 2 do item 4.5.4 amplificação dos genes de interesse, a fim de analisar a abundância dos seguintes grupos taxonômicos e funcionais:

- ✓ **16S rRNA para Bactéria** – gene que codifica o RNA integrante da subunidade (16S) do ribossomo de representantes do domínio Bacteria, utilizado como marcador universal.
- ✓ **16S rRNA para Arqueia** – idem ao item anterior, mas para o domínio Archaea.
- ✓ **16S rRNA para Sar11** - gene que codifica o RNA integrante da subunidade (16S) do ribossomo de representantes do claro Sar11.
- ✓ **PR (Proteorodopsina)** – gene que codifica a transcrição da enzima proteorodopsina, utilizado para quantificar dados de expressão gênica nas amostras analisadas.
- ✓ **rbcL (Rubisco) -** gene que codifica a transcrição da enzima RuBisCO (ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase), empregado para quantificar dados de expressão gênica nas amostras analisadas.

As amplificações dos genes citados acima foram realizadas no termociclador *StepOne™ Real-Time PCR Systems Thermal Cycling Block* (Applied Biosystems). Todas as reações foram feitas em placas de reação ópticas (Applied Biosystems) em triplicata, com um volume final de 25 µl contendo 1X de tampão de polimerase de DNA *AmpliTaq Gold® Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Invitrogen Life Technologies, EUA), 5 µl de

DNA e de *primers* (ver Tabela 3). Posteriormente foram seladas com um filme adesivo óptico (Applied Biosystems) e centrifugadas a 4.000 (rpm) por 5 min.

O controle positivo da reação foi preparado utilizando clones com inserto dos fragmentos de interesse, ver item 4.5.6. O controle negativo de reação foi preparado substituindo o volume do DNA molde pelo mesmo volume de água livre de nucleases.

Todas as reações foram programadas com um passo de ativação da enzima de 10 min. a 95°C, seguido de 40 ciclos, de 15 s a 94°C para a desnaturação e 30 s para o anelamento, 30 s para a extensão e 10 s para a quantificação da florescência do *Syber Green.* As temperaturas de anelamento, extensão e quantificação da florescência são apresentadas na Tabela 3. Os resultados foram analisados no *software StepOne™ v2.2* (Applied Biosystems).

Tabela 3. Relação de *primers* (oligonucleotideos iniciadores), concentrações e temperaturas de anelamento, extensão e quantificação.

Primers	**Concentração (mM)**	**Temperatura de Anelamento**	**Temperatura de Extensão**	**Quantificação da florescência (qPCR)**
16S rRNA Archaea	0.50	56 °C - 30s	72 °C - 1 min	81 °C - 10s
16S rRNA Bactéria	0.16	55 °C - 30s	72 °C - 1 min	81 °C - 10s
16S rRNA Sar11	0.07	59 °C -1 min	72 °C - 1 min	81 °C - 10s
PR (Proteorodopsina)	0.35	54 °C -30s	72 °C – 30s	75,5 °C - 10s
rbcL (RuBisCO)	0.50	56 °C - 30s	72 °C - 1 min	81 °C - 10s

Os dados obtidos em número de cópias de 16S rRNA foram convertidos para células por ml assumindo 1 cópia do gene 16S de archaea (Swan *et al.*, 2010; Borrel *et al.,* 2012), 3,6 cópias do gene 16S de bactéria (Swan *et al.,* 2010; Borrel *et al.,* 2012) e 1 cópia do gene 16S de Sar11 (Campbell *et al.,* 2011; Grote, *et al.,* 2012).

Os resultados de expressão gênica de proteorodpsina e rubisco foram analisados considerando-se uma cópia do gene rubisco por célula de Synechococcus spp. (Paerl *et al.,* 2012) e 1.9 cópias do gene proteorodpsina por célula de Sar11 (Campbell *et al.,* 2011). Os dados foram analisados conforme o período da coleta, diurno ou noturno, ver Tabela 4.

Tabela 4. Relação das estações amostradas e suas respectivas isóbatas e período de coleta.

Estações	Isobata	Data	Período	Hora
1	50	23/01/2013	Diurno	20:00
2	75	30/01/2013	Noturno	00:00
3	100	26/01/2013	Diurno	09:00
4	150	30/01/2013	Diurno	09:00
5	200	26/01/2013	Noturno	20:00
6	1000	28/01/2013	Noturno	02:00
7	1500	27/01/2013	Diurno	14:00
8	2000	27/01/2013	Noturno	22:00
9	2500	28/01/2013	Diurno	17:00

4.5.8. Análise Estatística

A análise dos dados obtidos por qPCR para genes 16S rRNA integrado aos paramétricos físico-químicos foi realizada pela técnica multivariada denominada de análise de componentes principais (PCA) no *software* Canoco®.

Os dados de expressão gênica de rubisco e proteorodopsina obtidos pela técnica de qPCR foram separados em expressão gênica diurna e noturna. Os dados de expressão gênica foram analisados por meio de estatística inferencial não paramétrica uma vez que não se verificou a normalidade da distribuição dos dados. Para a correlação das variáveis quantitativas (rubisco, proteorodpsina com parâmetros abióticos) foi utilizado o coeficiente de correlação de *Spearman* no *software* Statistica®. Para interpretação dos dados foi considerado valores de r = 0,10 até 0,30 como uma correlação fraca; r = 0,40 até 0,6 correlação moderada e r = 0,70 até 1 correlação forte (Gibbons & Chakraborti,2010).

RESULTADOS

4.6. Variáveis físico–químicas

4.6.1. Salinidade, Temperatura e Fluorescência

Os dados obtidos do sensor CTD foram plotados no *software Ocean Data View*® e analisados por meio de perfis de temperatura, salinidade e fluorescência, apresentados nas Tabelas 6 (Apêndice) e Figura 4.

O perfil de salinidade teve valores crescentes no sentido continente -> oceano, Figura 4-A. O menor valor de salinidade foi de 34,97 psu na estação 1 (5 m de profundidade) e o maior de 37,15 psu na estação 8 (60 m de profundidade). Observa-se uma distinção entre as estações sobre a plataforma continental e as localizadas a partir da quebra do talude continental. As estações mais próximas à costa estão sujeitas a maior influência dos processos costeiros e, consequentemente, a salinidade é menor do que em regiões mais afastadas da costa (> 36 psu).

A temperatura mínima de 14,3°C registrada na estação 4 (120 m de profundidade) e máxima de 26,7°C na estação 1 (5 m de profundidade). Nas outras estações a temperatura da superfície não foi inferior a 25°C, devido a exposição à radiação solar, Figura 4 - B. Temperaturas em torno de 14°C foram registradas nas estações 4 (100 e 120m) e 2 (50 e 60m).

Baseado nos perfis de salinidade e temperatura (Figuras 3 - A e 3 - B) pode-se notar uma termoclina acentuada nas estações mais internas (1, 2, 3 e 4) fig. 5 – A e B. A estação 4 (isóbata de 150 m) teve maior influência da ACAS, com temperatura em torno de 14°C e salinidade superior a 36. Além disso, nos gráficos 4 - A e B observa-se um aprofundamento da camada de mistura nas estações de oceano aberto (estações 5 a 9).

A presença da ACAS (T: 6 – 20°C; S: 35-36) em todas as estações é melhor visualizada no diagrama T-S, Figura 3 - A. Além da ACAS também foram registradas mais duas massas de água na PCSE. Água Tropical (AT; T>20°C; S >36,5) fluindo da corrente do Brasil na superfície sobre as isóbatas de 200, 1000,1500, 2000 e 1500 m, ou seja, nas estações externas da plataforma continental. Água Costeira (AC, T >20°C; S <35) detectada somente

na superfície da isóbata de 50m (estação 1). Água de Plataforma (AP, T >20°C; S 35-36) registrada nas das isóbatas 50, 75, 100 e 150 m, ou seja nas estações da plataforma interna e média.

Os valores de fluorescência variam entre 1.457,72 na estação 1 (42 m de profundidade) e 7,73 na estação 7 (240 m de profundidade). Com máximos nas isóbatas de 50, 75 e 100 m, respectivamente nas estações 1, 2 e 3, ou seja, sobre a plataforma continental, Figura 4 - C.

Também se observa um gradiente decrescente na direção da zona oceânica para a plataforma continental. Nas estações mais internas, o MSC ocorreu próximo à superfície (25-30m), deslocando-se para niveis mais profundos (100m) na região oceânica, Figura 4 - C.

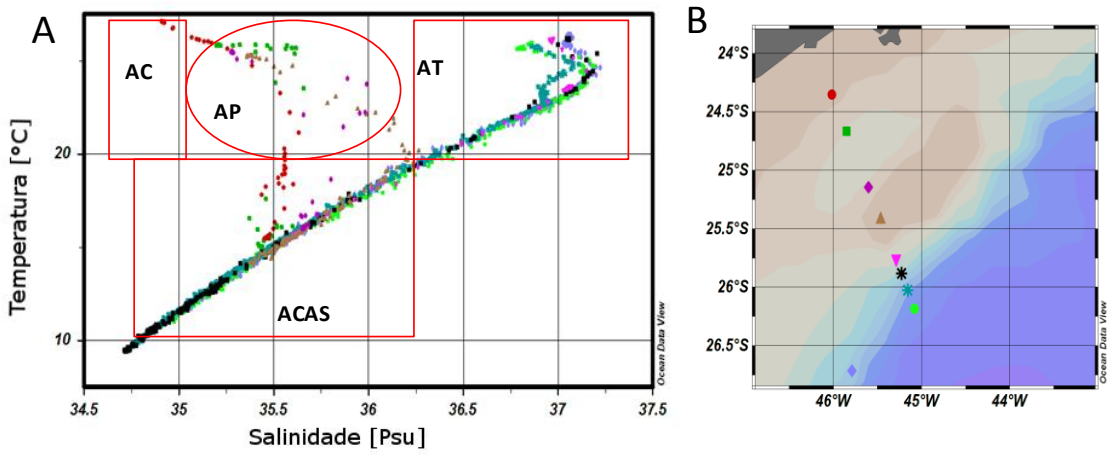

Figura 3. Diagrama de temperatura e salinidade, T-S (A) das estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano (B).

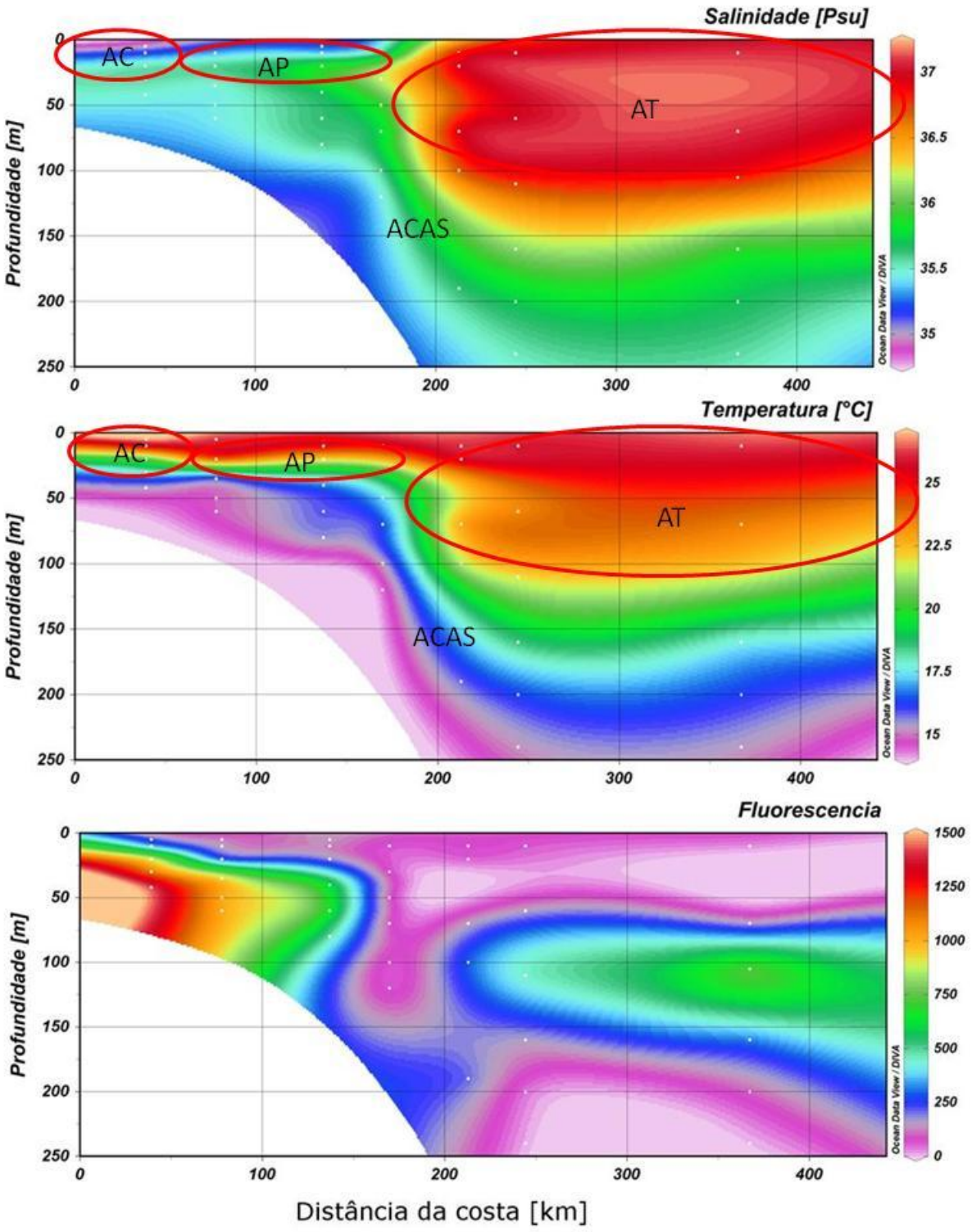

Figura 4. Distribuição dos valores de salinidade (A), temperatura (B), fluorescência (C), nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano (D).

4.6.2. Elementos Nutrientes

4.6.2.1. Carbono Orgânico Dissolvido

A concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) oscilou entre 0,5 e 2 mg.L^{-1} (Figura 5), com um máximo de 1,6 mg.L^{-1} a 240 m de profundidade, na estação 6. As menores concentrações foram registradas nas estações 3 e 4, respectivamente, nas profundidades de 60 e 50 m, com valores de 0,75 - 0,7 mg.L^{-1}. O valor médio de COD foi de 0,97 mg.L^{-1}.

No gradiente costa – oceano, Figura 5, observa-se a maior concentração de COD no fundo das estações de quebra de plataforma. Na plataforma interna e média há concentrações em torno de 1 mg.L^{-1}, e na superfície e ao fundo valores próximos a 0,8 mg.L^{-1}.

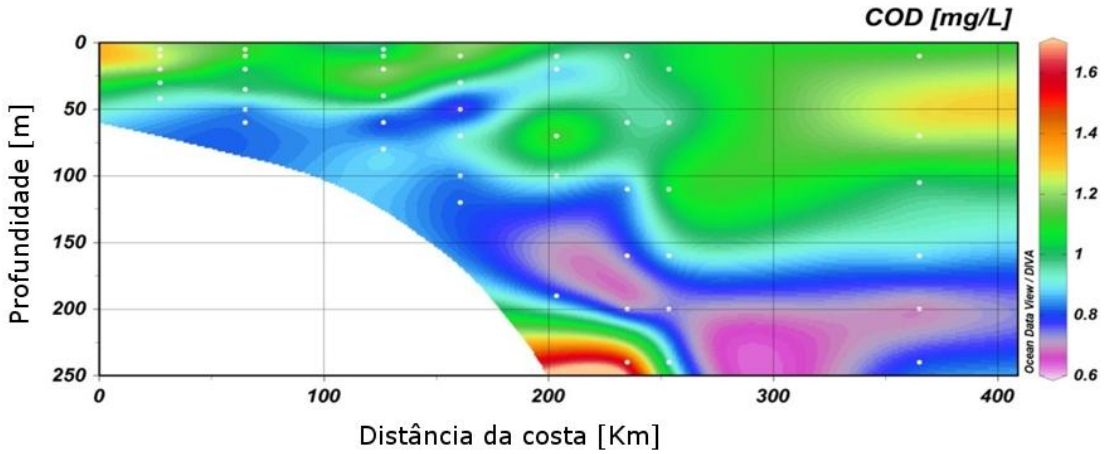

Figura 5. Distribuição da concentração do carbono orgânico dissolvido nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano.

4.6.2.2. Nitrogênio Inorgânico Total (Amônio, Nitrito e Nitrato)

As concentrações de nitrogênio dissolvido oscilaram entre 0 e 1 mg.L^{-1}, com concentração média de 0,28 mg.L^{-1}. Nas estações 5 e 4 foram registrados as maiores concentrações, de 0,83 e 0,71 mg.L^{-1} (100 m de profundidade), Figura 6 - A, coincidindo com o máximo de subsuperficial de clorofila na estação 5. A menor concentração de ND, 0,12 mg.L^{-1} na profundidade de 10m foi registrada também na estação 4. As estações não apresentaram estratificação na concentração de ND.

Na Figura 6 – A pode-se observar a maior concentração de ND na profundidade 100m, a uma distância da costa de 150 km, na quebra da

plataforma continental. Na superfície da plataforma continental e na superfície a partir de 200 km da costa observa-se uma concentração maior de nitrogênio dissolvido, diminuindo com o aumento da profundidade.

As concentrações de amônio variaram de 0 a 1,5 µM, com concentração média de 0,12 µM. Na estação 1 foi registrado as maiores concentrações, com o valor máximo de 1,03 µM a 5 m de profundidade. Nas estações 3 e 7, os valores de amônio foram de 0,55 e 0.29 µM nas profundidades de 10 e 160 m. No restante das estações as concentrações foram inferiores a 0,2 µM ao longo do transecto amostral. As estações 2, 5, 8 e 9 apresentaram estratificação na concentração. Nas demais estações, as concentrações de amônio variam muito pouco ao longo da coluna de água. Na Figura 6 - B pode se observar a maior concentração de amônio na plataforma interna, ou seja, na estação mais próxima à costa e diminuindo ao longo do gradiente costa – oceano. Na distância de 120 e 200 km da costa observa-se maior concentração de amônio na superfície diminuindo com o aumento da profundidade.

As concentrações de nitrito oscilaram entre 0 e 0,15 µM, com concentração média de 0,08 µM. Na estação 4 foi registrada a maior concentração de nitrito, 0,14 µM na profundidade de 30m, em vários pontos de coleta, a concentração de nitrito menor que o limite de detecção. Na Figura 6 - C pode se observar que nos pontos de coleta próximos a superfície, os valores de nitrito foram inferiores a 0,1 µM ou nulos, assim como, em toda a coluna de água nas estações realizadas com distância da costa maior que 200 km. Observa-se a maior concentração de nitrito no fundo da plataforma interna, média e externa.

As concentrações de nitrato variam entre 0 e 11 µM, com concentração média de 2,5 µM. As maiores concentrações foram registradas na estação 2, com valores de 10,19 e 10,45 µM, nas profundidades de 50 e 60 m, respectivamente (camada máxima de clorofila). Em todos os pontos de coleta na superfície as concentrações de nitrato foram nulas ou próximas a zero (Figura 6 - D). As maiores concentrações de nitrato foram registradas abaixo dos 150 m de profundidade nas estações 5, 6, 7,8 e 9. No gradiente costa - oceano foram observadas as maiores concentrações de nitrato no fundo da

plataforma interna e média (Figura 8 - D). Na superfície das estações, as concentrações de nitrato registradas são baixas. Nas estações amostradas na plataforma externa e áreas oceânicas adjacente a. concentrações de nitrato no fundo também é maior.

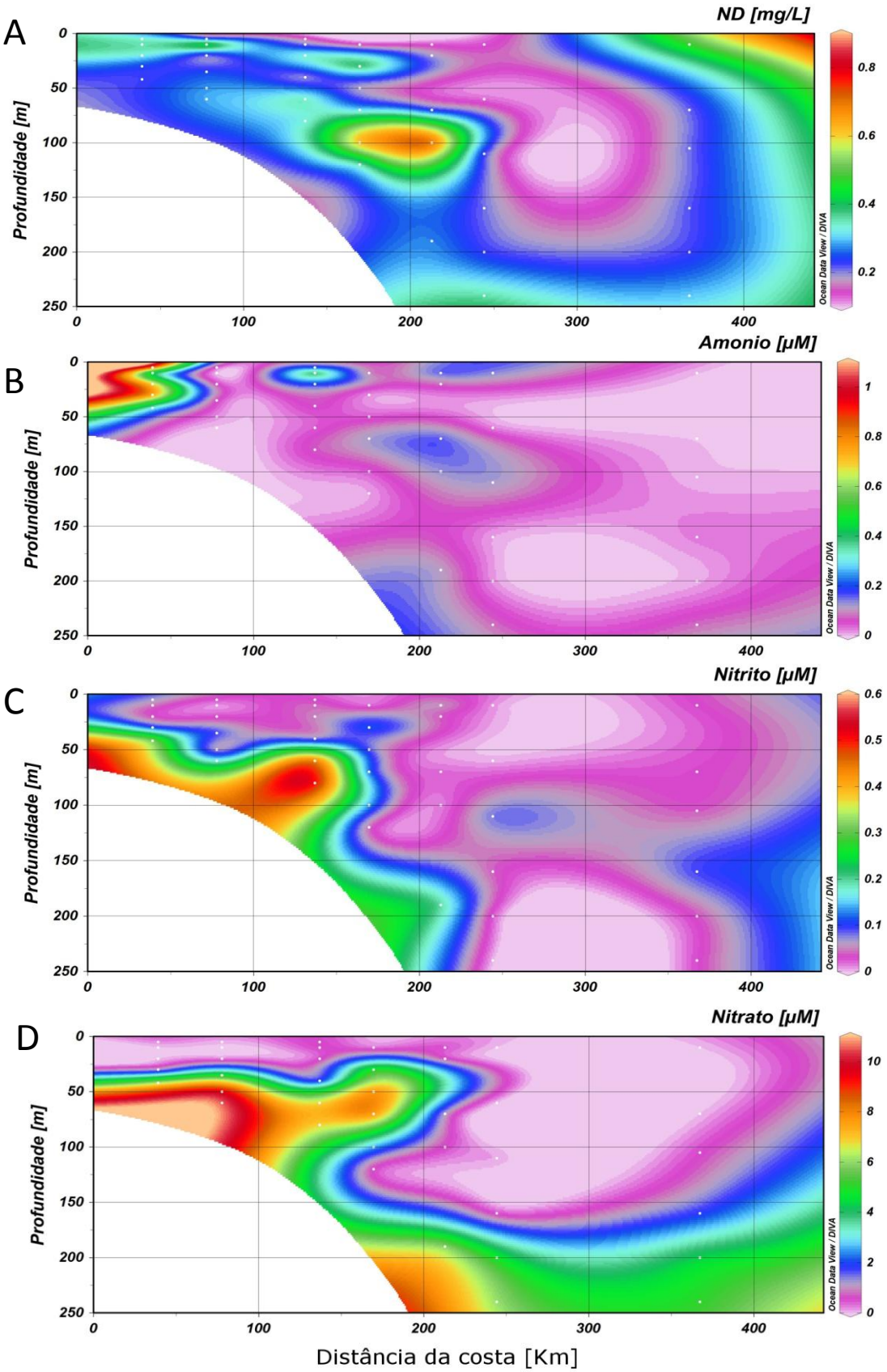

Figura 6. Distribuição das concentrações de nitrogênio dissolvido (A), amônio (B), nitrito (C), nitrato (D) nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano (E).

4.6.2.3. Fosfato

As concentrações de fosfato oscilaram <LD (limite de detecção) a 1,5 µM. Máximos de 1,27 e 1,22 µM a 50 e 60 m de profundidade, respectivamente na estação 2, coincidindo com a camada subsuperficial de clorofila. Maiores concentrações foram registradas no fundo das estações 1, 2, 3 e 4. O menor valor foi de 0,07 µM, registrado nas estações 5 (20, 70 e 100m), 7 (20 m), 8 (60m) e 9 (70 m), Figura 7 - A.

No gradiente costa - oceano observam-se as maiores concentrações de fosfato no fundo das estações 1, 2, 3, 4 e 5 realizadas na plataforma interna, média e externa. Na superfície os valores são nulos ou próximos a zero. Observa-se que com o aumento da profundidade as concentrações de fosfato também aumentam em todas as estações, Figura 7 – A.

4.6.2.4. Silicato

As concentrações de silicato variaram de 0 a 11 µM, com concentração média de 2,64 µM. Na estação 2 foram registradas as maiores concentrações de silicato, com valores máximos de 10,61 e 9,72 µM a 50 e 60 m de profundidade, respectivamente. Os valores máximos de silicato coincidiram com a profundidade da camada subsuperficial de clorofila da estação 2. As maiores concentrações foram registradas no fundo das estações 1, 2, 3 e 4. O menor valor de silicato foi de 0,02 µM, registrado nas estações 8 (60m), Figura 7 - B. Também observa-se que na profundidade de 100m que os valores de silicato são de aproximadamente 1,3 µM com o aumento da profundidade os valores de silicato aumentam. A profundidade de 100m coincide com a profundidade da camada subsuperficial de clorofila.

No gradiente costa - oceano observam-se as maiores concentrações de silicato no fundo as estações realizadas na plataforma continental interna e média. No restante das estações os valores de silicato são inferiores a 2 µM, Figura 7 – B.

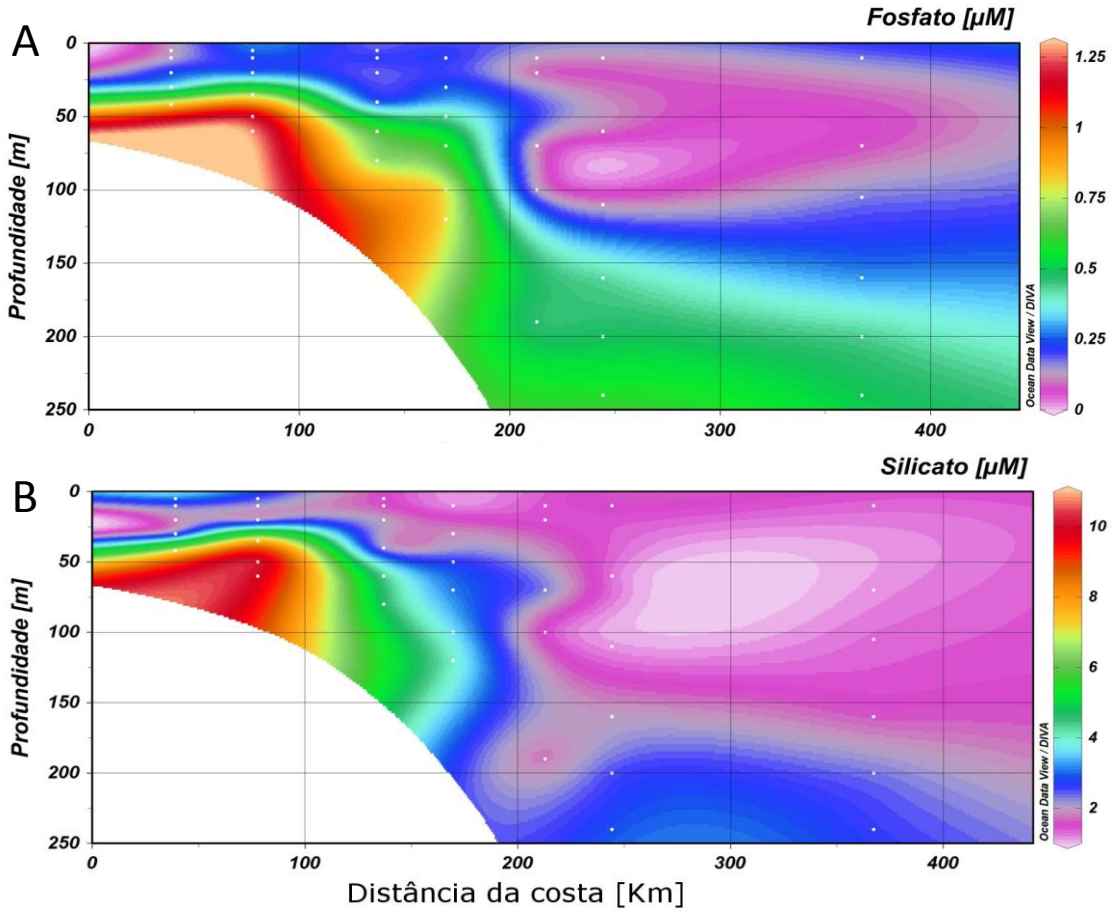

Figura 7. Distribuição das concentrações de fosfato (A) e silicato (B) nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano.

4.7. Variáveis Biológicas

4.7.1. Citometria de Fluxo

Cada população detectada pelo citômetro de fluxo foi discriminada de acordo com suas características, ver item 4.4. Os resultados obtidos estão listados na Tabela 6, Apêndice. Exemplos de citogramas com resultados de autotróficos e bactérias heterotróficas (Figura 8).

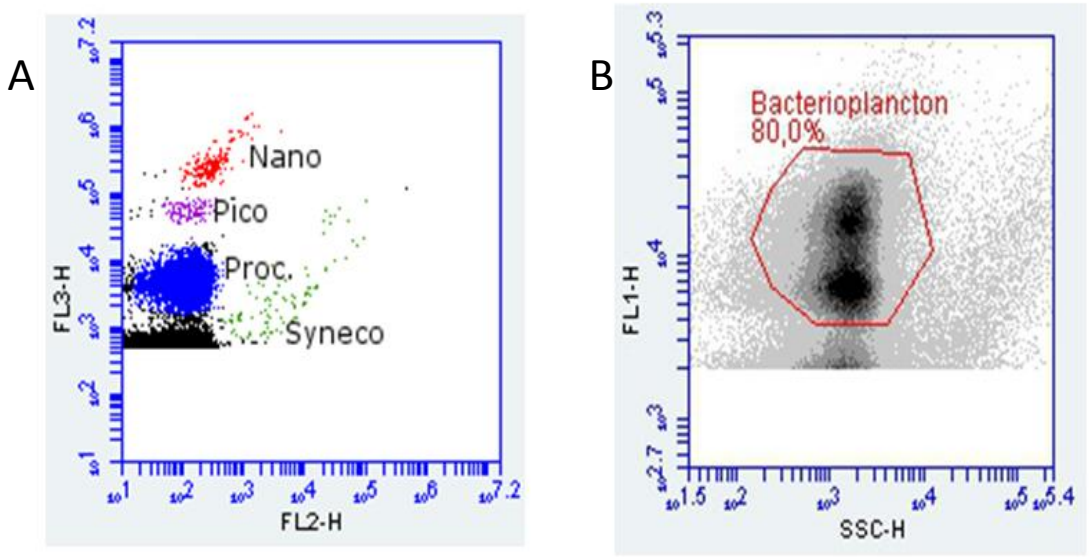

Figura 8. Citograma discriminando cinco populações: A - *Prochlorococcus spp*. (azul); *Synechococcus spp.* (verde); Picoplâncton Eucarioto (roxo) e Nanoplâncton Eucarioto (vermelho), sendo no eixo x, FL2-H (ficoeritrina) e no eixo y, FL3-H (clorofila). B - Bactérias heterotróficas totais, sendo no eixo x, SSC-H (tamanho) e no eixo y, FL1-H (ficobilina).

4.7.1.1. *Prochlorococcus spp*.

O número de células por ml de *Prochlorococcus spp.* variou de 0 a 70.000 células.ml^{-1}. Máximos foram registrados nas estações 7 e 9, com valores de 65.687 células.ml^{-1} e 63.745 células.ml^{-1}, a 110 e 105 m de profundidade, respectivamente, coincidindo com a camada subsuperficial de clorofila. Em superfície foram registradas poucas células ou nenhuma.

No gradiente costa - oceano observa-se na plataforma interna menor abundância de *Prochlorococcus spp*., com aumento a partir de 200 km da costa Figura 9. Também se observa a distribuição de *Prochlorococcus spp*. abaixo da

profundidade de 50 m, sendo os núcleos de maior concentração em torno de 100m de profundidade.

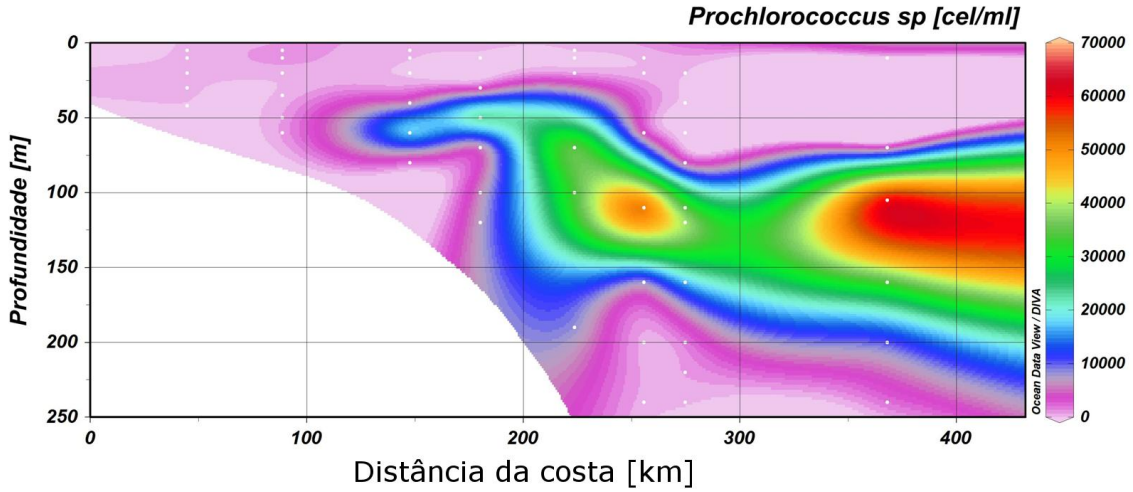

Figura 9. Distribuição de *Prochlorococcus spp*. na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano.

4.7.1.2. Synechococcus spp.

O número de células por ml de Synechococcus spp. variou de 45 a 120.000 células.ml^{-1}. Máximos foram resitrados nas estações 1 e 3, com valores de 119.215 e 116.365 células.ml^{-1}, a 10 m de profundidade, respectivamente. Densidades máximas foram detectadas acima da camada subsuperficial de clorofila. O menor número de células foi registrado na estação 6 com 45 células.ml^{-1} a 160 m de profundidade.

Observa-se a maior abundância de Synechococcus *spp*., na superfície das estações na plataforma continental diminuindo com o aumento da profundidade. A abundância é menor, em toda a coluna de água, a partir da distância de 200 km da costa (Figura 10).

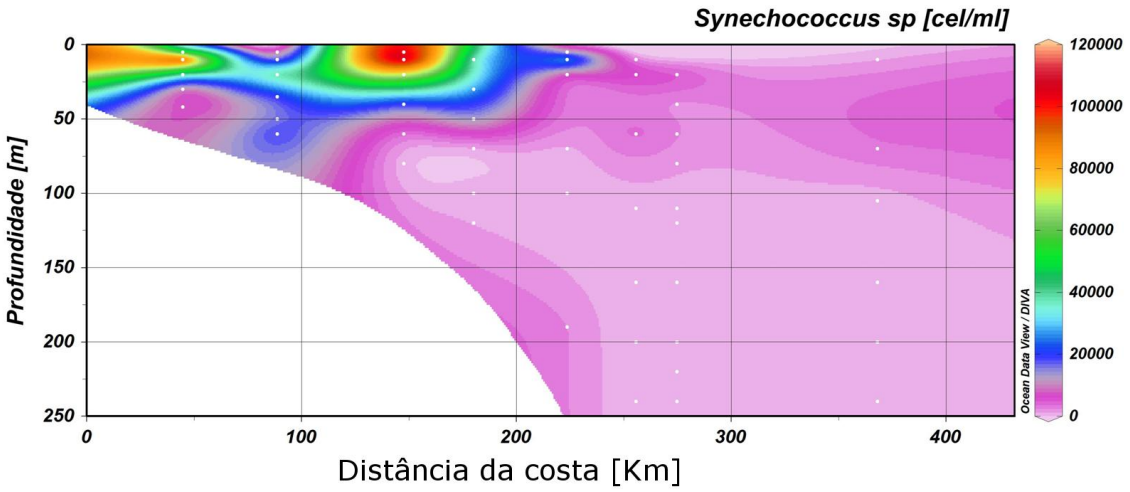

Figura 10. Distribuição de *Synechococcus spp*. na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano.

4.7.1.3. Picoplâncton Eucarioto

A abundância de picoplâncton eucarioto variou de 25 a 40.000 células.ml^{-1}. Máximos foram registrados nas estações 3 e 4, com valores de 36.450 e 25.250 células.ml^{-1}, a 50 e 40 m profundidade respectivamente. O valor máximo na estação 3 coincidiu com a profundidade da camada subsuperficial de clorofila. A menor abundância foi detectada na estação 6 com 25 células.ml^{-1} a 200 m de profundidade.

No gradiente costa - oceano observa-se a maior abundância de picoplâncton eucarioto na superfície da plataforma interna. Na plataforma externa e média observa-se a uma concentração maior de células em torno de 50m de profundidade que diminui com o aumento da profundidade. A abundância é menor em toda a coluna de água, a partir de 200 km da costa, (Figura 11).

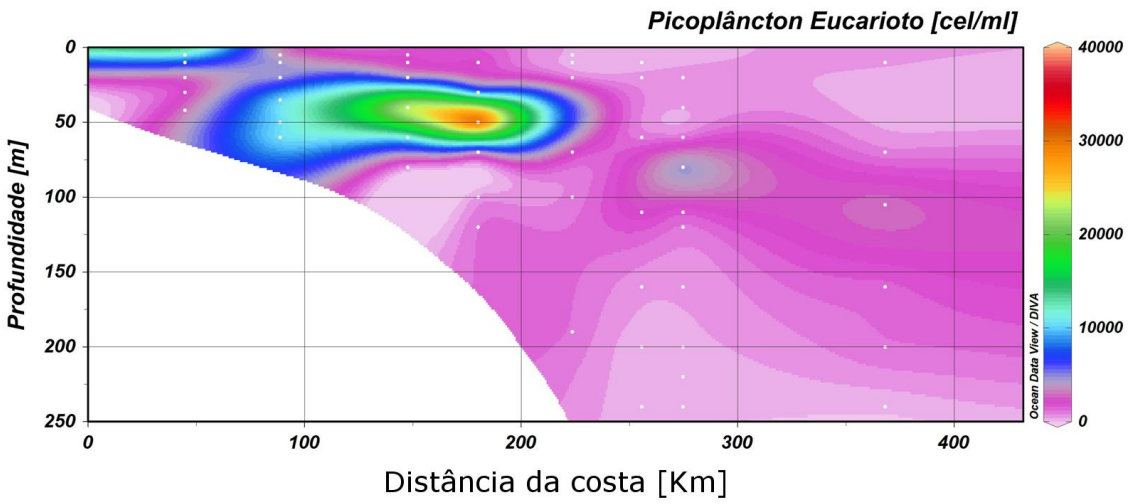

Figura 11. Distribuição de picoplâncton eucarioto na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano.

4.7.1.4. Nanoplâncton Eucarioto

O número de células por ml de nanoplâncton eucarioto variou de 0 a 9.000 células.ml^{-1}. Máxima abundância registrada na estação 1 com valor de 8.615 células.ml^{-1}, a 5 m profundidade. Nenhuma célula foi registrada na estação 6 a 200 m de profundidade.

No gradiente costa - oceano observa-se a maior abundância de nanoplâncton eucarioto na superfície da plataforma interna. Na plataforma externa e média observa-se a uma concentração maior de células em torno de 50m de profundidade. A abundância é menor em toda a coluna de água, a partir de 200 km da costa, exceto na última estação na profundidade de 100 m (Figura 16).

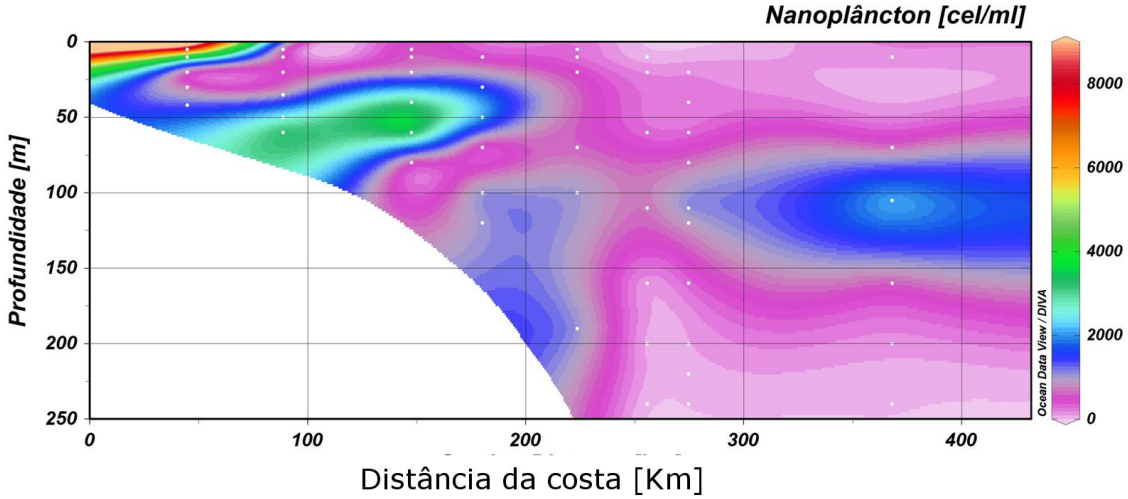

Figura 12. Distribuição de nanoplâncton eucarioto na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano.

4.7.1.5. Bactérias Heterotróficas

A abundância de bactérias heterotróficas variou de $8.1x10^4$ a $2.5x10^6$ células.ml^{-1}. Máxima abundância registrada nas estações 1 e 2, com valores de $2,1x10^6$ e $2.0x10^6$ células.ml^{-1}, ambas a 5 m profundidade. Minimo de células de $8,1x10^4$ células.ml^{-1} a 240 m de profundidade, na estação 7.

No gradiente costa - oceano observa-se a maior abundância de bactérias heterotróficas na superfície da plataforma interna e média, diminuindo com o aumento da profundidade. A partir de 200 km da costa, a abundância diminui em toda a coluna de água com o aumento da profundidade, (Figura 13).

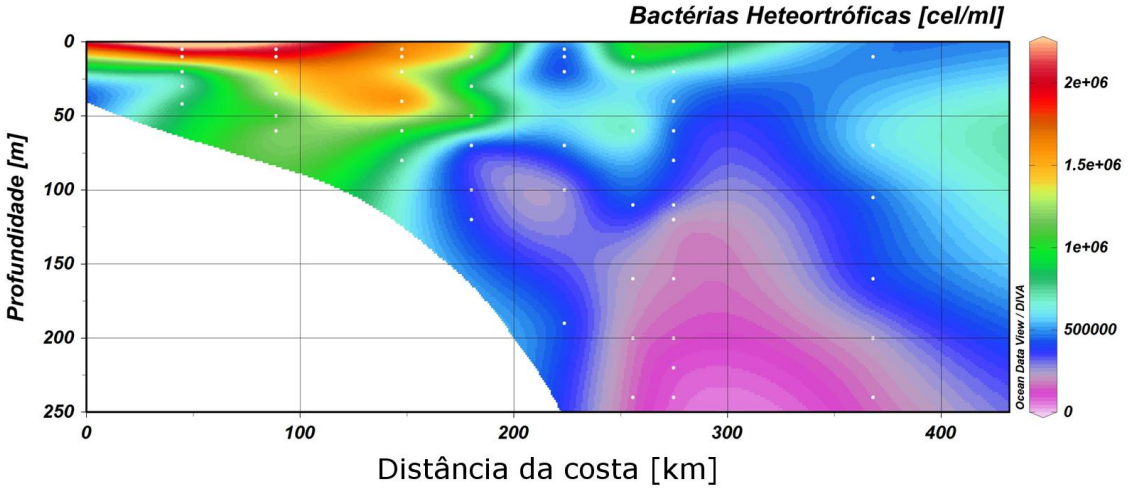

Figura 13. Distribuição de bactérias heterotróficas na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano.

4.7.1.6. Biomassa picoplanctônica e abundância relativa

Os valores obtidos por citometria de fluxo foram convertidos em conteúdo celular de carbono para avaliar a dinâmica da biomassa da comunidade picoplanctônica por meio dos perfis de distribuição no gradiente costa-oceano (Tabela 7, Apêndice).

Os maiores valores de biomassa foram registrados nas estações costeiras 1, 2, 3 e 4. No restante das estações os valores de biomassa foram inferiores a 200 $\mu gC.L^{-1}$.

Observa-se que a biomassa bacteriana heterotrófica diminuiu com o aumento da profundidade (Figura 14). Em todo o transecto os valores máximos de biomassa bacteriana foram obtidos em amostras sub-superficiais e superficiais e os mínimos em amostras coletadas em maiores profundidades. O maior valor de biomassa de bactérias heterotróficas foi de 42,2 $\mu gC.L^{-1}$, na estação 1, a 5 m de profundidade. O menor valor foi de 1,6 $\mu gC.L^{-1}$ registrado na estação 7, a profundidade de 240 m. O valor médio foi de 14,86 $\mu gC.L^{-1}$. Em relação à biomassa bacteriana heterotrófica relativa aos grupos autotróficos do picoplâncton (Figura 15), observou-se o aumento da importância relativa em função da biomassa total em maiores profundidades, devido ao decréscimo dos outros grupos.

A biomassa do picoplâncton eucarioto foi maior nas estações próximas à costa (1, 2, 3 e 4). Com máximo de 944,1 $\mu gC.L^{-1}$ à profundidade de 50 m de profundidade, na estação 4. E mínimo de 0,6 $\mu gC.L^{-1}$, na estação 6 à 200 m de profundidade (Figura 14). O valor médio foi de 92,50 $\mu gC.L^{-}1$. A importância relativa da biomassa de picoplâncton eucarioto para a biomassa total foi maior na MSC e abaixo dela (Figura 15).

A biomassa de *Synechococcus* sp. foi maior na superficiais da região costeira (estações 1, 2, 3 e 4), (Figura 14). Com máximo de 304 $\mu gC.L^{-1}$ corresponde profundidade de 10 m da estação 1. E os valores mínimos registrados denotaram quase ausência de biomassa do Synechococcus em amostras coletadas abaixo do MSC nas estações 6, 7, 8 e 9 (Figura 15), sendo o menor valor registrado de 0,1 $\mu gC.L^{-1}$, na estação 6 na profundidade de 160 m. O valor médio foi de 38,64 $\mu gC.L^{-1}$. A importância relativa da biomassa de

Synechococcus ssp. para a biomassa total foi maior na superfície das estações 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 diminuindo abaixo do MSC (Figura 15).

A biomassa de *Prochlorococcus* sp. foi abaixo do limite de detecção nas estações 1 e 2. O maior valor foi registrado a 110 m de profundidade na estação 7, de 23,6 $\mu gC.L^{-1}$ (Figura 14), correspondente a MSC. Os maiores valores biomassa foram registrados em profundidades próximas e abaixo aos MSC (Figura 14). A importância relativa da biomassa de *Prochlorococcus* sp. para a biomassa total foi maior na profundidade da MSC e abaixo da mesma. Além disso, a importância relativa aumentou nas estações mais afastadas da costa (Figura 15).

A ordem de média de conteúdo de carbono de biomassa encontrada foi Prochlorococcus sp.(2,9 µgC.L-1) > bacteriana heterotrófica (14,8 µgC.L-1) > Synechococcus sp. (38,6 µgC.L-1) > picoplâncton eucarioto (92,5 µgC.L-1) registrada.

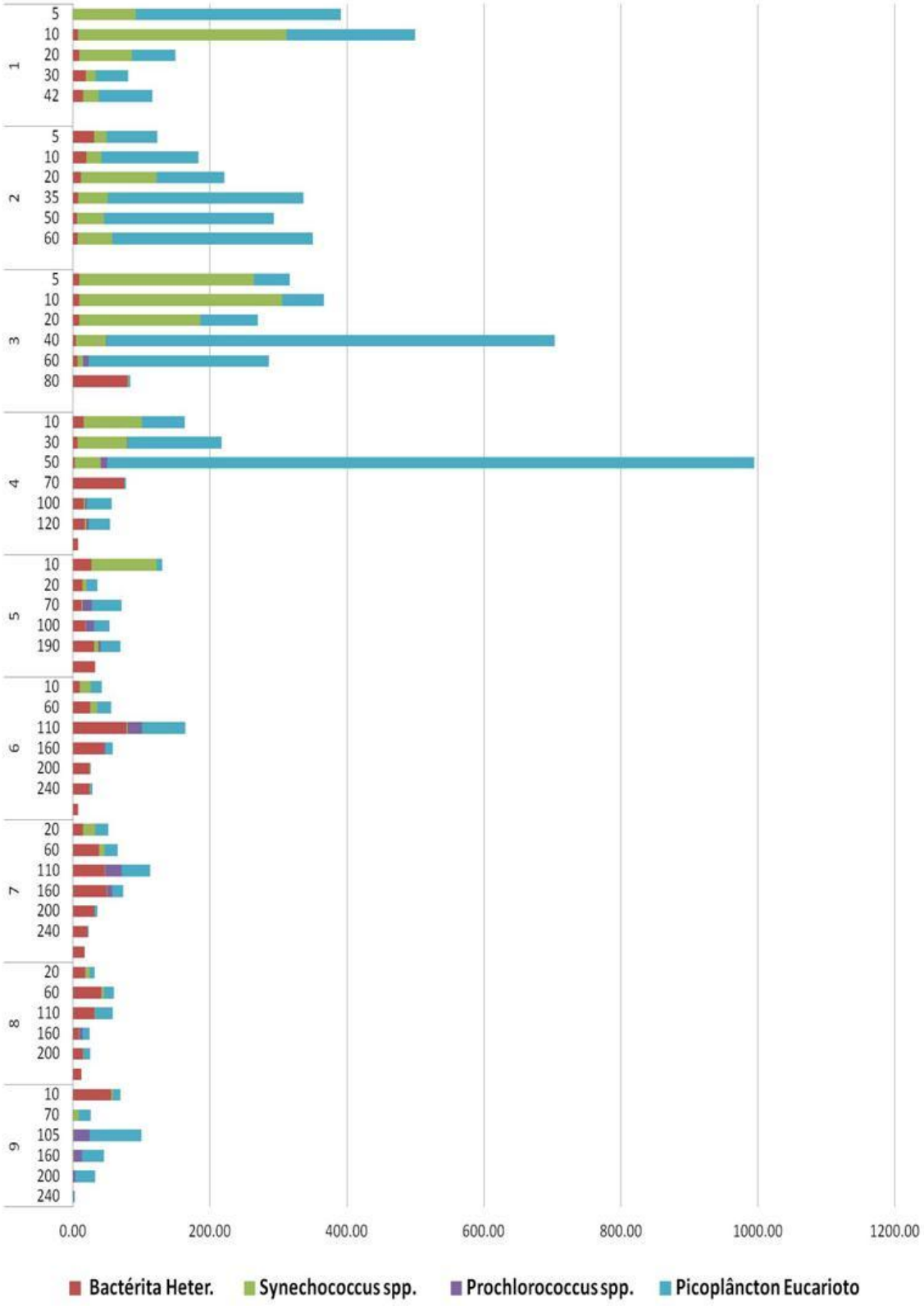

Figura 14. Biomassa de bactérias heterotróficas, picoplâncton eucariotos, *Synechococcus* spp. e *Prochlorococcus* spp. (µgC.L^{-1}) nas profundidades de coleta de cada estação.

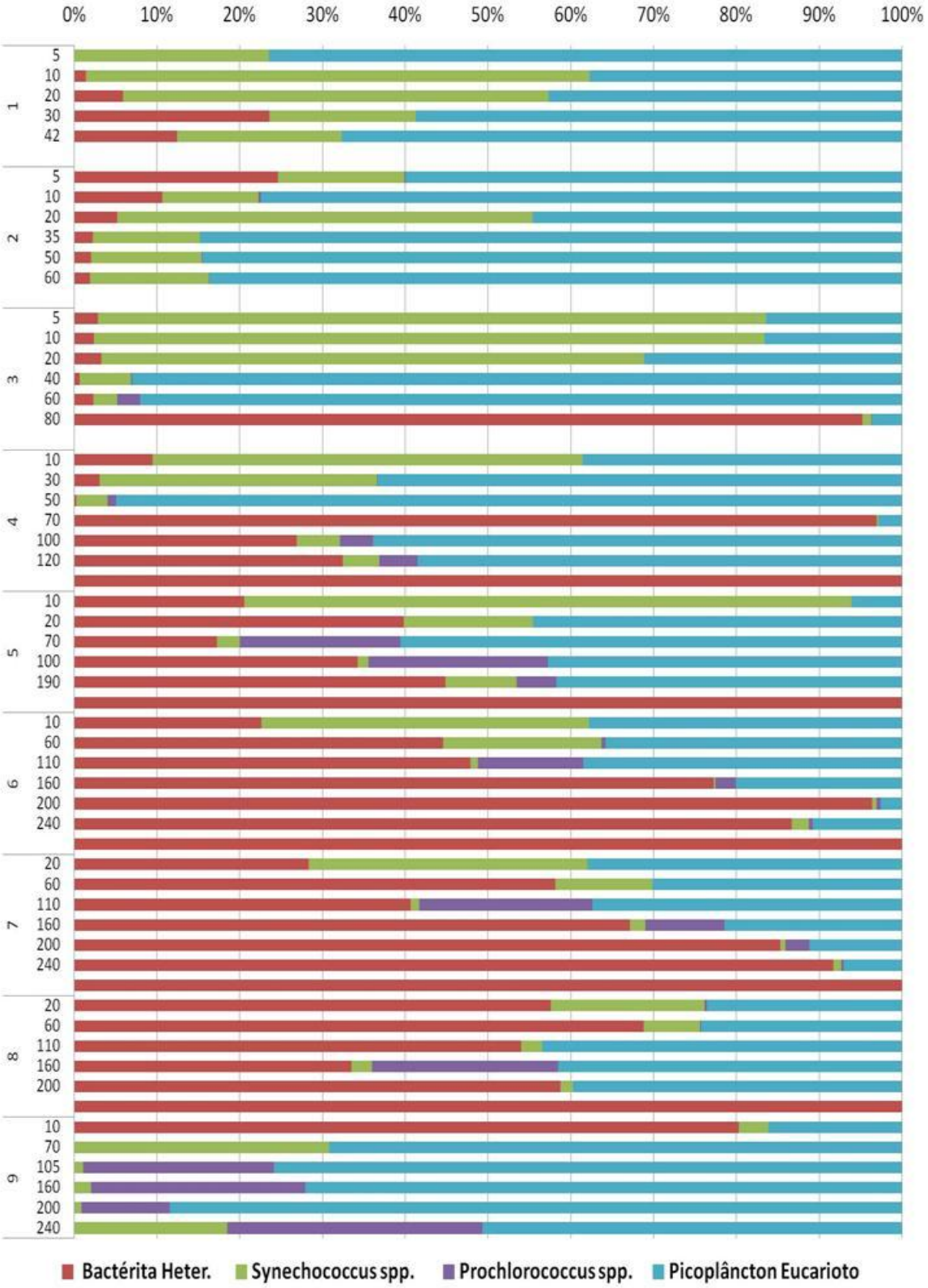

Figura 15. Abudância relativa (%) de bactérias heterotróficas, picoplâncton eucariotos, *Synechococcus spp*. e *Prochlorococcus spp.* (µgC.L^{-1}) nas profundidades de coleta de cada estação.

4.7.1.7. Análise de Componentes Principais (PCA)

Na análise de componentes principais (PCA) foram correlacionados os dados obtidos por citometria de fluxo (células.ml^{-1}) com os parâmetros físico–químicos, Figura 16.

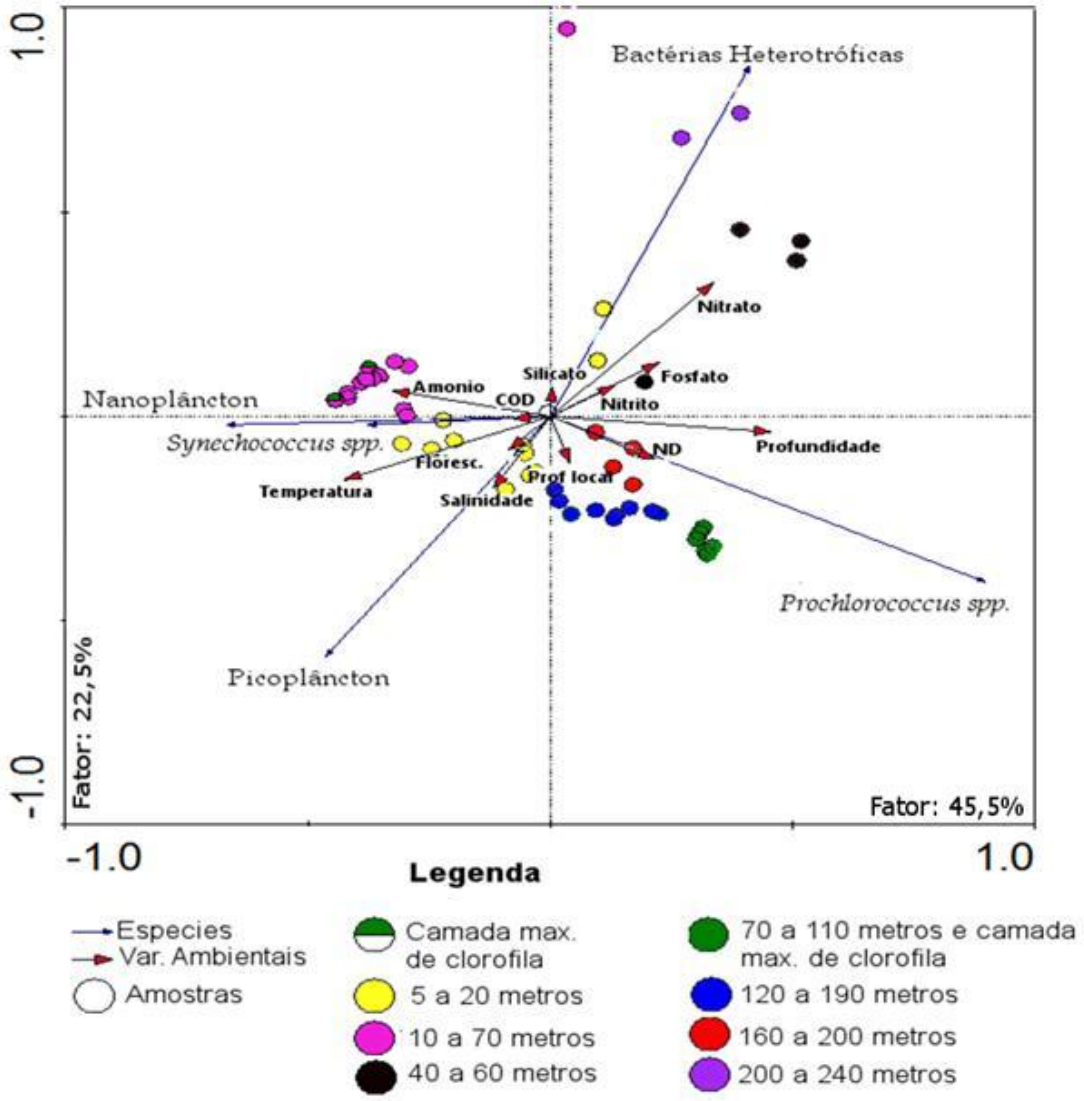

Figura 16. Análise de componentes principais correlacionando dados obtidos por citometria de fluxo com parâmetros físico–químicos.

A distribuição dos micro-organismos segundo o PCA está influenciada pela profundidade das amostras (Figura 16).

A correlação entre *Synechococcus* sp. e nanoplâcton eucarioto foi positiva em relação ao COD, amonio, temperatura e florescência e negativa

com a profundidade, nitrito e nitrogênio dissolvido. A maior abundância destas duas populações foi registrada em amostras de superfície, como descrito nos resultados.

Picoplâncton eucarioto também teve influência de amostras superficiais, de 5 a 20m de profundidade. E teve correlação positiva com a salinidade, profundidade local, temperatura e a florescência e correlação negativa com o nitrato, nitrito, fosfato e bactérias heterotróficas.

Bactérias Heterotróficas evidenciaram correlação com silicato, nitrato, nitrito e fosfato e correlação negativa a salinidade, flourescência, a temperatura. E influência das amostras de 200 a 240 m e de 40 a 60 m de profundidade.

As amostras de 70 a 110 m de profundidade coincidiram com a maioria das amostras coletadas no máximo subsuperficial de clorofila e apresentaram correlação com *Prochlorococcus* spp. Além disso, *Prochlorococcus* spp. teve correlação positiva com o nitrogênio dissolvido, a profundidade, a profundidade local e com amostras de 120 a 190 m e 160 a 200 m de profundidade. *Prochlorococcus* spp. teve correlação negativa com o amônio, COD e *Synechococcus* spp. e nanoplâcton eucarioto.

4.7.2. Biologia Molecular

As amostras de água foram filtradas e o DNA e RNA foram extraídos conforme o item 4.5.1. e 4.5.2. O método utilizado para extração de DNA e RNA resultou em pouca quantidade de material genético. A quantificação do DNA e cDNA total relevada pelo Qubit®, após a purificação está apresentada na Tabela 8, Apêndice.

Os resultados obtidos por PCR em tempo real para quantificar a abundância de cada gene 16S rRNA analisado e a expressão gênica de rubisco e proteorodopsina nas amostras de água (Tabela 9), são descritos a seguir.

4.7.2.1. Domínio Bacteria

Na quantificação do gene 16S rRNA Bacteria, a temperatura média de dissociação na curva de *melt* foi de 81 °C, Figura 24 – B, apêndice. O valor de regressão logarítmica (r2) foi de 0,99 (Figura 24 - C, apêndice). Os resultados foram analisados considerando múltiplas cópias do gene 16S rRNA de bactéria (ver item 4.5.7) que ocorre por célula.

A abundância de bactérias variou de 30 a 30.000 células.ml^{-1}. Máximos de 29.272 e 28.021 células.ml^{-1}, a 110 e 10 m profundidade foram registrados nas estações 8 e 9. Com mínimo de 39 células.ml^{-1} a 60 m de profundidade na estação 8 (Tabela 9, apêndice).

No gradiente costa - oceano observa-se a maior abundância de bactérias na superfície da plataforma externa e na região oceânica adjacente (isóbatas de 2.000 e 2.500 m). A concentração de células diminui com o aumento da profundidade. Na plataforma interna em superfície a abundância é baixa e na profundidade de 25 m aumenta, mas com o aumento da profundidade diminui novamente (Figura 17).

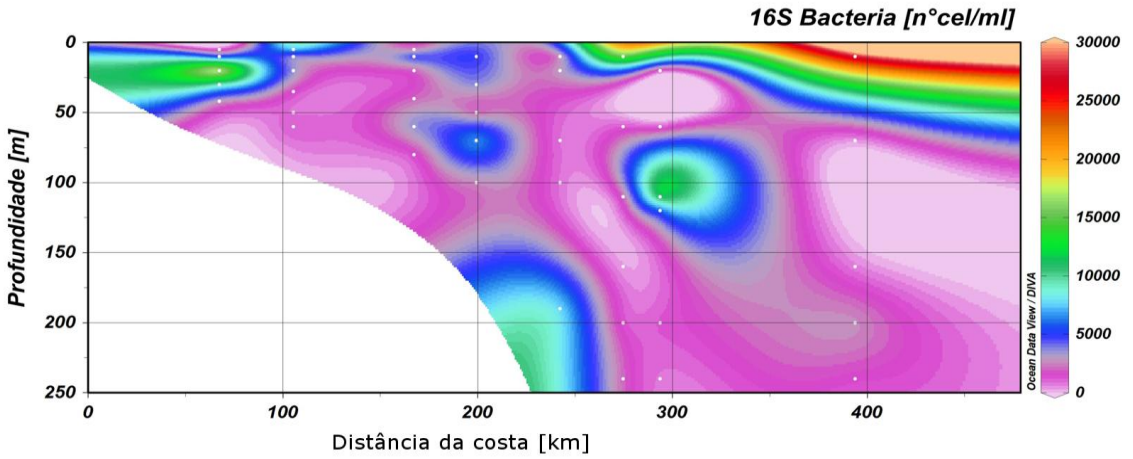

Figura 17. Distribuição do domínio Bacteria na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano.

4.7.2.2. Domínio Archaea

Na quantificação do gene 16S rRNA Archaea, a temperatura média de dissociação na curva de melt foi de 81 °C (Figura 25 - B, apêndice). O valor de regressão logarítmica (r^2) foi de 0,99, Figura 25, apêndice.

O número de cópias do gene 16S rRNA por ml de archaeas variou de 1 a 3.000 n°cópia/ml. Máximo de 2.720 a 200 m de profundidade, na estação 8. E mínimo de 1 n°cópia/ml a 20 m de profundidade, na estação 7 (Tabela 9, apêndice).

No gradiente costa - oceano observa-se menor abundância do gene 16S por ml de archaeas na superfície de todo o transceto. A abundância aumenta com o aumento da profundidade. A partir de 180 km da costa a abundância aumenta em profundidades superiores a 100 m (Figura 18).

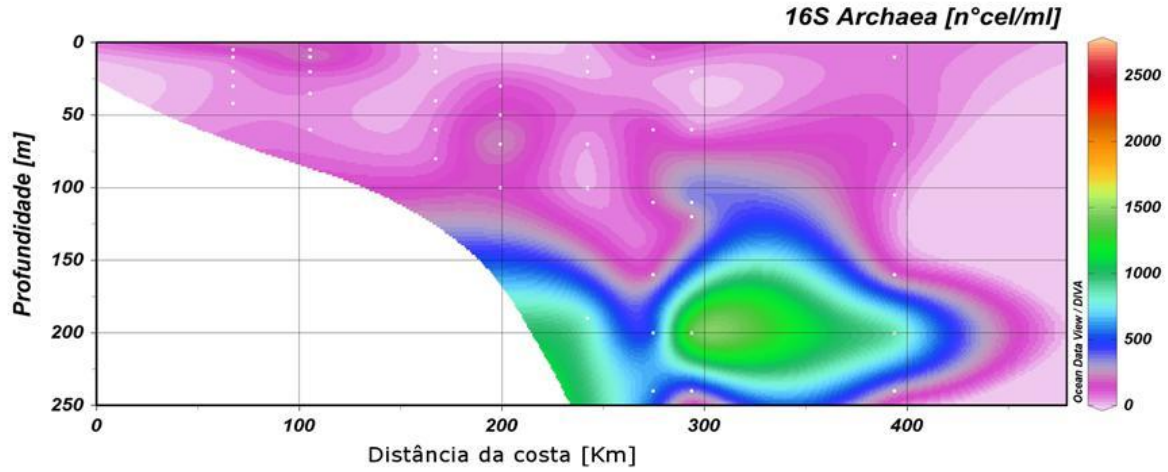

Figura 18. Distribuição do domínio Archaea na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano.

4.7.2.3. Clado Sar11

Na quantificação do gene 16S rRNA Sar11, a temperatura média de dissociação na curva de *melt* foi de 81°C, Figura 26 - B. O valor de regressão logarítmica (r^2) foi de 0,99 (Figura 26 – C). Os resultados foram analisados considerando uma cópia do gene 16S rRNA de Sar11 que ocorre por célula de Sar11 (ver item 2.5.7).

A abundância Sar11 variou de 7 a 30.000 células.ml^{-1}, com valor médio de 3.568 células.ml^{-1}. Maiores densidades foram registradas nas estações 4 e 9 com valores de 29.424 e 26.882 células.ml^{-1}, a 10 m profundidade, respectivamente. Menor densidade de 7 células.ml^{-1} a 35 m de profundidade, na estação 2, coincidindo com a camada subsuperficial de clorofila (Tabela 9, apêndice).

No gradiente costa - oceano observa-se menor abundância de Sar11 na plataforma interna e média em toda a coluna de água. Com o aumento da distância da cota, a partir de 120 km a abundância é maior na superfície diminuindo com o aumento da profundidade. Mas é possível observar que maiores concentrações de células ocorream a 250 km da costa entre 50 e 100 m de profundidade (Figura 19).

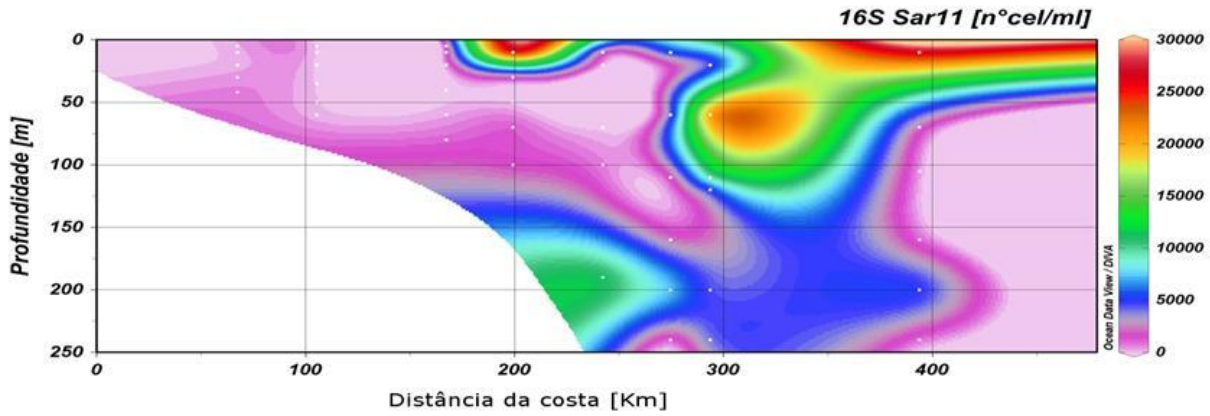

Figura 19. Distribuição do clado Sar11 na coluna de água nas estações amostradas ao longo do gradiente costa – oceano.

4.7.2.4. Análise de Componentes Principais (PCA)

Na análise de componentes principais (PCA) foram correlacionados os dados obtidos por PCR em tempo real (qPCR; n°cópias/ml) com os parâmetros físico – químicos, Figura 20.

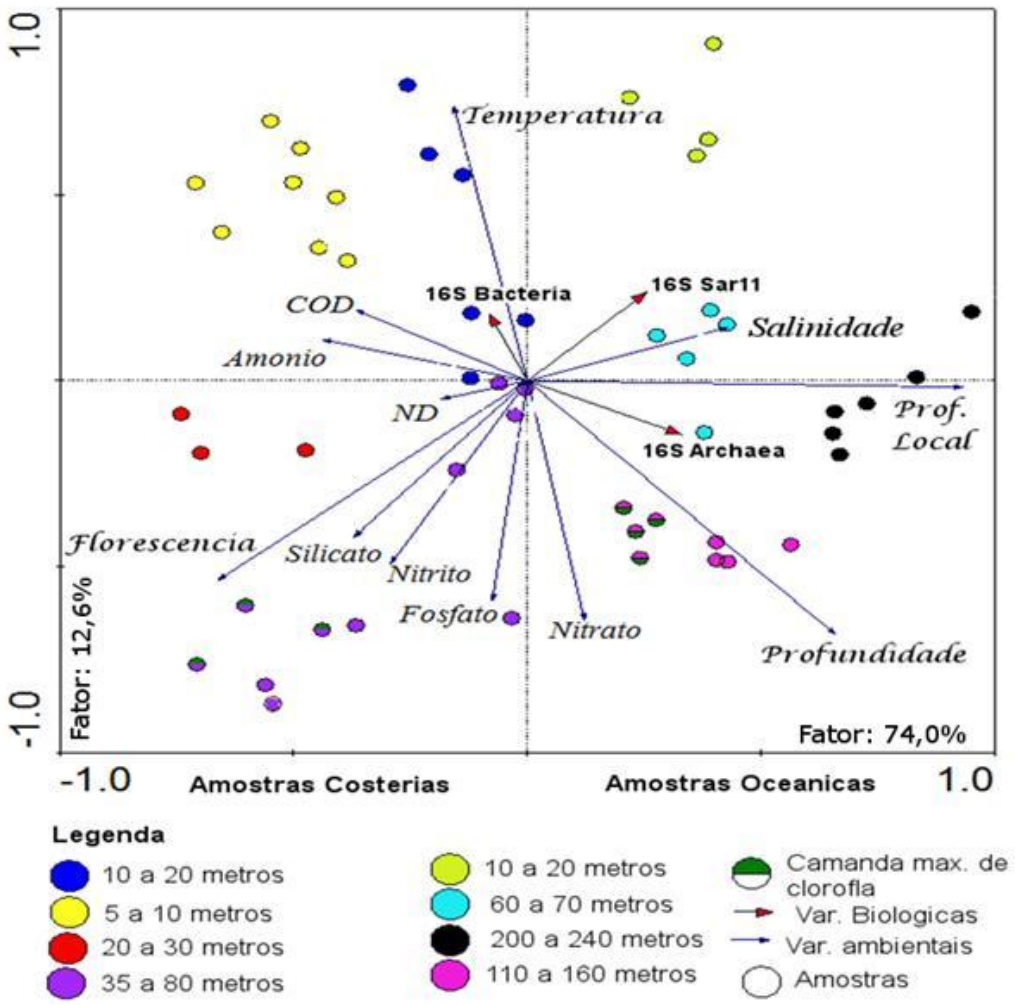

Figura 20. Análise de componentes principais correlacionando dados obtidos por qPCR com parâmetros físico–químicos.

A distribuição dos domínios Bacteria, Archaea e do clado Sar11 conforme a PCA estão relacionados à região (costeira e oceânica) e a profundidade de coleta das amostras. Plataforma continental compreende amostras coletadas nas estações 1, 2, 3, 4 e 5. Já as amostras consideradas oceânicas foram coletadas nas estações 6, 7, 8 e 9. A temperatura, COD, amônio, fluorescência, ND, nitrito e fosfato influenciam diretamente as amostras de região costeira enquanto que as amostras de região oceânica

estão mais relacionadas à salinidade, profundidade local e de coleta e o nitritro. (figura 26).

O domínio Bactéria evidenciou correlação positiva com COD, amônio, principalmente com a temperatura e com as amostras superficiais de região costeira. Observa-se uma correlação inversa do domínio Bactéria com a profundidade e com nitrato.

O domínio Archaea foi influenciado por pela profundidade local (isóbata local), profundidade de coleta, o nitrato e com amostras de região oceânica de 60 a 70m e de 200 a 240m de profundidade. Além disso, teve correlação negativa com o COD e o amônio.

O clado Sar11 teve correlação positiva com amostras da região oceânica de 10 a 20 m e de 60 a 70 m de profundidade e com a salinidade. E correlação negativa com nitrogênio dissolvido, nitrito, silicato e florescência.

4.7.2.5. PCR em tempo real dos Genes Funcionais

A expressão gênica foi analisada em todas as estações. Considerando que as coletas foram realizadas nos períodos diurno e noturno, os resultados de expressão gênica são apresentados nestes dois períodos (Tabelas 11 e 12, Apêndice). Na quantificação do gene rubisco, a temperatura média de dissociação foi de 75,5 °C (Figura 21 – A3). O valor de regressão logarítmica (r^2) foi de 0,99 (Figura 21 – A4). Na quantificação do gene proteorodopsina, a temperatura média de dissociação foi de 81°C (Figura 21 – B3). O valor de regressão logarítmica (r^2) foi de 0,99 (Figura 21 – B4).

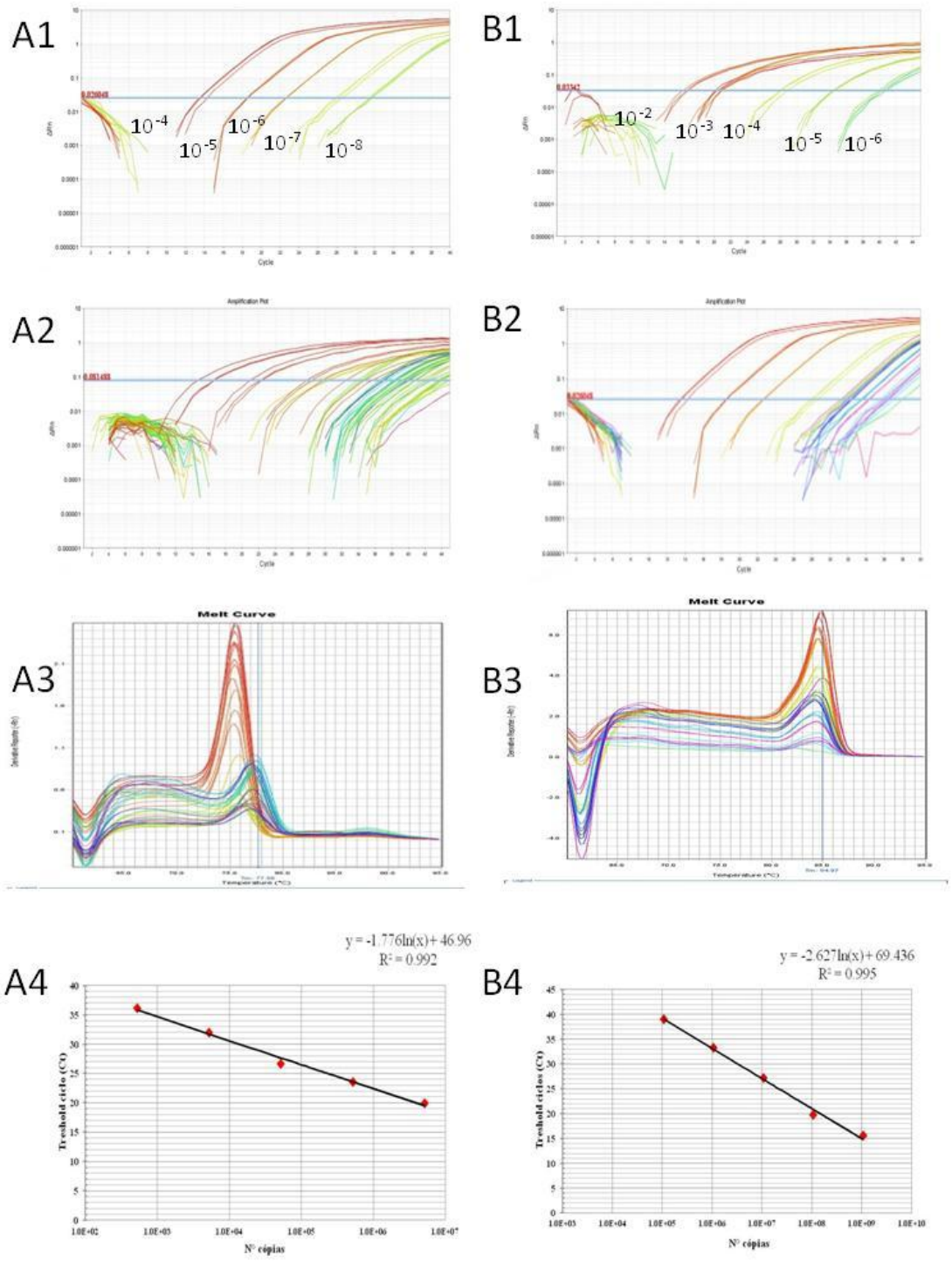

Figura 21. Curva padrão (A1e B1), de amplificação (A1 e B1), de dissociação (A3 e B3) e equação da reta (A4 e B4) obtidas a partir da amplificação dos genes rubisco (A) e proteorodopsina (B) por qPCR, nas amostras de água.

.

4.7.2.6. Rubisco

Período Diurno

O número de cópias de transcritos da enzima rubisco por ml variou de 2 a 3.000 n°transcritos.ml^{-1} (Figura 22 - A). Na estação 4 foram registrados, o máximo de 2.811 n°transcritos.ml^{-1}, a 70 m de profundidade) e o minimo de 2 n°transcritos.ml^{-1} a 100 m de profundidade.

No gradiente costa - oceano observa-se menor expressão da enzima rubisco na superfície de todas as estações, exceto a estação 3 (Figura 22 – A). A expressão aumenta com o aumento da profundidade até certo ponto, no qual diminui. Na estação 3 (costeira) os valores de expressão gênica são inferiores a 1.000 n°transcritos.ml^{-1} na coluna de água, exceto na superfície. Nas estações 4 e 7 observa-se maiores valores de expressão do gene rubisco em profundidades superiores a 25 m. Na estação 9 (oceânica) observa-se baixos valores de expressão gênica, no entanto na profundidade de 160 m a expressão do gene rubisco é elevada.

Em relação ao horário de coleta, máximo de expressão durante o dia foram entre às 9 e 14 horas, nas estações 4 e 7.

Período noturno

O número de cópias transcritos da enzima rubisco por ml variou de 1 a 5.000 n°transcritos.ml^{-1} (Figura 22 – B). A expressão máxima foi de 4.899 n°transcritos.ml^{-1} a 160 m profundidade, na estação 8. E a expressão mínima de 2 n°transcritos.ml^{-1}a 240 m de profundidade na estação 6.

No gradiente costa - oceano observa-se maior expressão da enzima rubisco a partir da segunda profundidade de coleta de todas as estações, exceto a estação 8 (Figura 22 – A). Na estação 8 a expressão da enzima rubisco aumenta somente a partir dos 100 m de profundidade.

Em relação ao horário de coleta, máximos de expressão gênica foram registrados a noite, a partir da meia noite (estações 2 e 6).

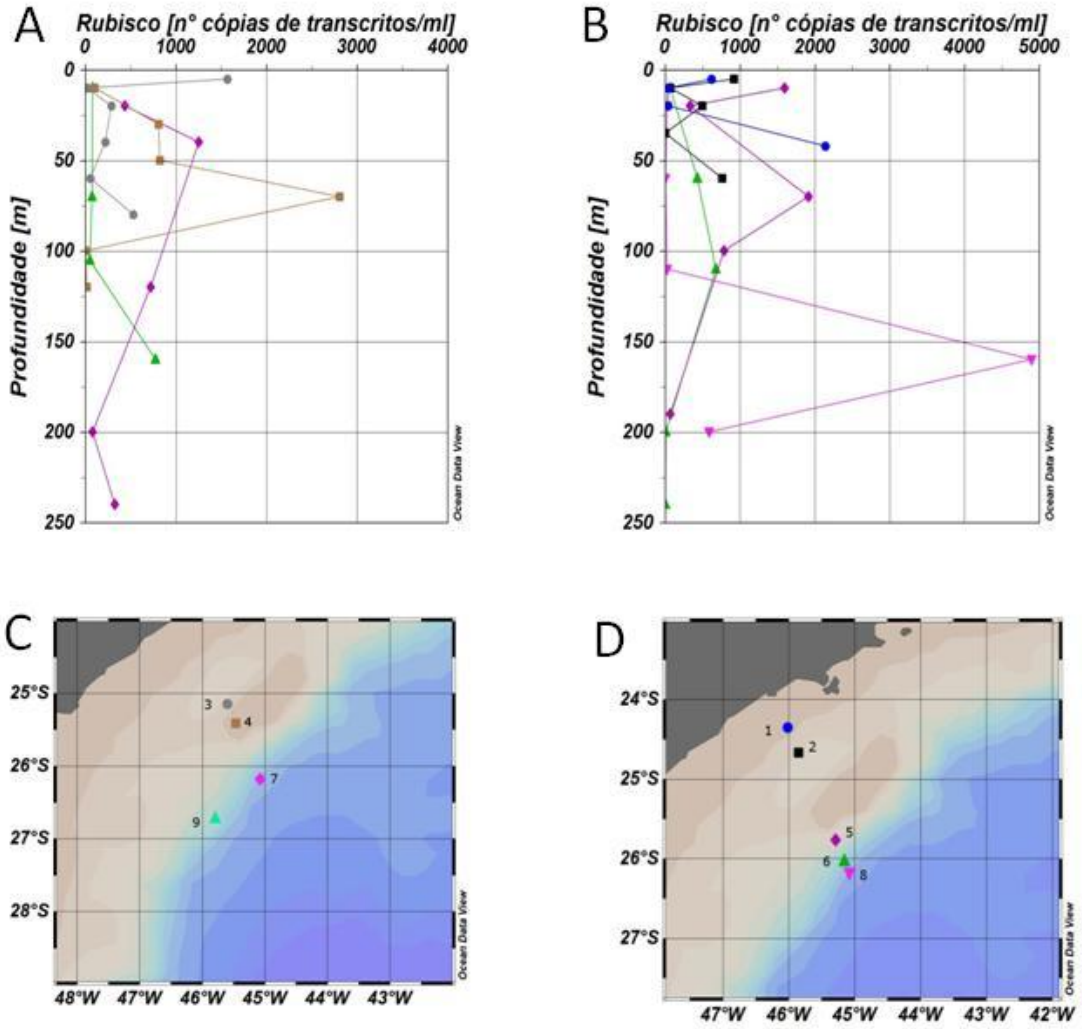

Figura 22. Perfil de expressão gênica da enzima rubisco durante o dia (A), rubisco durante a noite (B), (C e D) mapa com as estações amostradas em cada período.

4.7.2.7. Proteorodopsina

Período Diurno

O número de cópias de transcritos da enzima proteorodopsina variou de $2x10^3$ a $1,5x10^7$ n°transcritos.ml^{-1} (Figura 23 – A). Na estação 7 foram registrados o máximo de expressão gênica de $1,34x10^7$ e $1,46x10^5$ n°transcritos.ml^{-1}, a 110 e 20 m profundidade, respectivamente e minino de $1,77x10^3$ n°transcritos.ml^{-1}a 240 m de profundidade. O maior valor de expressão gênica na profundidade de 110 m coincide com a camada subsuperficial de clorofila.

No gradiente costa - oceano observam-se valores parecidos de expressão gênica da enzima proteorodopsina em todas as estações, exceto a estação 7 (Figura 23 – B). Os maiores valores de expressão gênica foram obtidos em amostras coletadas até 120 m de profundidade.

No período diurno houve maior média de transcrição da enzima proteorodopsina. Não se observa diferença de transcrição de proteorodopsina entre os horários de coleta, a não ser a estação coletada às 14 horas.

Período Noturno

O número de cópias de transcritos da enzima proteorodopsina variou de $4x10^3$ a $3x\ 10^5$ n°transcritos.ml^{-1} (Figura 23 – B). Máximos de expressão gênica de $2,70x10^5$ e $1,36x10^5$ n°transcritos.ml^{-1}, a 110 e 70 m profundidade, respectivamente foram registrados nas estações 6 e 5, coincidindo com a profundidade do MSC. O mínimo de expressão de $3,62x10^3$ n°transcritos.ml^{-1}a 50 m de profundidade foi detectado na estação 2.

No gradiente costa - oceano observam-se valores parecidos de expressão gênica da enzima proteorodopsina na coluna de água em todas as estações, exceto a estação 6 e 5 (Figura 23 – B). No qual, os maiores valores de expressão gênica foram registrados em amostras coletadas a partir de 100 m de profundidade.

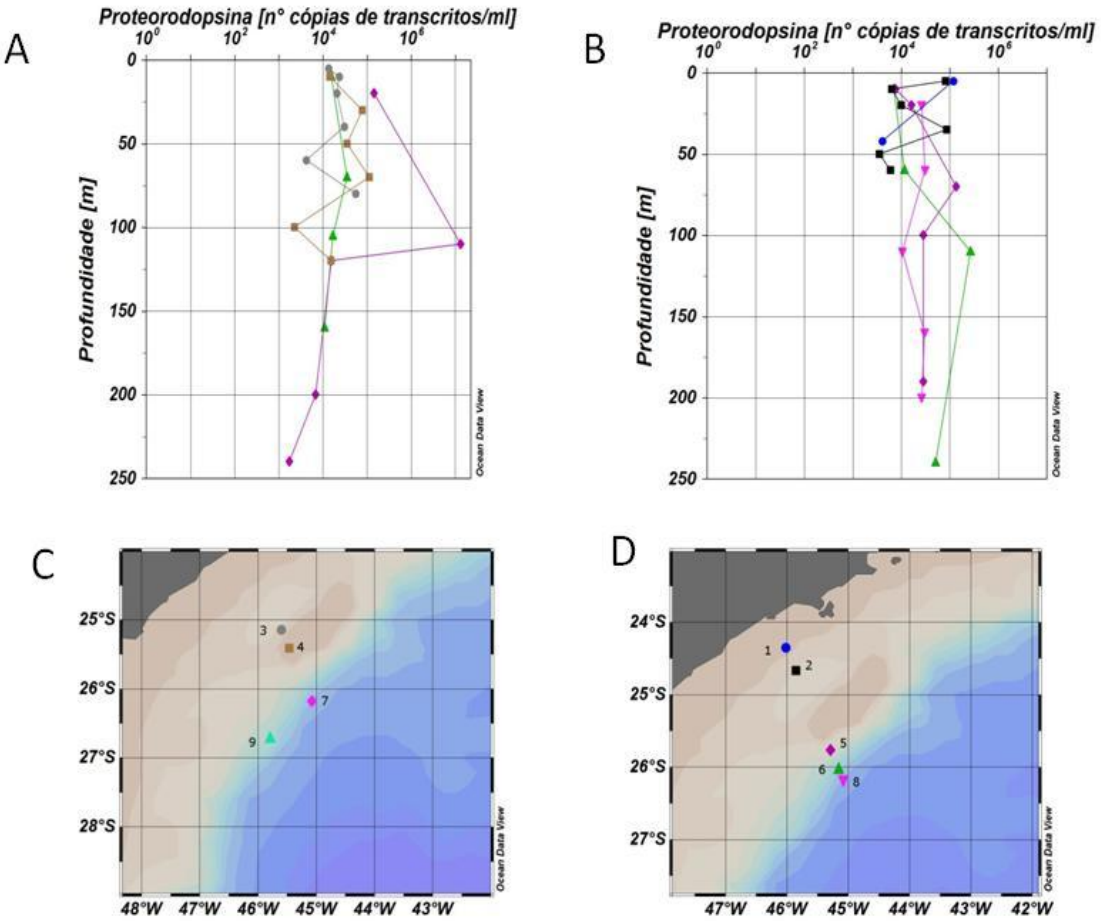

Figura 23. Perfil de expressão gênica da enzima proteorodopsina durante o dia (A), rubisco durante a noite (B), (C e D) mapa com as estações amostradas em cada período.

4.7.2.8. Análise Estatística

Os resultados dos dados de expressão gênica dos períodos diurno e noturno obtidos pela técnica de qPCR foram analisados estatisticamente e são apresentados a seguir.

De acordo com a correlação de *Spearman,* os dados de expressão gênica de rubisco e de proteorodopsina coletados tanto durante dia quanto a noite não tiveram correlação com os parâmetros físico–químicos. Os postos de correlação de *Spearman* podem ser visualizados na Tabela 11, Apêndice.

5. DISCUSSÃO

5.1. Variáveis físico–químicas e elementos nutrientes

As características termohalinas da Plataforma Continental Sudeste (PCSE) e a área oceânica adjacente apresentam variações sazonais (Braga & Niencheski, 2006). Um mecanismo que contribui para estas alterações são os ventos predominantes de NE e E no verão. Os ventos favorecem a penetração da Água Central do Atlântico Sul (ACAS) sobre a plataforma continental e o desenvolvimento de uma termoclina sazonal (Castro *et al.,* 2006; Braga & Niencheski, 2006). No presente estudo foi possível observar a presença da ACAS e da termoclina sazonal em todo transecto de estudo.

Além da ACAS foi possível detectar outras três massas de água: Água Costeira (AC), Água da Plataforma (AP) e Água Tropical (AT). A AC foi registrada na superfície da plataforma interna, a AT transportada pela corrente do Brasil foi detectada na superfície da plataforma externa e na área oceânica adjacente, e por fim a AP registrada na superfície da plataforma interna e média. Castro *et al.* (2006) descrevem que as massas de água presentes na PCSE são em geral resultado da mistura entre AC, AT e ACAS.

Maiores valores de fluorescência foram observados em áreas de ascensão da ACAS na plataforma interna e média (25-30m de profundidade) e de influência da AC na superfície da estação 1 (10m de profundidade), ver Figura 5. Segundo Brandini (1990), a ascensão da nutriclina associada à elevação da ACAS a profundidades inferiores a 30 m demonstra a ocorrência de um evento de ressurgência parcial na qual o desenvolvimento do fitoplâncton é favorecido.

Na plataforma externa e área oceânica adjacente (100m de profundidade) os valores de fluorescência foram menores e corresponderam à base da zona eufótica (Figura 5-C). Brandini (1988b) verificou que os máximos subsuperficiais de clorofila próximos à quebra da plataforma estão associados a concentrações elevadas de populações fitoplanctônicas adaptadas a baixos níveis de luz. O decréscimo de fluorescência na superfície no sentido costa - oceano observado neste estudo pode estar relacionado com a diluição da AC

pela AT, também confirmado em outro estudo (Aidar *et al.,* 1993), ver Figura 5-C.

Os nutrientes quando disponíveis na zona eufótica apresentam comportamento não conservativo estando ligados a atividades biológicas (produção primária e decomposição – regeneração) e muitas vezes limitam à produção primária (Braga & Niencheski, 2006). De acordo com Libes (2009), a baixa concentração de nutrientes e de carbono inorgânico na superfície das águas reflete o consumo eficiente dos mesmos pelo plâncton (Figuras 7, 9 e 11).

De acordo com Zerh & Kudela (2011), o nitrogênio orgânico dissolvido é mais abundante na superfície dos oceanos, como de fato foi observado neste estudo. Na superfície da plataforma continental e do oceano a partir de 300 km da costa observa-se uma concentração maior de NOD que diminui com o aumento da profundidade (Figura 9-A). No entanto há núcleos com valores elevados em 100m e abaixo de, 250m de profundidade. Isto porque águas profundas, como a ACAS, com baixa concentração de NOD, mas com altas concentrações de NID, aumentam a produção de NOD na superfície (Charria *et al.,* 2008).

O primeiro produto de decomposição de matéria orgânica com compostos orgânicos nitrogenados (aminoácidos e nucleotídeos) é o amônio (Baker *et al.*, 2009). O amonio é uma fonte primária de nitrogênio para fixação do carbono por organismos fotoautotróficos, uma vez que a redução do amônio em nitrogênio é energeticamente mais barata. Portanto, baixas concentrações de amônio são consequência da facilidade de assimilação por organismos autotróficos e heterotróficos como fonte de N (Zerh *et al.,* 2011), o que explica as baixas concentrações de amônio na plataforma média, externa e na área oceânica adjacente (Figura 9-B).

A segunda forma de fácil absorção do nitrogênio por micro-organismos é o nitrito (Zerh *et al.,* 2011). A concentração de nitrito normalmente é baixa, como encontrado neste estudo, pois está associado a processos biológicos e químicos, como nitrificação (processo óxico, converte nitrito em nitrato) e denitrificação (processo anóxico, converte nitrato em nitrito e nitrito em óxido

nitroso) (Braga *et al.,* 2006). O padrão de distribuição do nitrito é semelhante ao do nitrato na plataforma continental, com valores elevados em maiores profundidades (Figura 9-C e D).

A forma de maior custo de absorção para os micro-organismos é o nitrato (Zerh *et al.,* 2011). Valores elevados de nitrato foram registrados nas camadas de fundo dominadas pela ACAS, fria e rica em nutrientes (Figura 9-D). Na superfície de todo o transecto foi detectado baixos valores de nitrato, o mesmo resultado obtido por outros autores (Braga *et al.,* 2006; Aidar *et al.,* 1993). Nas estações de plataforma externa e área oceânica adjacente os valores de nitrato aumentam logo abaixo da termoclina. Libes (2009) descreve que valores de nitrato no Atlântico aumentam abaixo da zona eufótica. O nitrato é uma forma estável do nitrogênio inorgânico, mas geralmente não está disponível para a maioria do fitoplâncton, porque é rapidamente consumido em águas superficiais. No entanto, em regiões de ressurgência formas oxidadas de nitrogênio, principalmente nitrato, pode ser dominantemente biodisponível (Zerh *et al.,* 2011).

Quanto ao nutriente silicato foram observadas altas concentrações no fundo das estações de plataforma interna e média, Figura 11-B. Também, comprovando a presença da ACAS com maior concentração de silicato (Braga & Niencheski, 2006). No restante das estações os valores de silicato na profundidade de 100m são baixos e aumentam com o aumento da profundidade, possivelmente pelo consumo de silicato para a produção primária na camada subsuperficial de clorofila da plataforma externa e área oceânica adjacente.

Em grande parte dos oceanos globais fósforo é uma das principais limitações encontradas para a produção primária, principalmente na porção central do Atlântico (Moore *et al.,* 2013). O fósforo é um elemento estrutural do DNA e do RNA e transmissor de energia química, através da molécula ATP, entre outras funções fisiológicas (Paytan & Mclaughlin, 2007). Concentrações de fosfato > 1 µM, registradas na estação 1 estão associadas a ACAS (Braga *et al.,* 2006). No restante das estações os valores de fosfato são <1 µM até 150m de profundidade (Figura 11-A), estão associadas ao intenso consumo na

superfície e na camada subsuperficial de clorofila que termina na profundidade de 150m.

Em relação ao carbono orgânico dissolvido, os valores obtidos no transceto (0,70 a 1,6150mg.L^{-1}) foram similares ao estudo de Alves *et al.* (2014) na Bacia de Campos (1,20 a 1,50mg.L^{-1}), com valores maiores na superfície decrescendo com o aumento da profundidade, ver Figura 7.

5.2. Abundância de Fotoautótrofos e de Bactérias Heterotróficas

O gênero *Prochlorococcus* é um dos fotoautótrofos mais abundantes (10^5 cel.ml^{-1}) nos oceanos tropicais e subtropicais oligotróficos entre latitudes de 40°N e 40°S (Rush, 2010; Partensky *et al.,* 1999). E é responsável por 21-43% da biomassa fotossintética contida nos oceanos oligotróficos (Johnson *et al.,* 2006), gerando um impacto substancial sobre os ecossistemas marinhos e nos ciclos bioquímicos globais.

Neste estudo, o valor médio de células foi duas ordens de grandeza inferior (10^3 cel./ml). Isto pode ser explicado pela fluorescência da clorofila de *Prochlorococcus spp.* ser baixa perto da superfície dificultando a sua detecção. Na superfície, concentração intracelular de pigmentos fotossintéticos das células de *Prochlorococcus* é menor, podendo levar a subestimatição de concentrações de células por citômetros de fluxo (Partensky *et al.,* 1999).

Uma das razões para seu sucesso ecológico é a ocorrência de várias espécies ou ecotipos ao longo de um gradiente vertical de luz. Existem espécies ou ecotipos adaptados à elevada intensidade luminosa com baixa concentração intracelular de clorofila, distribuídos perto da superfície, e outros adaptados a baixa luminosidade, geralmente mais abundantes nas águas mais profundas perto da nutriclina com alta concentração intracelular de clorofila (Moore *et al.,*1998; West *et al.,* 2001). Partensky *et al.* (1999) descreveram três tipos de distribuição vertical de *Prochlorococcus spp.*: i) em águas perto da costa e restrito a camada de mistura; ii) alta abundância de células 10^5 cel.ml^{-1} perto da zona eufótica (base da nutriclina) e menor concentração na superfície no oceano; e iii) distribuição desde a superfície até ao fundo da zona eufótica em concentrações quase constantes na ordem de $1x10^5$ e $3x10^5$ cel.ml^{-1}. Neste

estudo, sugere-se a presença do segundo ecotipo, denominado de eNATL2A (Johnson *et al.,* 2006). Estes autores, ainda descrevem que o ecotipo eNATL2A possui distribuição predominante em isotermas de 15 a 23°C, semelhante ao registrado neste estudo entre a AP e a ACAS (Figura 13). No entanto, para confirmar a presença deste ecotipo ou de outros é necessário o sequenciamento genético das amostras.

A correlação positiva entre *Prochlorococcus spp.* e o nitrogênio orgânico dissolvido total e negativa com o amônio, possivelmente devido ao alto consumo de amônio como fonte de N. A baixa concentração de amônio na plataforma média, externa e área oceânica adjacente evidenciam o consumo desta fonte de nitrogênio (Figuras 22 e 9-B). Moore e seus colegas (2002) indicaram que cepas de *Prochlorococcus* isoladas de águas pobres em nutrientes de regiões oceânicas não são capazes de utilizar nitrito e nitrato, recorrendo a formas reduzidas do nitrogênio.

Além disso, *Prochlorococcus spp*. pode utilizar aminoácidos (formas dissolvidas) como fonte de nitrogênio, via heterotrofia parcial. Isso exerce uma competição com bactérias heterotróficas por nitrogênio orgânico forçando-as a consumir nitrogênio inorgânico com maior gasto energético (Zubkov *et al.,* 2004). Isto poderia explicar a relação de *Prochlorococcus spp*. com nitrogênio orgânico dissolvido (Figura 22).

A correlação negativa entre *Prochlorococcus spp* e *Synechococcus spp.* também foi registrada em outros trabalhos no oceano Atlântico (Olson *et al.,* 1990; Johnson *et al.,* 2006). Segundo Johnson *et al.* (2006) a correlação negativa implica que quando há níveis altos de nutrientes a abundância de *Synechococcus spp*. é maior e tende a limitar o desenvolvimento de *Prochlorococcus spp,* ver Figura 22.

Synechococcus spp. é mais abundante (10^5 cel.ml^{-1}) em regiões costeiras (Wang *et al.,* 2011) do que em regiões oceânicas oligotróficas. Neste estudo a abundância média de *Synechococcus spp.* (10^3 cel.ml^{-1}) foi inferior à descrita por Wang *et al.* (2011), mas com maior abundância em regiões costeiras.

A abundância de *Synechococcus spp.* normalmente não é afetada pela ressurgência sazonal, no entanto esta pode ocorrer devido ao transporte de Ekman (Paerl *et al.,* 2012). O transporte de Ekman remove a água da superfície do mar pela ação dos ventos que em seguida é substituída pela água do fundo, contendo menos células de *Synechococcus spp*. Além deste efeito de diluição, água ressurgida é mais fria e rica em nutrientes (principalmente metais traços), ambos capazes de diminuir a abundância de *Synechococcus spp.* (Paerl *et al.,* 2012), ver Figura 14. Temperatura baixa é um fator de inibição ao crescimento de *Synechococcus spp.* (Brand *et al.,* 1986). Em geral, cianobactérias são mais competitivas com outros representantes do fitoplâncton em águas com temperaturas elevadas (Reynolds, 2006).

A temperatura foi um fator importante na distribuição de *Synechococcus spp*, ver Figura 22. Alguns autores (Chiang *et al.,* 2002; Chang *et al.,*1996; Tsai *et al.,* 2005; Tsai, *et al.*, 2008) sugerem que a abundância de *Synechococcus spp.* na costa subtropical oeste do oceano Pacífico pode estar relacionada com a sazonalidade da temperatura da água. No inverno o crescimento de *Synechococcus spp.* é limitado pela baixa temperatura e no verão favorecido por maiores temperaturas (Tsai *et al.,* 2008). Neste estudo, a correlação positiva entre *Synechococcus spp.* e a temperatura e ficou restrito a águas superficiais quentes (AP e AC) com limite inferior próximo a nutriclina, a ACAS (T > 20°C) e salinidade entre 35 e 3,5 psu. Murrell & Lores (2004) observaram que grupos de Synechococcus ricos em ficocianina (PC) são abundantes em águas menos salinas.

Águas superficiais mais quentes com menor concentração de nutrientes dissolvidos. A correlação negativa de *Synechococcus spp.* e nanoplâncton com nutrientes, execto amônio, também foi evidenciada em outros estudos (Qiu *et al.,* 2010; Zhang *et al.,* 2013; Wafar *et al.,* 2004). Estes trabalhos sugerem que *Synechococcus spp.* e nanoplâncton absorvem o amônio para a fixação de carbono e crescimento celular (Zehr & Kudela., 2011), por ser uma fonte primária de nitrogênio de menor custo (Zehr & Kudela., 2011).

Além disso, *Synechococcus spp*., picoplâncton eucarioto e nanoplâncton apresentaram correlação positiva com o carbono orgânico dissolvido (COD). Valores elevados de abundância de *Synechococcus spp*. e picoplâncton eucarioto e de concentração de COD foram registrados na superfície da plataforma continental (Figuras 14, 15 e 16). Isto pode ser explicado pela produção do COD nos oceanos provir de vários processos: (i) produção primária na zona fótica (Myklestad, 2000); (ii) excreção direta de células vivas (Sharp, 1977); (iii) pastagem pelo zooplâncton (Møller *et al.,* 2003); (iv) lise celular devido a infecção viral (Wilhelm & Suttle, 1999); (v) senescência celular (Myklestad, 2000).

A maior abundância de *Synecochoccus spp.,* picoplâncton e nanoplâncton eucarioto na região costeira também foi evidenciada no estudo de Wang e colaboradores (2010). A abundância de picoplâncton eucarioto de $4x10^4$ cel.ml^{-1} na plataforma continental foi semelhante à encontrada no trabalho de Kirkham *et al.* (2013) de $3,9x10^4$ cel.ml^{-1} ao longo de um transecto entre os oceanos Atlântico e Ártico. O valor médio de 3.571 cel.ml^{-1} foi inferior ao encontrado no oceano Pacífico de 29.300 cel.ml^{-1} (Wang *et al.,* 2010).

A correlação positiva entre picoplâncton eucarioto com a salinidade e a temperatura, com distribuição em amostras de salinidade inferior a 36 psu, principalmente em superfície associado à AC, e abaixo de 50m de profundidade com intervalo de temperatura de 17 e 20°C, característico da ACAS, o que pode ser observado nas Figuras 22, 15 e 5-A e B. Com maior abundância nos pontos coletados na água Central do Atlântico Sul, rica em nutrientes (principalmente nitrato e fosfato) (Worden & Not, 2008) e decréscimo do número de células abaixo da camada subsuperficial de clorofila (Kirkham *et al,* 2013). A maior abudância de picoplâncton eucarioto na ACAS pode ser explicada pela correlação inversa com nitrato e fostato, ou seja, picoplâncton eucarioto está possivelmente utilzando estes nutrientes para o crescimento celular. A temperatura ideal de ocorrência foi entre 17 e 20°C, ao contrário dos estudos de Pan *et al.* (2007) que foi acima de 25°C.

A abundância máxima de nanoplâncton eucarioto (9.000 cel.ml^{-1}) observada na plataforma continental interna foi alta se comparada ao obtido na na costa do mar de Beaufort ao norte do Canadá (2.901 cel.ml^{-1}) e baixa em

relação ao obtido no oceano Pacífico (57.000 cel.ml^{-1}) (Schloss *et al.,* 2008; Wang *et al.,* 2010).

Pan *et al.* (2007) também observaram maior distribuição de nanoplâncton e picoplâncton eucarioto próximo a costa (Wang et. al., 2010) e em temperaturas mais elevadas. Maiores concentrações de células de nanoplâncton eucarioto estiveram distribuídas na superfície, como registrado por Schloss e colaboradores (2008), da plataforma interna sobre influência da AC que é mais quente. Pan e seus colegas (2007) também registram elevada abundância de nanoplâncton eucarioto em águas quentes. Contudo, núcleos de distribuição, na plataforma média e externa com temperaturas características da ACAS também foram detectados. Várias espécies de nanoplâncton e picoplâncton eucarioto são capazes de crescer sob baixa temperatura e condições de maior disponibilidade de nutrientes (principalmente nitrato e fosfato) (Romari & Voult, 2004; Worden, 2006).

A abundância de bactérias heterotróficas de 8,10x10^{4} a 2,11x10^{6} cel.ml^{-1} foi similar à encontrada no oceano Pacífico, com valores entre 4.99x10^{4} cel.ml^{-1} e 3.81x10^{6} cel.ml^{-1} (Wang *et al.,* 2010). O valor médio de abundância de 7.4x10^{5} cel.ml^{-1} deste estudo foi próximo ao encontrado por Alves *et al.* (2014) de 8.9x10^{5} cel.ml^{-1} no oceano Atlântico (Bacia de Campos).Similar a outros estudos, maior abundância de bactérias heterotróficas na superfície e próximo à costa, diminuindo com o aumento da profundidade foi registrado neste trabalho (Wang *et al.,* 2010; Alves *et al.,* 2014), mais especificamente sobre a massa de água costeira e de plataforma.

A menor abundância de bactérias heterotróficas na região oceânica, pode ser explicada pela influência da maior penetração da radição ultravioleta (280-400 nm) na coluna de água danificando o DNA, RNA, as proteinas e lipídeos das células (fotoinibição). Que difere da região costeira, onde há mais matéria orgânica particulada distribuída na coluna de água dificultando a penetração da radição ultravioleta (Häder, *et al.*, 2011; Ruiz-González, *et al.*, 2013). Além da fotoinibição, a junção de fatores como competição, pastagem, ataque por vírus, disponiblidade de matéria orgânica e nutrientes, temperatura e correntes também podem influenciar na abundância e distribuição das bactérias heterotróficas em regiões oceânicas (Ruiz-González*, et al.*, 2013).

Picoplâncton eucarioto e bactérias heterotróficas tiveram correlação inversa, ver Figura 22. Uma razão para isto é que as bactérias heterotróficas competem com o picoplâncton eucarioto por nutrientes orgânicos e/ou inorgânicos, tais como o nitrato e fosfato (Wang *et al.,* 2010; Drakare, 2002), o que pode estar ligado ao fato de nitrato, nitrito e fosfato terem correlação positiva com bactérias heterotróficas (Wang *et al.,* 2010). Células pequenas, tais como as de bactérias heterotróficas e de picoplâncton eucarioto geralmente absorvem preferencialmente amônio ou aminoácidos, do que nitrito e nitrato, pois estes são energeticamente mais baratos (Zehr & Kudela, 2011). No entanto quando há maior disponibilidade de nitrato, como observado neste estudo em consequência da ressurgência costeira, a utilização de nitrato como fonte de nitrogênio por bactérias heterotróficas aumenta (Kirchman & Wheeler, 1998; Allen *et al.,* 2002). Isto porque mesmo com baixa taxa de absorção celular, o nitrato absorvido será suficiente para suprir as necessidades bacterianas (Allen *et al.,* 2002; Kirchman & Wheeler, 1998). Bactérias heterotróficas absorveram de 4 a 14% do nitrato durante um *bloom* de primavera no oceano Atlântico norte e assimilaram de 5 a 60% de nitrato no Pacífico (altas concentrações de nitrato entre 6 to 20 µM) (Kirchman, 1994 e Kirchman & Wheeler, 1998).

A correlação positiva entre bactérias heterotróficas e fosfato pode indicar um consumo deste nutriente. De acordo com Longnecker *et al.* (2010), bactérias heterotróficas são os principais consumidores de fosfato nas águas superficiais da região central do oceano Atlântico norte, sendo a maior parte usada para a síntese de RNA, DNA associados com o crescimento celular.

5.3. Biomassa Picoplânctonica

A maior biomassa da comunidade picoplanctônica tanto autotrófica como heterotrófica foram registrados nas estações costeiras, evidenciando o aporte de nutrientes pelo afloramento da ACAS, (Figura 18).

A comparação entre os dados obtidos neste estudo com da costa da China indica que o valor médio de biomassa de bactérias heterotrófica de 14,8 $\mu gC.L^{-1}$ foi baixo (28,2 $\mu gC.L^{-1}$), mas os valores médios de *Synechococcus*

spp.de 38,64 µgC.L^{-1} e picoplâncton eucarioto de 92,50 µgC.L^{-1} foram elevados (1,36 µgC.L^{-1} e 44 µgC.L^{-1} respectivamente) (Wang *et al.,* 2010).

Buitenhuis *et al.* (2012) estimaram a biomassa do picoplâncton autotrófico tanto procarioto quando eucarioto e obtiveram valores médios de 13±23 µgC.L^{-1} para regiões temperadas no hemisfério Sul; 15±24 µgC.L^{-1} nos trópicos e 12±22 µgC.L^{-1} em regiões temperadas do hemisfério norte. Somente a biomassa média do picoplâncton autotrófico eucarioto registrado neste estudo (92,5 µgC.L^{-1}) foi muito superior.

A maior contribuição de biomassa de carbono foi de picoplâncton eucarioto principalmente nas estações mais próximas a costa (Pan *et al.,* 2007), seguida por *Synechococcus spp*., como já descrito por outros autores (Wang *et al.,* 2010; Buitenhuis *et al.,* 2012), ver Figura 20. No entanto *Prochlorococcus spp*. não foi o maior responsável pela biomassa picoplanctônica em águas oligotróficas, como era de se esperar (Zubkov *et al.,* 1998; Pan, *et al.,* 2007) e sim o picoplâncton eucarioto que aparentemente demonstrou ser mais competitivo ecologicamente. No entanto, é importante ressaltar que a baixa fluorescência dos pigmentos fotossintéticos de *Prochlorococcus spp*. pode subestimar sua abundância em ambientes marinhos, quando quantificado por citômetros de fluxo (Partensky *et al.,* 1999).

5.4. Abundância dos domínios Archaea e Bacteria e do clado Sar11

A abundância de Archaea (1,00x10^{0} a 3,00x10^{3} cel.ml^{-1}), Bacteria (3,00x10^{1} a 3,00x10^{4} cel.ml^{-1}) e Sar11 (7,00x10^{0} a 3,00x10^{4} cel.ml^{-1}) foi baixa quando comparada a outros trabalhos, que relataram 10^{4} a 10^{7}, 10^{4} a 10^{8} e 10^{3} a 10^{5} cel.ml^{-1} respectivamente (Beman *et al.,* 2011; Swan *et al.,* 2010; Schippers & Neretin, 2006; Sjostedt *et al.,* 2014; Eiler, *et al.,* 2009), ver Tabela 9, Apêndice.

Provavelmente foi a insuficiente quantificação do DNA na reação de PCR em tempo real, devido à baixa concentração de DNA genômico nas amostras. A possível perda de DNA genômico no momento de lavagem com etanol e/ou eluição do DNA durante o processo de extração ou mesmo a degradação do DNA durante o armazenamento, pode ter contribuído para o

baixo número de cópias de 16S rRNA quantificados neste estudo (Bostrom *et al.,* 2004; Teske & Sorensen, 2008). O uso de um coprecipitante durante a etapa de lavagem com etanol possivelmente teria evitado a perda de DNA em uma escala de 6 vezes (Bostrom *et al.,* 2004, Wang *et al.,* 2002). Por esse motivo, a discussão em relação aos resultados de 16S rRNA será baseado na distribuição dos grupos e suas relações com os parâmetros ambientais.

A temperatura foi um fator limitante de distribuição no domínio Bacteria, com abundância maior nas amostras superficiais sujeitas a AT com temperaturas superiores a 20°C do que em águas mais frias, ver Figuras 23 e 5-B. A correlação positiva com a temperatura e o COD podem ser facilmente interpretados, pois em maiores temperaturas o potencial de metabólico de crescimento de micro-organismos é maior e possivelmente mais carbono pode ser fixado por fotoautotróficos ou o carbono orgânico dissolvido pode ser degradado (respiração) por heterotróficos (Figura 26). Ao contrário do que ocorre em temperaturas menores, a taxa metabólica de crescimento é menor, e consequentemente a fixação ou degradação do carbono é menor, podendo parte da matéria orgânica produzida na zona eufótica ser exportada para zona afótica sem ser degradada (Laws *et al.,* 2000).

A degradação (respiração) do carbono orgânico dissolvido por representantes heterotróficos do domínio Bacteria vem sendo bastante discutida (Azam, 1998; Zweifel, *et al.,* 1998, McCarren *et al.,* 2010; Arnosti *et al.,* 2011). A produção de biomassa de carbono por fotoautotróficos, principalmente *Synechococcus spp*., *Prochlorococcus spp* e picoplâncton eucarioto em ambientes marinhos, é elevada em relação a outros micro-organismos). E a degradação dessa matéria orgânica por micro-organismos heterotróficos por diferentes vias metabólicas é crucial para o equilíbrio biogeoquímico do carbono nos oceanos.

A correlação positiva do domínio Bacteria com o amônio pode ser pelo fato de o amônio ser o primeiro produto de degradação da matéria orgânica nitrogenada (Zehr & Kudela, 2011).

Dentre o domínio Bactéria, os micro-organismos heterotróficos mais representativos nos oceanos são membros do clado Sar11. Neste trabalho, a

distribuição deste clado preferencialmente na superfície da plataforma externa e área oceânica adjacente em relação aos outros pontos de coleta (Figura 25). Indica que Sar11 está aparentemente mais adaptado às condições oligotróficas típicas de regiões oceânicas, não respondendo prontamente a dinâmica dos fotoautróficos (Lefort & Gasol, 2013; Giebel *et al.,* 2011; Morris *et al.,* 2002).

Abundâncias elevadas de Sar11 foram evidenciadas nas massas de águas superficiais mais quentes: AT (salinidade > 36,2 psu, temperatura >20°C) e na AP (salinidade 35-36 psu, temperatura >20°C), ver Figuras 25, 5A e 5B. A importância da temperatura, da salinidade e da clorofila na distribuição de Sar11 em ambientes costeiros e oceânicos foi estudada por outros autores (Lefort & Gasol, 2013; Herlemann *et al.,* 2014). E estes observaram que Sar11 tem preferência por maior temperatura e salinidades entre 35 e 37 psu, assim como registrado neste trabalho.

Possivelmente um segundo ecótipo de Sar11 foi registrado na quebra da plataforma continental sobre a ACAS, mais fria e rica em nutrientes (salinidade 35.9 -34.6 psu, temperatura 6 - 20°C), o que pode ser observado na Figura 25. De fato, Vergin e seus colegas (2013) constataram vários ecótipos do clado Sar11 distribuídos em diferentes nichos ao longo da coluna de água, mais próximos à superfície e em diferentes profundidades da zona eufótica. Além disso, com padrão de distribuição altamente correlacionado com a estrutura da comunidade planctônica (Gilbert *et al.,* 2012).

O domínio Archaea é importante no fluxo biogeoquímico do carbono nos oceanos. A baixa densidade na superfície e o respectivo aumento com o aumento da profundidade está bem discutida (Karner *et al.,* 2001; Madigan *et al.,* 2012). Sendo que, três filos planctônicos são abundantes no ambiente marinho, dois tendem a ser mais relacionados a águas profundas, abaixo de 100m (Crenarchaea e Thaumarchaeota), como registrado neste estudo, e o outro a águas mais superficiais, acima de 100m (Euryarchaea) (Ramon-Massana *et al.,* 1997; DeLong, 2007; Hu *et al.,* 2013).

Representantes do domínio Archaea concetraram-se na ACAS sobre a plataforma externa e região oceânica adjacente, rica em nitrato, ver Figuras 24. Amano-Sato *et al.* (2013), encontraram correlação negativa entre o domínio

Archaea com o amônio e o nitrato, ao contrário do observado neste estudo, ou seja correlação positiva entre o domínio Archaea e o nitrato (Figura 26).

5.5. Expressão Gênica de Rubisco e Proteorodopsina

Indicadores moleculares têm sido aplicados para estudar a fixação de carbono e a degradação da matéria orgânica em ambientes marinhos, detectando a transcrição (expressão) e o número de cópias dos genes (Xu & Tabita, 1996; John *et al.,* 2007b; John *et al.,* 2011; Paerl *et al.,* 2012). Para estudar a fixação de carbono e a degradação da matéria orgânica foi avaliada a transcrição da enzima rubisco presente em Synechococcus e da enzima proteorodopsina do claro Sar11.

Valores de expressão gênica de rubisco (rbcl) obtidos tanto de noite quanto de dia de 10^0 a 10^3 n°cópias de transcritos.ml^{-1} foram similares aos obtidos no lago Bonney, na Antártica (10^1 a 10^3 cópias de transcritos.ml^{-1}) e baixo quando comparados aos da pluma do rio Mississipi no Golfo do México (10^4 a 10^5 n°cópias de transcritos.ml^{-1}) (Kong *et al.,* 2012; John *et al.,* 2007b), ver Tabela 9, Apêndice. Também se observou maiores valores de expressão gênica a partir da meia noite, ver Figuras 28-A e 28-B. Estudos mostram que a expressão do rubisco varia durante o dia no oceano, com picos durante a madrugada (John *et al.,* 2007a; Pichard *et al*., 1996; Paul *et al.,* 1999), quando ocorre a síntese da enzima rubisco que é armazenada inativa até o período diurno para utilização nos cloroplastos (Paul *et al.,* 1999).

Os valores de transcrição de rusbisco foram baixos quando comparados aos de proteorodopsina, ver Figuras 28-A, 28-B, 29-A e 29-B . Assim, como a rubisco, muitos micro-organismos contém a enzima proteorodopsina (Venter *et al.,* 2004;. Sabehi *et al.,* 2005; Campbell *et al.,* 2008). A proteorodopsina é altamente expressa no ambiente marinho, com maior transcrição que a rubisco (Frias-Lopez *et al.,* 2008).

A transcrição média do gene proteorodopsina do clado Sar11 de $3{,}5 \times 10^5$ n°cópias de transcritos.ml^{-1}, nas estações coletadas tanto de dia ou de noite, foi próxima ao registrado em águas costeiras ao norte do oceano

Atlântico de 0,5 a 2,5 x10^4 n°cópias de transcritos.ml^{-1} (Lami *et al.,* 2009), ver Tabela 9, Apêndice.

Os valores de transcritos dos dois genes funcionais não evidenciaram correlação com nutrientes e parâmetros físico–químicos, assim como descrito em outros estudos (Paerl *et al.,* 2012; Campbell *et al*., 2008).

Campbell *et al.* (2008), sugerem que a baixa concentração de nutrientes poderia selecionar bactérias heterotróficas contendo o gene proteorodopsina, devido ao fato de que a energia extra adquirida pela bomba de ATP gerada pela enzima proteorodopsina auxiliaria na assimilação de fosfato e nitrato quando disponíveis em baixas concentrações. Isto explicaria os valores de expressão gênica na superfície preenchida pelas massas de água AC, AT e AP, pobre em nutrientes. No entanto neste estudo os valores de transcritos de proteorodopsina obtidos na região ocupada pela ACAS, rica em nutrientes, no fundo não foram inferiores aos da superfície.

É necessário avaliar outros genes de proteorodopsina relacionados a outros espectros de absorção da luz (ex. 530 nm) e rubisco levando-se em consideração a sazonalidade do Atlântico Sul, para entender suas relações com os nutrientes e melhor compreender o ciclo do carbono.

6. CONCLUSÕES

A combinação da técnica de citometria de fluxo e de PCR em tempo real possibilitou gerar informações inovadoras sobre a abundância e os padrões de distribuição de micro-organismos autotróficos e heterotróficos durante o afloramento da ACAS na Plataforma Continental Sudeste:

- Os resultados indicam que os micro-organismos foram distribuídos de acordo com as características físicas e a disponibilidade de nutrientes de cada massa de água: a cianobacteria *Prochlorococcus spp.*, o domínio Archeae e o clado Sar11 exibiram distribuição preferencial na massa de Àgua Central do Atlântico Sul enquanto que, a cianobacteria *Synechococcus spp.*, o nanoplâncton e o picoplâncton eucarioto, e as bactérias heterotróficas nas massas de Àgua Costeira e de Plataforma.
- A cianobacteria *Prochlorococcus spp.*, e o segundo clado de Sar11 são possivelmente ecotipos adaptados a menor índice de luminosidade.
- O restante dos autotróficos, a cianobacteria *Synechococcus spp.*, o nanoplâncton e o picoplâncton eucarioto são característicos de regiões costeiras.
- Bactéria heterotrófica foi abundante na região costeira provavelmente devido a maior disponibilidade de matéria orgânica, o que corrobora com o resultado encontrado de maior biomassa de carbono próximo a costa.
- A expressão dos genes, rubisco de *Synechococcus spp. e* proteorodopsina de Sar11, não teve relação com parâmentros ambientais.

Para confirmar o acréscimo e o comportamento de micro-organismos autotróficos e heterotróficos na PCSE durante a intrusão da ACAS, sugere-se a realização de um estudo sazonal. E em relação aos genes envolvidos no ciclo do carbono ou outros ciclos biogeoquímicos, recomenda-se o emprego da técnica de metatranscriptoma, que possa avaliar a expressão gênica de toda a comunidade microbiana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDAR, E.; GAETA, S. A; GIANESELLA-GALVAO, S. M. F.; KUTNER, M. B. B; TEIXEIRA, C. 1993. Ecossistema costeiro subtropical: nutrientes dissolvidos, fitoplancton e clorofila-a e suas relações com as condições oceanográficas na região de Ubatuba, SP. **Publ Esp. Inst. Oceanog**, v. 10, p. 9-43.

ALONSO, C.; PERNTHALER, J. 2006. Roseobacter and SAR11 dominate microbial glucose uptake in coastal North Sea waters. **Environ Microbiol**, v. 8, p. 2022–2030.

ALVES, N.; MEIRELLES, P. M.; SANTOS, E. O.; DUTILH, B.; SILVA, G. Z.; PARANHOS, R.; CABRAL, A. S.; REZENDE, C.; LIDA, T.; MOURA, R. L.; KRUGER, R. H.; PEREIRA, R. C.; VALLE, R.; SAWABE, T.; THOMPSON, C; THOMPSON, F. 2014. Microbial community diversity and physical–chemical features of the Southwestern Atlantic Ocean. **Arch Microbiol**.

AMANO-SATO, C.; AKIYAMA, S.; UCHIDA, M.; SHIMADA, K.; UTSUMI, M. 2013. Archaeal distribution and abundance in water masses of the Arctic Ocean, Pacific sector. **Aquat Microb Ecol**, v. 69, p. 101–112.

ANDRADE, L.; GONZALEZ, A. M.; ARAUJO, F. V.; PARANHOS, R. 2003. Flow cytometry assessment of bacterioplankton in tropical marine environments. J **Micro Met,** v. 55, p. 841–850.

ANDRADE, L.; GONZALEZ, A. M.; REZENDE, C. E.; SUZUKI, M.; VALENTIN, J. L.; PARANHOS, R. 2007. Distribution of HNA and LNA bacterial groups in the Southwest Atlantic Ocean. **Braz J Microbiol**, v. 38, p. 330-336.

ARNOSTI, C.; STEEN, A. D.; ZIERVOGEL, S. K.; GHOBRIAL, S.; JEFFREY, W. H. 2011. Latitudinal gradients in degradation of marine dissolved organic carbon. **Plos One,** v. 6.

ATKINSON, L. P. 1977. Modes of Gulf Stream intrusion into the South Atlantic Bight shelf waters. **Geophys Res Lett**, v. 4, p. 583-586.

AZAM, F. 1998 Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens. **Science,** v. 280, p. 694–696.

AZAM, F.; MALFATTI, F. 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. **Nat Rev Microbiol,** v. 5, p. 782–791.

AZAM, F.; WORDEN, A. Z. 2004. Oceanography: microbes, molecules and marine ecosystems. **Science,** v. 303, p. 1622–1624.

BARLOW, R.G.; AIKEN, J.; HOLLIGAN, P.M.; CUMMINGS,D.G.; MARITORENA, S.; HOOKER, S. 2002. Phytoplankton pigment and absorption characteristics along zmeridional transects in the Atlantic Ocean. **Deep-Sea Res I,** v. 47, p. 637–660.

BEJA, O.; SUZUKI, M. T. 2008. Photoheterotrophic Marine Prokaryotes. **In**: DAVID, L.; KIRCHMAN, D. L. (ed). Microbial Ecology of the Oceans. New York: John Wiley & Sons, p.131-157.

BEMAN, J. M.; STEELE, J. A.; FUHRMAN, J. A. 2011. Co-occurrence patterns for abundant marine archaeal and bacterial lineages in the deep chlorophyll maximum of coastal California. **ISME** J, v. 5, p. 1077–1085.

BORREL, G.; LEHOURS, A. C.; CROUZET, O.; JEZEQUEL, D.; ROCKNE, K; KULCZAK, A.; DUFFAUD, E.; JOBLIN, K.; FONTY, G. 2012. Stratification of Archaea in the Deep Sediments of a Freshwater Meromictic Lake: Vertical Shift from Methanogenic to Uncultured Archaeal Lineages. **Plos One,** v. 7.

BOSTROM, K. H; SIMU, K.; HAGSTROM, A.; RIEMANN, L. 2004 Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. **Limnol Oceanogr Methods**, v. 2, p. 365–373.

BRAGA, E. S.; NIENCHESKI, L. F. H. 2006. Composição de massa de água e seus potenciais produtivos na região entre São Tomé (RJ) e o Chuí (RS). **In**: ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. B.; MADUREIRA, L. S. P. O Ambiente oceanográfico da Plataforma Continental e do talude na região sudeste sul do Brasil. São Paulo: Editora da USP, p. 161—218.

BRAND, L. E.; SUNDA, W. G.; GUILLARD, R. R. L. 1986. Reduction of marine-phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. **J Exper Mar Biol Ecol,** v. 96, p. 225–250.

BRANDINI, F. P. 1988a. Hydrography, phytoplankton biomass and photosynthesis in shelf and oceanic waters of southeastern Brazil during autumn (May/June, 1983). **Bolm Inst Oceanogr,** São Paulo, v. 36, p. 63-72.

BRANDINI, F. P. 1988b. Composição e distribuição do fitoplâncton na região sueste do Brasil e suas relações com as massas de água (Operação sudeste-julho/ agosto 1982) **Ciência e Cultura**, v. 40, p. 334-341.

BRANDINI, F. P. 1990. Hydrography and characteristics of the phytoplankton in shelf and oceanic waters off southeastern Brazil during winter (July/August 1982) and summer (February/March 1984). **Hydrobiol**, v. 196, p. 111-148.

BRANDINI, F. P. 2006. Hidrografia e produção biológica na região sudeste-sul do Brasil, no contexto do Programa REVIZEE. **In**: ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B.; MADUREIRA, L. S. (ed). O Ambiente oceanográfico da Plataforma Continental e do Talude na Região Sudeste-Sul do Brasil. São Paulo: Editora da USP, p. 447-460.

BUITENHUIS, E. T.; LI, W. K. W.; VAULOT, D.; LOMAS, M. W.; LANDRY, M. R.; PARTENSKY, F.; KARL, D. M.; ULLOA, O.; CAMPBELL, L.; JACQUET, S.; LANTONIE, F.; CHAVEZ, F.; MACIAS, D.; GOSSELIN, M.; MCMANUS, G. B. 2012. Picophytoplankton biomass distribution in the global ocean. **Earth Syst Sci Data,** v. 4, p. 37–46.

BURONE, L.; SOUSA, S. H. M.; MAHIQUES, M. M.; VALENTE, P.; CIOTTI, A.; YAMASHITA, C. 2010. Benthic foraminiferal distribution on the southeastern Brazilian shelf and upper slope. **Mar Biol**.

CAMPBELL, B. J.; WAIDNER, L. A.; COTTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L. 2008. Abundant proteorhodopsin genes in the North Atlantic Ocean. **Environ Microbiol,** v. 10, p. 99–109.

CAMPOS, E. J. D. 1995. Estudos da circulação oceânica no Atlântico tropical e na região oeste do Atlântico subtropical sul. Tese de livre-docência. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico.

CAMPOS, E. J. D.; VELHOTE, D.; SILVEIRA, I. C. A. 2000. Shelf break upwelling driven by Brazil current cyclonic meanders. **Geophys R Lett,** v. 27, p. 751-754.

CARBONI, M. Máximos subsuperficiais de clorofila na Plataforma Continental da região Sueste do Brasil: composição específica e dinâmica sazonal. Monografia de Graduação. Universidade Federal do Paraná, 67 p.

CASTBERG, T.; LARSEN, A.; SANDAA, R. A.; BRUSSARD, C. P. D.; EGGE, J. K.; THYRHAUG, M. H. R.; VAN HANNEN, E. J.; BRATBAK, G. 2001. Microbial population dynamics and diversity during a bloom of the marine coccolithophorid Emiliania huxleyi (Haptophyta). **Mar Ecol Prog Ser**, v. 221, p. 39–46.

CASTRO, B. M. 1996. Correntes e massas de água da plataforma continental norte de São Paulo. Tese de livre-docência. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico.

CASTRO, B. M.; BRANDINI, F. P.; PIRES-VANIN, A. M. S.; MIRANDA, L. B. 2006. Multidisciplinary oceanographic processes on the Western Atlantic Continental Shelf located between 4N and 34S. **In**: ROBINSON, A. R.; BRINK, K. H. (org.). The Sea. New York: John Wiley & Sons, p. 259-293.

CASTRO, B. M.; LORENZZETTI, J. A.; SILVEIRA, I. C. A.; MIRANDA, L. B. 2006. Estrutura termohalina e circulação na região entre o Cabo de São Tomé (RJ) e o Chuí (RS). **In**: ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B.; MADUREIRA, L. S. (org). O Ambiente Oceanográfico da Plataforma Continental e do Talude na Região Sudeste-Sul do Brasil. São Paulo: Editora da USP, p. 11-120.

CASTRO, B. M.; MIRANDA, L. B. 1998. Physical oceanography of the western Atlantic continental shelf located between 4°N and 34°S – Coastal segment (4,W). **In:** ROBINSON, A. R.; BRINK, K. H. (org). The sea. New York: John Wiley & Sons, p. 209-251.

CHANG, J.; CHUNG, C. C.; GONG, G. C. 1996. Influences of cyclones on chlorophyll a concentration and Synechococcus abundance in a subtropical western Pacific coastal ecosystem. **Mar Ecol .Prog Ser**, v. 140, p. 199–205.

CHARRIA, G.; DADOU, I.; LLIDO, J.; DREVILLON, M.; GARÇON, V. 2008. Biogeosciences Importance of dissolved organic nitrogen in the north Atlantic Ocean in sustaining primary production: a 3-D modelling approach. **Biogeosciences**, v. 5, p. 1437–1455.

CHIANG, K. P.; KUO, M. C.; CHANG, J.; WANG, R. H.; GONG, G. C. 2002. Spatial and temporal variation of the Synechococcus population in the East China Sea and its contribution to phytoplankton biomass. **Cont Shelf Res**, v. 22, p. 3–13.

COCI, M.; NICOL, G. W.; PILLONI, G. N.; SCHMID, M.; KAMST-VAN, M. P.; BODELIER, P. L. E.; LAANBROEKI, H. J. 2010. Quantitative assessment of ammonia-oxidizing bacterial communities in the epiphyton of submerged macrophytes in Shallow Lakes. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, p. 1813–1821.

CONTI, L. A.; ARAUJO, C. A. S. 2009. Aspectos da distribuição de padrões de temperatura superficial da água associados à topografia da plataforma continental do estado de São Paulo através da integração de Imagens LANDSAT e Modelos Digitais de Terreno. **In:** XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Natal, 2009. Anais... Natal, INPE, 2009, p. 6431-6438.

CORTE, D.; YOKOKAWA, T.; VARELA, M. M.; AGOGUE, H.; HERNDL, G. J. 2009. Spatial distribution of Bacteria and Arqueia and amoA gene copy numbers throughout the water column of the Eastern Mediterranean Sea. **ISME J**, v. 3, p. 147–158.

COTTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L. 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, p. 5116-5122.

COTTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L. 2009. Photoheterotrophic Microbes in the Arctic Ocean in Summer and Winter. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, p. 4958–4966.

COUNTWAY, P. D.; CARON, D. 2006. Abundance and distribution of Ostreococcus sp. in the San Pedro Channel, California, as revealed by quantitative PCR. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, p. 2496–2506.

CURY, J. C.; ARAUJO, F. V.; COELHO-SOUZA, S. A.; PEIXOTO, R. S.; OLIVERIA, J. A. L.; SANTOS, H. F.; DAVILA, A. M. R.; ROSADO, A. S. 2011. Microbial diversity of a Brazilian Coastal Region influenced by an upwelling system and anthropogenic activity. **Plos One,** v. 6, p. 16553.

DELONG, E. F. 2007. Microbial domains in the ocean: a lesson from the Archaea. **Oceanogr**, v. 20, p. 16-27.

DRAKARE, S. 2002. Competition between picoplanktonic cyanobacteria and heterotrophic bacteria along crossed gradients of glucose and phosphate. **Microb Ecol**, v. 44, p. 327–335.

DUCKLOW, H. W. 2008. Microbial services: biodiversity-ecosystem function, ecosystem processes and sustainability. **Aquat Microb Ecol,** v. 53, p. 13–19.

DUCKLOW, H. W.; CARLSON, C. A. 1992. Oceanic bacterial production. Adv **Microb Ecol**, v. 12, p. 113–181.

EILER, A.; HAYAKAWA, D. H.; CHURCH, M. J.; KARL, D. M.; RAPPE, M. S. 2009. Dynamics of the SAR11 bacterioplankton lineage in relation to environmental conditions in the oligotrophic North Pacific subtropical gyre. **Environ Microbiol,** v. 11, p. 2291–2300.

EMÍLSON, I. 1961. The shelf and coastal waters off Southern Brazil. **Braz J Oceanogr,** v. 17, p. 101–112.

FENCHEL, T. 2008. The microbial loop – 25 years later. **J Exp Mar Biol Ecol**, v. 366, p. 99-103.

FEWER, D. P.; ROUHIAINEN, L.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; LAAKSO, K.; WANG, H.; SIVONEN, K. 2007. Recurrent adenylation domain replacement in the microystin synthetase gene cluster. **BMC Evol Biol,** v. 7.

FRIAS–LOPES, J.; SHI, Y.; TYSON, G. W.; COLEMAN, M. L.; SCHUESTER, S. C.; CHISSHOLM, S. W.; DELONG, E. F. 2008. Microbial community gene expression in ocean surface waters. **Proc Natl Acad Sci,** v. 105, p. 3805–3810.

GAETA, S. A.; BRANDINI, F. P. 2006. Produção primária do fitoplancton na região entre o cabo de São Tomé (RJ) e o Chuí (RS). **In**: ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B.; MADUREIRA, L. S. (ed). O Ambiente oceanográfico da Plataforma Continental e do Talude na Região Sudeste-Sul do Brasil. São Paulo: Editora da USP, p. 219-254.

GANTNER, S.; ANDERSSON, A. F.; ALONSO-SAEZ, L.; BERTILSSON, S. 2011. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. **J Microbiol Methods**, v. 84, p. 12–18.

GIEBEL, H. A.; KALHOEFER, D.; LEMKE, A.; THOLE, S.; GAHL-JANSSEN, R.; SIMON, M.; BRINKHOFF, T. 2011. Distribution of Roseobacter RCA and SAR11 lineages in the North Sea and characteristics of an abundant RCA isolate**. ISME J**, v. 5, p. 8–19.

GIESKES, W. W.; KRAAY, G. W. 1986. Floristic and physiological differences between the shallow and the deep nanophytoplankton community in the euphotic zone of the open ocean tropical Atlantic revealed by HPLC analysis of pigments**. Mar Biol,** v. 91, p. 567-576.

GILBERT, J. A.; STEELE, J. A.; CAPORASO, J .G.; STEINBRUCK, L.; REEDER, J.; TEMPERTON, B.; HUSE, S.; MCHARDY, A. C.; KNIGHT, R.; JOINT, I.; SOMERFIELD, P.; FUHRMAN, J. A.; FIELD, D. 2012. Defining seasonal marine microbial community dynamics. **ISME J**, v. 6, p. 298–308.

GLAZER, A. N.; WEDEMAYER, G. J. 1995. Cryptomonad biliproteins - an evolutionary perspective**. Photosynthesis Res**, v. 46, p. 93-105.

GONZALEZ, A. M.; PARANHOS, R.; LUTTERBACH, M. S. 2006. Heterotrophic Bacteria abundances in Rodrigo de Freitas Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil) **Braz J Microbiol**, v. 37 p. 428-433.

GROB, C.; HARTMANN, M.; ZUBKOV, M. V.; SCANLAN, D. J. 2011. Invariable biomass-specific primary production of taxonomically discrete picoeukaryote groups across the Atlantic Ocean. **Environ Microbiol**, v. 12, p. 3266–3274.

GROTE, J.; THRASH, C. J.; HUGGETT, M. J.; LANDRY, Z. C.; GIOVANNONI, S. J.; RAPPE, M. S. 2012. Streamlining and Core Genome Conservation among Highly Divergent Members of the SAR11 Clade**. Mbio J Asm**, v. 3.

HÄDER, D.-P.; HELBLING, E. W.; WILLIAMSON, C. E.; WORREST, R. C.2011. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. **Photochem Photobiol Sci,** v. 10, p. 242–260.

HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.14, p. 95-98.

HERLEMANN, D. P. R.; WOELK, J.; LABRENZ, M.; JURGENS, K. 2014. Diversity and abundance of “Pelagibacterales” (SAR11) in the Baltic Sea salinity gradient. **Systematic and Appl Microbiol**, in press.

HU, A.; YANG, Z.; YU, C. P.; JIAO, N. 2013. Dynamics of autotrophic marine planktonic Thaumarchaeota in the East China Sea. **Plos One**, v. 8.

JARDILIER, L.; ZUBKOV, M. V.; PEARMAN, J.; SCANLAN, D. J. 2010. Significant CO_2 fixation by small prymnesiophytes in the subtropical and tropical northeast Atlantic Ocean. **ISME J**, v. 4, p. 1180–1192.

JELLETT, J. F.; LI, W. K. W.; DICKIE, P. M.; BORAIE, A.; KEPKAY, P. E. 1996. Metabolic activity of bacterioplankton communities assessed by flow cytometry and single carbon substrate utilization. **Mar Ecol Prog Ser**, v. 136, p. 213-225.

JOHN, D. E.; LOPEZ-DIAZ, J. M.; CABRERA, A.; SANTIAGO, N. A.; CORREDOR, J. E.; BRONK, D. A.; PAUL, J. H. 2011. A day in the life in the dynamic marine environment: how nutrients shape diel patterns of phytoplankton photosynthesis and carbon fixation gene expression in the Mississippi and Orinoco River plumes. **Hydrobiol**, v. 679, p. 155–173.

JOHN, D. E.; PATTERSON, S. S.; PATTERSON S. S.; PAUL, J. H. 2007a. Phytoplankton-group specific quantitative polymerase chain reaction assays for RubisCO mRNA transcripts in seawater. **Mar Biotechnol,** v. 9, p. 747–759.

JOHN, D. E.; ZHOHUI, A. W.; XUEWU, L.; BYRNE, H. R.; CORREDOR, J. E.; LOPEZ, J. M.; CABRERA, A.; BRONK, D. A.; TABITA, F. R.; PAUL, J. H. 2007b. Phytoplankton carbon fixation gene (RuBisCO) transcripts and air-sea CO_2 flux in the Mississippi River plume. **ISME J**, v. 1, p. 517–531.

JOHNSON, Z. I.; ZINSER, E. R.; COE, A.; MCNULTY, N. P.; WOODWARD, E. M.; CHISHOLM, S. W. 2006. Niche partitioning among Prochlorococcus ecotypes along ocean-scale environmental gradients. **Science**, v.311, p. 1737-1739.

KAMIYA, E.; IZUMIYAMA I.; NISHIMURA, M.; MITCHELL, J. G.; KOGURE, K. 2007. Effects of fixation and storage on flow cytometric analysis of marine bacteria. **J Oceanogr**, v. 63, p. 101-112.

KARNER, M. B.; DELONG, E. F.; KARL, D. M. 2001. Archaeal dominance in the Mesopelagic zone of the Pacific Ocean. **Nature,** v. 409, p. 507–510.

KIRCHMAN, D. L. 1994. The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria. **Microb Ecol**, v. 28, p. 255-271.

KIRCHMAN, D. L., WHEELER, P.A. 1998. Uptake of ammonium and nitrate by heterotrophic bacteria and phytoplankton in the sub-Arctic Pacific. **Deep-Sea Res**, v. 45, p. 347-365.

KIRKHAM, A. R.; LEPERE, C.; JARDILLIER, L. E.; NOT, F.; BOUMAN, H.; MEAD, A.; SCANLAN, D. J. 2013. A global perspective on marine photosynthetic picoeukaryote community structure. **ISME J**, p. 1–15.

KONG, W.; REAM, D. C.; PRISCU, J. C.; MORGAN–KISS, R. M. 2012. Diversity and expression of RubisCO genes in a Perennially Ice-Covered Antarctic Lake during the Polar Night Transition. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, p. 4358–4366.

LABRENZ, M.; BRETTAR, I.; CHRISTEN, R.; FLAVIER, S. 2004. Development and Application of a Real-Time PCR Approach for Quantification of Uncultured Bacteria in the Central Baltic Sea. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, p. 4971.

LAMI, R.; COTTRELL, M. T.; CAMPBELL, B. J.; KIRCHMAN, D. L. 2009. Light-dependent growth and proteorhodopsin expression by Flavobacteria and SAR11 in experiments with Delaware coastal Waters**. Environ Microbiol**, v. 11, p. 3201–3209.

LANE, D. J. 1991. 16S/23S rRNA Sequencing. **In:** STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (ed). Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. New York: John Wiley & Sons; p. 115-175.

LARA, C.; RODRIGUEZ, R.; GUERRERO, M. G. 1993. Nitrate transport in cyanobacterium Anacystis nidulans. **Physiol Plant**, v. 89, p. 582-587.

LAWS, E.; FALKOSKI, P. G.; SMITH, W. O. JR.; DUCKLOW, H.; MCCARTHY, J. J. 2000. Temperature effects on export production in the open ocean. **Global Biogeochem Cycles,** v. 14, p. 123 –1246.

LEFORT, T.; GASOL, J. M. 2013. Global-scale distributions of marine surface bacterioplankton groups along gradients of salinity, temperature, and chlorophyll: a meta-analysis of fluorescence in situ hybridization studies. **Aquat Microb Ecol**, v. 70, p. 111–130.

LIBES, S. 2009. Introduction to Marine Biogeochemistry. 2nd. Ed. San Diego, California, USA: Elsevier, p. 221-237.

LONGNECKER, K. L.; LOMAS, M. W.; VAN MOOY, B. A. S. 2010. Abundance and diversity of heterotrophic bacterial cells assimilating phosphate in the subtropical North Atlantic Oceane. **Environ Microbiol**, v. 12, p. 2773–2782.

LOHRENZ, S. E.; CASTRO, B. M. 2005. Eastern Ocean Boundaries Pan-Regional overview. In: ROBINSON, A. R.; BRINK, H. (Eds.), **The Sea**, v.14. Harvard College, p.3–20.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARK, D. P. 2012. Brock: Biology of Microorganisms. 13th ed. Benjamim Cummings: San Francisco, USA.

MALMSTROM, R. R.; COTTRELL, M. T.; ELIFANTZ, H.; COTTRELL, M. T. 2005. Biomass production and assimilation of dissolved organic matter by SAR11 bacteria in the Northwest Atlantic Ocean. **Appl Environ Microbiol,** v. 71, p. 2979–2986.

MALMSTROM, R. R.; KIENE, R. P.; COTTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L. 2004. Contribution of SAR11 bacteria to dissolved dimethylsulfoniopropionate and amino acid uptake in the North Atlantic Ocean**. Appl Environ Microbiol**, v. 70, p. 4129–4135.

MANN, K. H.; LAZIER, J. R. N. 2006. Vertical structure of the open ocean: biology of the mixed layer. **In**: Dynamics of Marine Ecossystems: Biological-Physical Interactions in the Oceans. USA: Blackwell Publishing, p. 68-117.

MARIE, D.; BRUSSAARD, C.; PARTENSKY, F.; VAULOT, D. 1999. Flow cytometric analysis of phytoplankton, bacteria and viruses. **In**: Current Protocols in Cytometry. New York: John Wiley & Sons, p. 1–15.

MCCARREN J.; BECKER, J. W.; REPETA, D. J.; SHI, Y.; YOUNG, C. R.; MALMSTROM, R. R.; CHISHOLM, S. W.; DELONG, E. F. 2010. Microbial community transcriptomes reveal microbes and metabolic pathways associated with dissolved organic matter turnover in the sea. **PNAS,** v. 107, p. 16420–16427.

MIRANDA, L. B. 1982. Análise de massa de água de plataforma continental e da região oceânica adjacente: Cabo de São Tome (RJ) à Ilha de São Sebastião (SP). Tese de livre-docência. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 194 p.

MØLLER, E. F.; THOR, P.; NIELSEN, T. G. 2003. Production of DOC by Calanus finmarchicus, C. glacialis and C. hyperboreus throughsloppy feeding and leakage from fecal pellets. **Mar Ecol Prog Ser**, v. 262, p. 185–191.

MOORE, L. R.; ROCAP, G.; CHISHOLM, S. W. 1998. Physiology and molecular phylogeny of coexisting Prochlorococcus ecotypes. **Nature,** v. 393, p. 464–467.

MOORE, L.; POST, A.; ROCAP. G.; CHISHOLM, S. 2002. Utilization of different nitrogen sources by the marine cyanobacteria prochlorococcus and synechococcus. **Limnol Oceanogr**, v. 47, p. 989–996.

MORRIS, R. M.; RAPPE, M. S.; CONNON, S. A.; VERGIN, K. L.; SIEBOLD, W. A.; CARLSON, C. A.; GIOVANNONI, S. J. 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities**. Nature**, v. 420, p. 806−810.

MYKLESTAD, S. M. 2000. Dissolved organic carbon from phytoplankton. **In**: WANGERSKY, P. J. (ed). Marine. Chemical, Springer, Berlin, Germany, p. 111–148.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. 2004. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento,** v. 33.

OFFRE, P.; SPANG, A.; SCHLEPER, C. 2013. Archaea in biogeochemical cycles. **Ann Rev Microbiol,** v. 67, p. 437-457.

OLSON, R. J.; CHISHOLM, S. W.; ZETTLER, E. R.; ALTABET, M. A.; DUSENBERRY, J. A. 1990. Spatial and temporal distributions of prochlorophyte picoplankton in the North Atlantic Ocean. **Deep-Sea Res I**, v. 37, p. 1033–1051.

PAERL, R. W.; TURK, K. A.; BEINART, R. A.; CHAVEZ, F. P.; ZHER, J. P. 2012. Seasonal change in the abundance of Synechococcus and multiple distinct phylotypes in Monterey Bay determined by rbcL and narB quantitative PCR. **Environ Microbiol**, v.14, p. 580 –593.

PAN, L. A.; ZHANG, J.; ZHANG, L. H. 2007. Picophytoplankton, nanophytoplankton, heterotrohpic bacteria and viruses in the Changjiang Estuary and adjacent coastal waters. **J Plankton Res**, v. 29, p. 187–197.

PARTENSKY, F.; HESS, W. R.; VAULOT, D. 1999. Prochlorococcus, a Marine photosynthetic prokaryote of global significance. **Microbiol Mol Biol** Rev, v. 63, p. 106–127.

PAUL, J. H.; PICHARD, S. L.; KANG, J. B.; WATSON, G. M. F.; TABITA, F. R. 1999. Evidence for a clade-specific temporal and spatial separation in ribulose bisphosphate carboxylase gene expression in phytoplankton populations of Cape Hatteras and Bermuda. **Limnol Oceanogr**, v. 44, p. 12–23.

PAYTAN, A.; MCLAUGHLIN, K. 2007. The Oceanic Phosphorus Cycle. **Chem Ver**, v. 107, p. 563-576.

PICHARD, S. L.; CAMPBELL, L.; KANG, J. B.; TABITA, F. R.; PAUL, J. H. 1996. Regulation of ribulose biophosphate carboxylase gene expression in natural phytoplankton communities. **Mar Ecol Prog Ser**, v. 139, p. 257–265.

QIU, D., HUANG, L., ZHANG, J., LIN, S. 2010. Phytoplankton dynamics in and near the highly eutrophic Pearl River Estuary, South China Sea. **Cont Shelf Res,** v. 30, p. 177-186.

RAMON-MASSANA, R.; MURRAY, A. E.; PRESTON, C. M.; DELONG, E. F. 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. **Appl Environ Microbiol**, v. 63, p. 50–56.

REISCH, C. R. R.; MORAN, M.; WHITMAN, W. B. 2011. Bacterial catabolism of dimethylsulfoniopropionate (DMSP). **Front Microbiol**, v. 2.

REYNOLDS, C. S. 2006. Ecology of Phytoplankton: ecology, diversity and conservation. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

REZENDE, J. H. M. 2003. Intrusões da Água Central do Atlântico Sul na Plataforma Continental durante o verão. Tese de doutorado em Oceanografia Física. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 120 p.

RIBEIRO, S. M. M. S. 1996. Caracterização taxonômica e ecológica das comunidades pico-, nano- e microfitoplanctônicas, superficial e profunda, da zona eufótica do Atlântico Sul. Tese de Doutorado em Oceanografia Biológica. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 155 p.

RIESEBERG, M.; KASPER, C.; REARDON, K. F.; SCHEPER, T. 2001. Flow cytometry in biotechnology. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, p. 350–360.

RIVIERA, I. N. G.; PAULA, C. R.; SOUZA, C. P. 2008. Microbiologia aquática marinha. **In**: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (ed). Microbiologia Ambiental. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 609-627.

RUCH, D. B.; MARTINY, A. C.; DUPONT, C. L.; HALPERN, A. L.; VENTER, J. C. 2010. Characterization of Prochlorococcus clades from iron-depleted oceanic regions. **PNAS**, v. 107, p. 16184–16189.

RUIZ-GONZÁLEZ, C.; SIMÓ, R.; SOMMARUGA, R.; GASOL, J. M. 2013. Away from darkness: areview on the effects of solar radiation on heterotrophic bacterioplankton activity. **Front Microbiol**, v. 4, p. 1-24.

SABEHI, G.; KIRKUP, B.; ROZENBERG, M.; STAMBLER, N.; POLZ, M. F.; BÉJÁ, O. 2007. Adaptation and spectral tuning in divergent marine proteorhodopsins from the eastern Mediterranean and the Sargasso**. ISME J**, v. 1, p. 48–55.

SABEHI, G.; LOY, A.; JUNG, K. H.; PARTHA, R.; SPUDICH, J. L.; ISSACSON, T.; HIRSCHBERG, J.; WAGNER, M.; BEJA, O. 2005. New insights into metabolic properties of marine bacteria encoding proteorhodopsins**. Plos Biol**, v. 3, p. 1409–1417.

SCHIPPERS, A.; NERETIN, L. N. 2006. Quantification of microbial communities in near-surface and deeply buried marine sediments on the Peru continental margin using real-time PCR. **Environ Microbiol**, v. 7, p. 1251–1260.

SCHOLSS, I. R.; NOZAIS, C.; MAS, S.; HARDENBERG, B. V.; CARMACJ, E.; TREMBLAY, J. E.; BRUGEL, S.; DEMERS, S. 2008. Picophytoplankton and nanophytoplankton abundance and distribution in the southeastern Beaufort Sea (Mackenzie Shelf and Amundsen Gulf) during Fall 2002. **J Mar Syst**, v.74, p. 978–993.

SHARP, J. H. 1997. Excretion of organic matter by marine phytoplankton: Do healthy cells do it?. **Limnol Oceanogr**, v. 22, p. 381–399.

SIEBURTH, J. M.; SMETACECK, V.; LENZ, J. 1978. Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. **Limnol Oceanogr**, v. 23, p. 1256-1263.

SILVEIRA, C. B.; VIEIRA, R. P.; CARDOSO, A. M.; PARANHOS, R.; ALBANO, R.M.; MARTINS, O. B. 2011. Influence of salinity on bacterioplankton communities from the brazilian rain forest to the Coastal Atlantic Ocean. **Plos One,** v. 6, p. 17789.

SILVEIRA, I. C. A.; SCHMIDT, A. C. K.; DIAS CAMPOS, E. J.; GODOI, S. S.; IKEDA, E. Y. 2000: A corrente do Brasil ao largo da costa leste brasileira. **Rev bras Oceanogr**, v. 48, p. 171-183.

SIMÃO, M. 2010. Dinâmica sazonal e espacial do fitoplâncton nos máximos sub-superficiais de clorofila na plataforma sudeste-sul brasileira. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Centro de Estudos do Mar, 65 p.

SJOSTEDT, J.; MARTINY, J. B. H.; MUNK, P.; RIEMANN, L. 2014. Abundance of broad bacterial taxa explained by environmental conditions but not water mass in the Sargasso Sea. **Appl Environ Microbiol**, v. 80, p. 2786–2795.

SUZUKI, M. T.; PRESTON, C. M.; CHAVEZ, F. P.; DELONG, E. F. 2001. Quantitative mapping of bacterioplankton populations in seawater: Field tests across an upwelling plume in Monterey Bay**. Aquatic Microb Ecol**, v. 24, p. 117–127.

SWAN, B. K.; EHRHARDT, C. J.; REIFEL, K. M.; MORENO, L. I.; VALENTINES, D. L. 2O1O. Archaeal and Bacterial communities respond differently to environmental gradients in anoxic sediments of a California Hypersaline Lake, the Salton Sea. **Appl Environ Microbiol**, v.76, p. 757–768.

TESKE, A. P.; SORENSEN, K. B. 2008. Uncultured archaeas in deep marine subsurface sediments:have we caught the mall? **ISME J**, v. 2, p. 3–18.

TSAI, A. Y.; CHIANG, K. P.; CHANG, J.; GONG, G. C. 2005. Seasonal diel variations of picoplankton and nanoplankton in a subtropical western Pacific coastal ecosystem**. Limnol Oceanogr**, v. 50, p. 1221–1231.

TSAI, A. Y.; CHIANG, K. P.; CHANG, J.; GONG, G. C. 2008. Seasonal variations in trophic dynamics of nanoflagellates and picoplankton in coastal

waters of the western subtropical Pacific Ocean. **Aquatic Microbiol Ecol**, v. 51, p. 263-274.

VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; HEIDLBERG, J. F.; HALPERN, A. L.; RUSCH, D.; EISEN, J. A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K. E.; NELSON, W.; FOUTS, D. E.; LEVY, S.; KANAP, A. H.; LOMAS, M. W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN – TILLSON, H.; PFNNKOCH, C.; ROGERS, Y. H.; SMITH, H. O. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea**. Science**, v. 304, p. 66–74.

VERGIN, K. L.; BESZTERI, B.; MONIER, A.; THRASH, J. C.; TEMPERTON, B.; TREUSCH, A. H.; KILPERT, F.; WORDEN, A. Z.; GIOVANNONI, S. J. 2013. High-resolution SAR11 ecotype dynamics at the Bermuda Atlantic Time-series Study site by phylogenetic placement of pyrosequences. **The ISME J**, v. 7, p. 1322–1332.

VILA-COSTA, M.; PINHASSI, J.; ALONSO, C.; PERNTHALER, J.; SIMO, R. 2007. An annual cycle of dimethylsulfoniopropionate-sulfur and leucine assimilating bacterioplankton in the coastal NW Mediterranean. **Environ Microbiol**, v. 9, p. 2451–2463.

WAFAR, M; L'HELGUEN, S.; RAIKAR V.; MAGUER, J. F.; LE CORRE, P. 2004. Nitrogen uptake by size-fractionated plankton in permanently well-mixed temperate coastal waters. **J Plankton Res**, v. 26, p. 1207–1218.

WANG, K.; WOMMACK, E.; CHEN, F. 2011.Abundance and Distribution of Synechococcus spp. and Cyanophages in the Chesapeake Bay**. Appl Environ Microbiol,** v. 77, p. 7459–7468.

WANG, M.; LIANG, Y.; BAI, X.; JIANG, X.; WANG, F.; QIAO, Q. 2010. Distribution of microbial populations and their relationship with environmental parameters in the coastal waters of Qingdao, China. **Environ Microbiol**, v. 12, p. 1926–1939.

WANG, Q. T.; XIAO, W.; MINDRINOS, M.; DAVIS, R. W. 2002. Yeast tRNA as carrier in the isolation of microscale RNA for global amplification and expression profiling. **BioTechniques,** v. 33, p. 788-796.

WEST, N. J.; SCHONHUBER, W. A.; FULLER, N. J.; AMANN, R. I.; RIPPKA, R.; POST, A. F.; SCANLAN, D. J. 2001 Closely related Prochlorococcus genotypes show remarkably different depth distributions in two oceanic regions as revealed by in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides. **Microbiol,** v. 147, p. 1731–1744.

WILHELM, S. W.; SUTTLE, C. A. 1999. Viruses and nutrient cycles in the Sea. **BioSci,** v. 49, p. 781–788.

WORDEN, A. Z. 2006. Picoeukaryote diversity in coastal waters of the Pacific Ocean. **Aquat Microb Ecol**, v. 43, p. 165–175.

WORDEN, A. Z.; NOLAN, J. K.; PALENIK, B. 2004. Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton:the importance of the eukaryotic component**. Limnol Oceanogr**, v. 49, p. 168–179.

WORDEN, A. Z.; NOT, F. 2008. Ecology and diversity of picoeukaryotes. **In**: KIRCHMAN D. L. (ed). Microbial Ecology of the Oceans. 2nd Hoboken: John Wiley & Sons, p. 159–205.

XU, Q.; TABITA, F. R. 1996. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase gene expression and diversity of Lake Erie planktonic microorganisms. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, p.1913–1920.

YUTIN, N.; SUZUKI, M. T.; TEELING, H.; WEBER, M.; VENTER, J. C.; RUSCH, D. B.; BÉJÁ, O. 2007. Assessing diversity and biogeography of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in surface waters of the Atlantic and Pacific Oceans using the Global Ocean Sampling Expedition metagenomes. **Environ Microbiol**, v. 9, p. 1464–1475.

ZEHR, J. P.; KUDELA, R. M. 2011. Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems. **Annu Rev Mar Sci,** v.3, p.197–225.

ZEHR, J. P; TURNER, P. J. 2005. Nitrogen Fixation Nitrogenase Genes and Gene Expression. **In** PAUL, H. J. (ed). Marine Microbiology: Methods in Microbiology. London: Academic Press, p. 271-288.

ZHANG, X.; SHI, Z.; YE, F.; ZENG, Y.; HUANG, X. 2013. Picophytoplankton abundance and distribution in three contrasting periods in the Pearl River Estuary, South China**. Mar Fresh Res**, v. 64, p. 692-705.

ZUBKOV, M. V.; SLEIGH, M. A.; TARRAN, G. A.; BURKILL, P. H.; LEAKEY, R. J. G. 1998. Picoplanktonic community structure on an Atlantic transect from 50°N to 50°S. **Deep-Sea Res I**, v. 45, p. 1339–1355.

ZUBKOV, M. V.; TARRAN, G. A.; FUCHS, B. M. 2004. Depth related amino acid uptake by Prochlorococcus cyanobacteria in the Southern Atlantic tropical gyre. FEMS **Microbiol Ecol,** v. 50, p. 153–161.

ZWEIFEL, U. L.; NORRMAN, B.; HAGSTROM, A. 1998. Consumption of dissolved organic carbon by marine bacteria and demand for inorganic nutrients. **Deep-Sea Res I**, v. 45, p. 347-365.

APÊNDICE

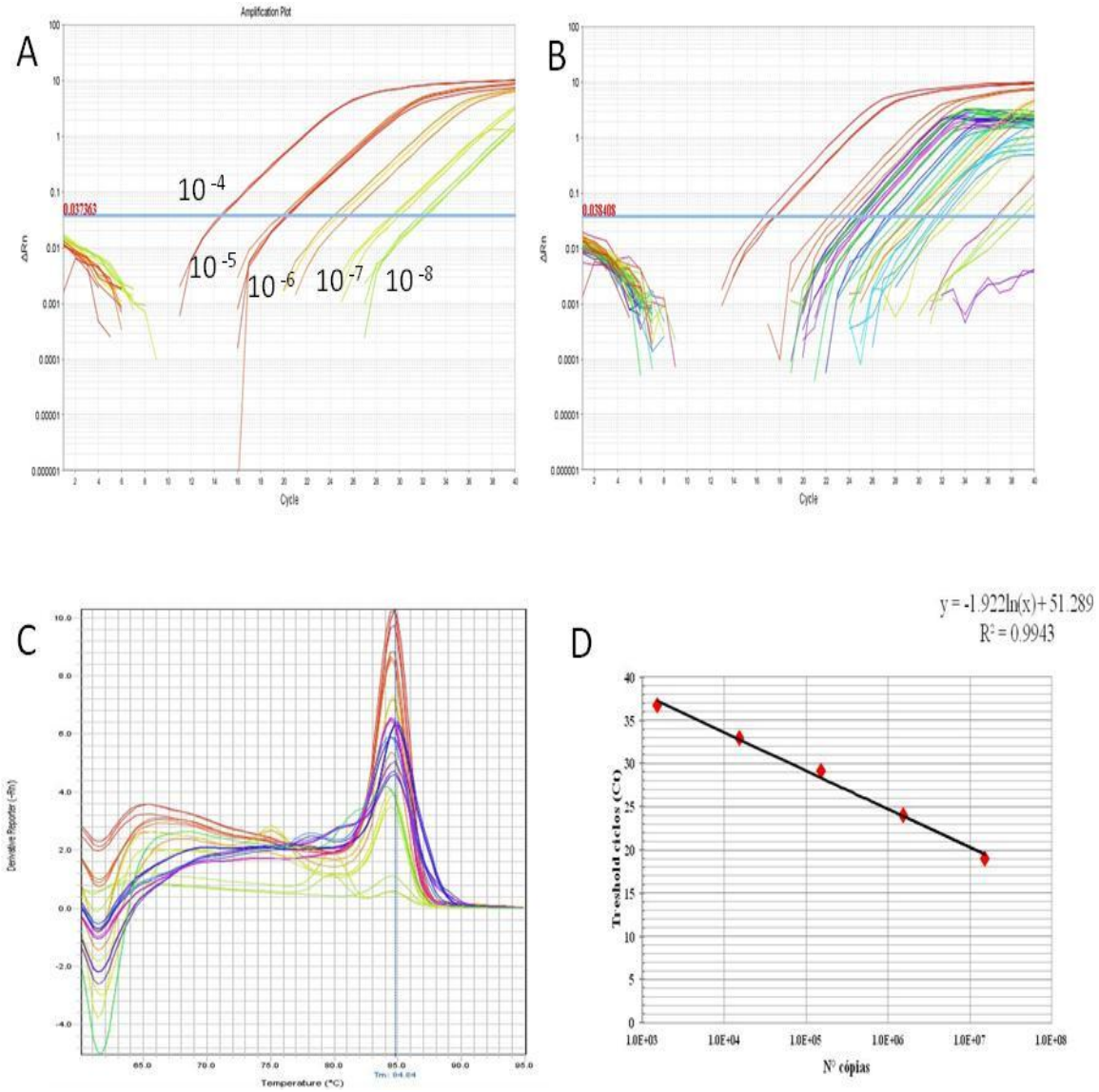

Figura 24. Curva padrão (A), de amplificação (B), de dissociação (C) e equação da reta (D) obtidas a partir da amplificação do gene do rRNA 16S de Bacteria por qPCR. Valores indicados na curva padrão (A) representam diluições do DNA plasmidial.

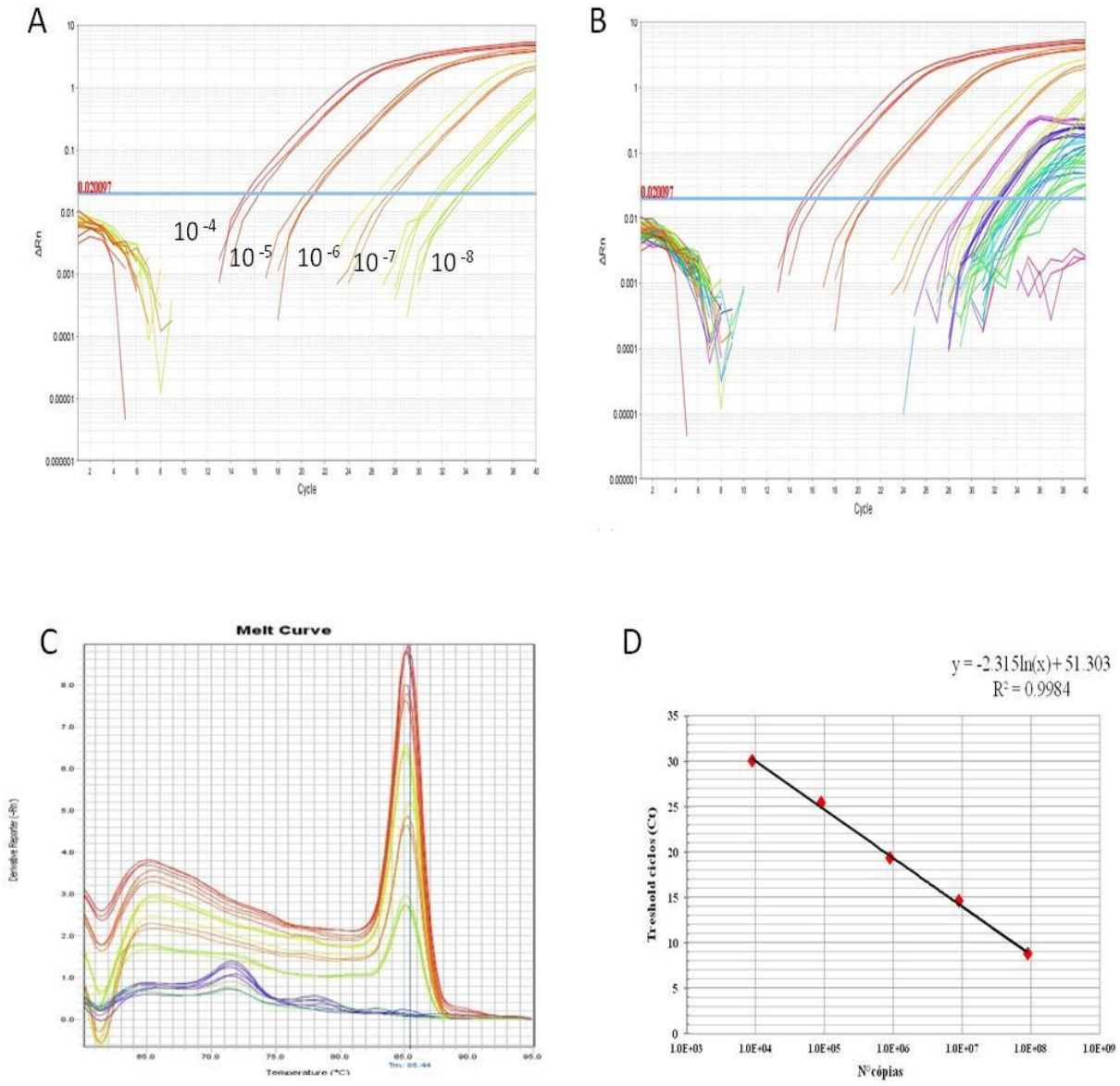

Figura 25. Curva padrão (A), de amplificação (B), de dissociação (C) e equação da reta (D) obtidas a partir da amplificação do gene do rRNA 16S de Archaea por qPCR. Valores indicados na curva padrão (A) representam diluições do DNA plasmidial.

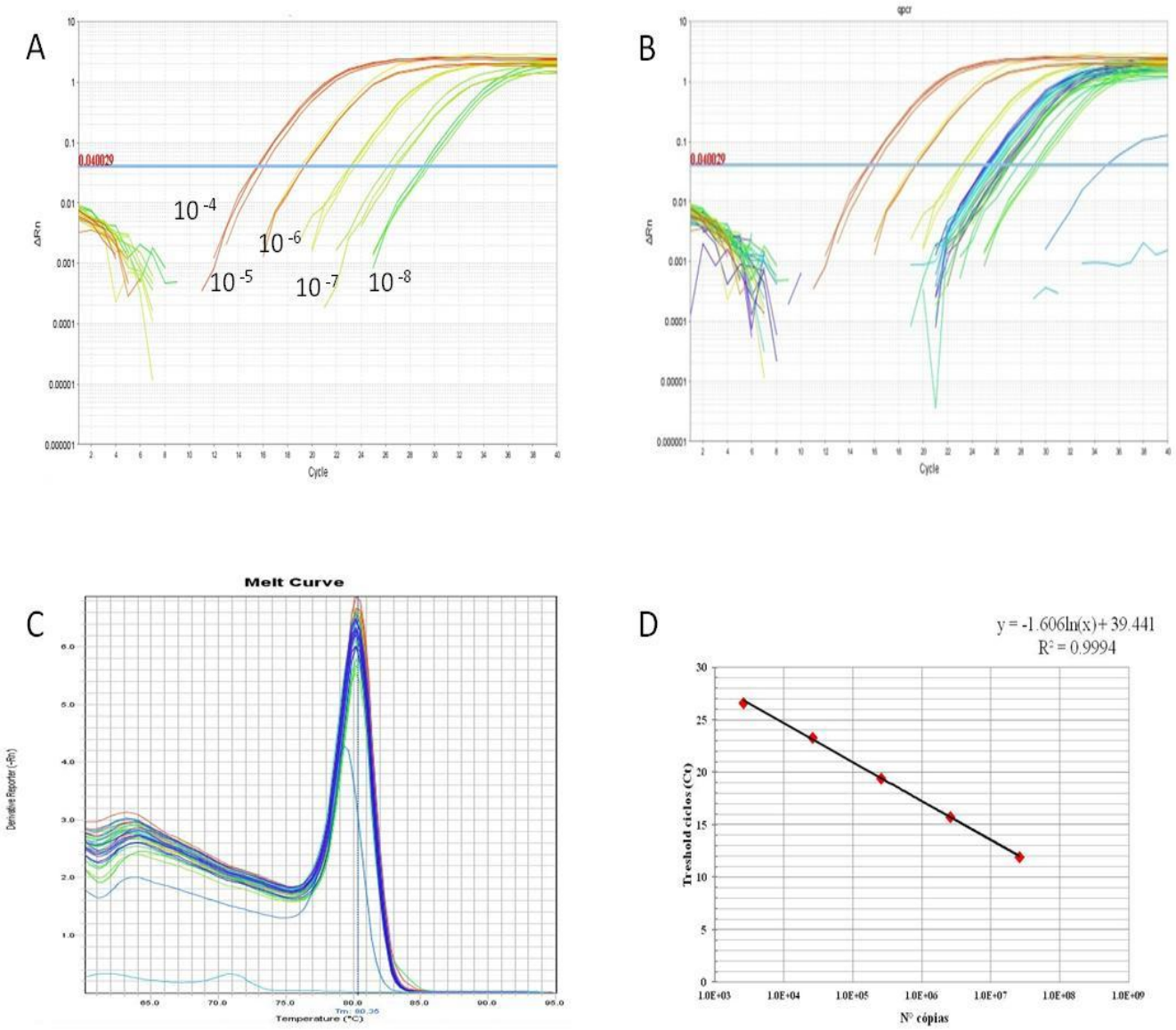

Figura 26. Curva padrão (A), de amplificação (B), de dissociação (C) e equação da reta (D) obtidas a partir da amplificação do gene do rRNA 16S de Sar11 por qPCR. Valores indicados na curva padrão (A) representam diluições do DNA plasmidial.

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos e elementos nutrientes com coordenadas geográficas, profundidade local, profundidade de coleta obtidos.

Parâmetros físico - químicos														
Estação	Lat.	Long.	Isobata local (m)	Prof. (m)	Temp. (°C)	Sal.	Fluorescência	Fosfato (µM)	Silicato (µM)	Nitrito (µM)	Nitrato (µM)	Amônio (µM)	COD (mg/L)	ND (mg/L)
1	-24.35533	-46.01417	50	5	**26.70**	**34.97**	248.83	0.12	3.21	0.07	0.23	**1.03**	1.21	0.34
				10	26.02	35.14	279.93	0.12	2.39	0.05	0.03	0.18	1.27	0.34
				20	19.64	35.56	992.83	0.28	2.21	0.03	0.23	0.76	1.22	0.34
				30	18.18	35.56	1045.59	0.28	1.44	0.07	0.31	0.87	0.98	0.23
				42	15.44	35.47	**1457.72**	0.85	7.12	0.37	6.41	0.24	0.94	0.22
2	-24.66950	-45.84778	75	5	25.81	35.21	137.80	0.28	2.45	0.03	0.02	0.00	1.11	0.16
				10	25.80	35.29	153.65	0.23	2.33	0.00	0.00	0.00	1.13	0.58
				20	25.37	35.61	181.00	0.23	1.44	0.03	0.00	0.03	0.98	0.13
				35	15.04	35.43	994.71	0.75	8.36	0.12	4.99	0.03	1.03	0.26
				50	**14.96**	35.44	977.11	**1.22**	**10.61**	0.00	10.19	0.03	0.80	0.28
				60	**14.96**	35.44	997.83	**1.27**	**9.72**	**0.16**	**10.45**	**0.00**	**0.84**	**0.29**
3	-25.14817	-45.59767	100	5	25.48	35.28	145.33	0.17	1.56	0.03	0.61	0.13	1.01	0.17
				10	25.46	35.28	125.67	0.23	1.56	0.05	0.77	**0.55**	1.01	0.18
				20	22.17	35.96	165.33	0.17	2.09	0.05	0.21	0.18	1.21	0.35
				40	16.66	35.67	667.00	0.17	1.44	0.03	0.45	0.08	1.09	0.15
				60	16.02	35.66	719.00	0.64	4.46	0.51	6.58	0.03	**0.75**	0.39
				80	15.97	35.65	500.00	0.64	4.46	0.55	6.73	0.08	0.91	0.29
4	-25.41533	-45.46002	130	10	25.17	35.41	53.81	0.23	1.09	0.00	0.00	0.03	1.19	**0.12**
				30	19.62	36.21	49.01	0.28	2.03	**0.14**	5.82	0.00	0.96	0.44
				50	17.28	35.86	46.20	0.44	2.80	0.07	8.35	0.03	**0.70**	0.16
				70	15.73	35.65	44.39	0.64	3.04	0.07	8.51	0.13	0.95	0.27
				100	**14.90**	35.51	43.43	0.85	3.69	0.16	2.64	0.03	0.81	**0.71**
				120	**14.13**	35.40	42.54	0.80	4.16	0.00	0.00	0.00	0.82	0.26

5	-25.76783	-45.28373	200	10	26.10	36.97	77.17	0.12	1.44	0.07	0.70	0.18	0.96	0.14
				20	26.10	36.97	70.40	**0.07**	1.38	0.03	0.10	0.08	0.87	0.18
				70	23.44	37.05	160.00	**0.07**	2.51	0.03	0.35	0.18	1.16	0.18
				100	21.94	36.78	309.00	**0.07**	1.20	0.00	0.66	0.13	0.94	**0.83**
				190	15.79	35.64	236.00	0.44	1.56	0.23	6.40	0.13	0.80	0.28
6	-26.02767	-45.15410	1500	10	25.72	36.88	54.67	0.12	1.56	0.00	0.00	0.13	0.97	0.13
				60	23.11	36.91	150.83	0.12	1.14	0.00	0.00	0.00	0.96	0.13
				110	21.81	36.74	465.57	0.12	1.14	0.10	0.38	0.13	0.80	0.15
				160	18.59	36.10	139.00	0.44	2.03	0.03	0.00	0.00	0.75	0.21
				200	16.24	35.71	19.20	0.49	2.62	0.00	4.77	0.00	0.67	0.22
				240	15.18	35.52	11.86	0.59	2.86	0.00	5.96	0.08	**1.61**	0.36
7	-26.18383	-45.07508	2000	20	25.43	36.83	38.92	**0.07**	1.32	0.00	0.22	0.08	1.04	0.36
				60	23.54	37.07	123.00	0.12	4.10	0.03	0.33	0.13	0.95	0.14
				110	21.85	36.82	590.33	0.12	1.32	0.07	0.41	**0.00**	1.09	0.31
				160	18.53	36.13	211.40	0.44	1.38	0.12	2.31	**0.29**	0.90	0.40
				200	16.84	35.78	41.00	0.44	*	0.05	4.03	0.08	0.75	0.17
				240	15.48	35.57	7.73	0.64	2.98	0.05	6.27	0.08	0.90	0.38
8	-26.18483	-45.07547	2000	20	25.64	36.81	49.60	0.12	1.62	0.03	0.04	0.08	*	*
				60	23.80	**37.15**	118.25	**0.07**	**0.02**	0.07	0.15	0.00	*	*
				110	21.86	36.83	453.63	0.17	1.20	0.03	0.59	0.00	*	*
				160	18.28	36.14	186.00	0.44	2.09	0.00	3.56	0.00	*	*
				200	16.35	35.70	30.00	0.49	2.74	0.05	4.97	0.00	*	*
9	-26.71533	-45.78820	2500	10	26.22	37.08	28.67	0.17	1.32	0.03	0.00	0.00	1.13	0.48
				70	23.53	37.07	112.14	**0.07**	1.14	0.03	0.00	0.00	1.25	0.21
				105	22.22	36.86	772.40	0.17	1.32	0.03	0.56	0.00	0.98	0.21
				160	17.50	35.87	298.33	0.28	1.56	0.10	1.71	0.03	0.90	0.22
				200	16.26	35.70	100.76	0.44	2.33	0.03	4.49	0.00	0.67	0.22
				240	15.29	35.56	**3.83**	0.49	2.56	0.03	5.02	0.08	0.81	0.30
		Média Total			20.38	36.02	292.71	0.36	2.64	0.08	2.50	0.12	0.97	0.28

*Não há dado; **negrito**: Maior valor e menor valor; em verde: camada subsuperficial de clorofila.

Tabela 6. Abundância das populações de *Synechococcus spp*., *Prochlorococcus spp*., Picoplâncton Eucarioto, Nanoplâncton Eucarioto e Bactérias Heterotróficas detectados por citometria de fluxo nas estações e profundidades amostradas.

Citometria de Fluxo									
Estação	Latitude	Longitude	Isobata local (m)	Profundidade (m)	Synechococcus spp. (cel.ml^{-1})	Prochlorococcus spp. (cel.ml^{-1})	Picoplâncton Eucarioto (cel.ml^{-1})	Nanoplâncton Eucarioto (cel.ml^{-1})	Bactérias Heteortróficas (cel.ml^{-1})
1	-24.35533333	-46.014167	50	5	36055	**0**	11545	**8615**	**2111282**
				10	**119215**	0	7280	3060	1931728
				20	30180	0	2465	325	679750
				30	5580	0	1825	845	720197
				42	9018	0	3015	1325	847205
2	-24.6695	-45.847783	75	5	7382	547	2857	318	2030695
				10	8376	1503	5484	729	1987265
				20	43510	15	3812	568	1376035
				35	17035	5	11007	795	1361110
				50	15289	455	9564	2479	934175
				60	19715	750	11295	3300	1251730
3	-25.14816667	-45.597667	100	5	100045	100	2005	605	1559340
				10	116365	160	2350	620	1697785
				20	69445	160	3245	715	1262825
				40	17115	2970	25250	2985	1689700
				60	3225	22005	10155	3885	998935
				80	375	170	115	55	769170
4	-25.41533333	-45.460017	130	10	33298	35	2433	358	1352170
				30	28488	355	5295	1447	744570
				50	15014	27120	**36450**	2216	1175165
				70	60	0	85	10	346855
				100	1168	6273	1397	1307	372220
				120	925	6890	1217	957	385065
5	-25.76783	-45.28373	200	10	37579	0	305	206	417184
				20	2177	20	612	454	392034
				70	762	38145	1657	593	484376

				100	280	31996	877	1063	243710
				190	2342	9215	1113	1144	424323
				20	6510	0	613	148	728890
				60	4158	750	767	260	729775
6	-26.02766667	-45.1541	1500	110	593	57776	2431	599	447605
				160	**45**	4010	450	20	217110
				200	60	350	**25**	**0**	167065
				240	235	350	118	3	154235
			2000	20	6844	0	761	198	606770
				60	3005	0	763	428	449178
7	-26.18383333	-45.075083		110	450	**65687**	1629	1068	270788
				160	528	19362	604	458	206593
				200	90	2828	154	74	160775
				240	85	210	63	11	**81033**
				20	2314	236	289	127	646978
				60	1572	247	555	88	403225
8	-26.18483333	-45.075467	2000	110	590	0	968	1278	356900
				160	238	15085	388	161	167470
				200	144	0	386	106	115827
				10	970	0	433	143	471800
				70	3164	0	700	530	593710
9	-26.71533333	-45.7882	2500	105	438	63745	2923	2179	439418
				160	363	32652	1261	510	393358
				200	111	9560	1101	133	229910
				240	190	2248	51	14	165890
		Média total			15151	8313	3571	971	740214

* amostra não amplificou; **negrito**: maior valor e menor valor; em verde: camada subsuperficial de clorofila.

.

Tabela 7. Biomassa de bactérias heterotróficas, *Synechococcus spp.*, *Prochlorococcus spp.*, picoplâncton eucarioto (µgC.L^{-1}) obtida nas estações e profundidades amostradas.

			Biomassa (µgC.L^{-1})			
Estação	Isobata local (m)	Prof. (m)	Bactéria Heterotrófica	Synechococcus spp.	Prochlorococcus spp.	Picoplâncton Eucarioto
1	50	5	**42.2**	91.9	0.0	299.0
		10	38.6	**304.0**	0.0	188.6
		20	13.6	77.0	0.0	63.8
		30	14.4	14.2	0.0	47.3
		42	16.9	23.0	0.0	78.1
2	75	5	40.6	18.8	0.2	74.0
		10	39.7	21.4	0.5	142.0
		20	27.5	111.0	0.0	98.7
		35	27.2	43.4	0.0	285.1
		50	18.7	39.0	0.2	247.7
		60	25.0	50.3	0.3	292.5
3	100	5	31.2	255.1	0.0	51.9
		10	34.0	296.7	0.1	60.9
		20	25.3	177.1	0.1	84.0
		40	33.8	43.6	1.1	654.0
		60	20.0	8.2	7.9	263.0
		80	15.4	1.0	0.1	3.0
4	130	10	27.0	84.9	0.0	63.0
		30	14.9	72.6	0.1	137.1
		50	23.5	38.3	9.8	**944.1**
		70	6.9	0.2	0.0	2.2
		100	7.4	3.0	2.3	36.2
		120	7.7	2.4	2.5	31.5
5	200	10	8.3	95.8	0.0	7.9
		20	7.8	5.6	0.0	15.9
		70	9.7	1.9	13.7	42.9
		100	4.9	0.7	11.5	22.7
		190	8.5	6.0	3.3	28.8
6	1500	10	14.6	16.6	0.0	15.9
		60	14.6	10.6	0.3	19.9
		110	9.0	1.5	20.8	63.0
		160	4.3	**0.1**	1.4	11.7
		200	3.3	0.2	0.1	**0.6**
		240	3.1	0.6	0.1	3.1
7	2000	20	12.1	17.5	0.0	19.7
		60	9.0	7.7	0.0	19.8
		110	5.4	1.1	**23.6**	42.2
		160	4.1	1.3	7.0	15.6
		200	3.2	0.2	1.0	4.0

		240	**1.6**	0.2	0.1	1.6
8	2000	20	12.9	5.9	0.1	7.5
		60	8.1	4.0	0.1	14.4
		110	7.1	1.5	0.0	25.1
		160	3.3	0.6	5.4	10.0
		200	2.3	0.4	0.0	10.0
9	2500	10	9.4	2.5	0.0	11.2
		70	11.9	8.1	0.0	18.1
		105	8.8	1.1	22.9	75.7
		160	7.9	0.9	11.8	32.7
		200	4.6	0.3	3.4	28.5
		240	3.3	0.5	0.8	1.3
	Média total		14.80	38.64	2.99	92.50

Negrito: maior valor e menor valor; em verde: camada subsuperficial de clorofila.

Tabela 8. Concentração de DNA e cDNA das amostras quantificadas no Qubit®.

Estação	Latitude	Longitude	Isobata local (m)	Profundidade (m)	DNA (ng/µl)	cDNA (ng/µl)
1	-24.35533333	-46.01416667	50	5	1.58	3.77
				10	0.00729	< 0,5
				20	0.792	2.2
				30	0.958	335
				42	1.54	1.27
2	-24.6695	-45.84778333	75	5	0.834	2.07
				10	1.39	2.01
				20	1.38	2
				35	3	20.9
				50	1.55	1.83
				60	1.59	36.7
3	-25.14816667	-45.59766667	100	5	0.343	0.881
				10	0.473	1.41
				20	0.692	0.792
				40	0.786	0.7
				60	0.599	2.41
				80	0.298	1.63
4	-25.41533333	-45.46001667	130	10	1.07	0.709
				30	3.46	1.11
				50	1.07	7.32
				70	0.687	4.41
				100	0.716	1.85
				120	*	2.14
5	-25.76783	-45.28373	200	10	0.259	1.81
				20	0.328	0.768
				70	0.492	2.69
				100	0.173	92
				190	0.432	2.08
6	-26.02766667	-45.1541	1500	20	0.495	2.88
				60	0.607	1.31
				110	0.319	3.02
				160	0.757	*
				200	0.315	2.47
				240	1.37	2.57
7	-26.18383333	-45.07508333	2000	20	0.241	2.41
				60	*	3.22
				110	0.341	5.8
				160	0.19	1.36
				200	0.316	1.84
				240	0.165	2.59

				20	0.102	2.67
				60	0.484	3.24
8	-26.18483333	-45.07546667	2000	110	0.194	1.25
				160	*	5.5
				200	0.181	1.17
				10	1.35	4.3
				70	0.861	1.33
9	-26.71533333	-45.7882	2500	105	0.588	2.03
				160	1.39	1.35
				200	0.473	1.28
				240	0.228	2.9

Em verde: camada subsuperficial de clorofila.

Tabela 9. Abundância dos genes de Bactéria, de Archaea, Sar11 detectados por qPCR a partir do DNA total das amostras de água das estações e profundidades amostradas.

PCR em tempo real									
Estação	Latitude	Longitude	Isobata local (m)	Profundidade (m)	16S Archaea (n° células/ml)	16S Bacteria (n° células/ml)	16S Sar11 (n° células/ml)	Proteorodopsina (n° cópias de transcritos/ml)	Rubisco (n° cópias de transcritos/ml)
1	-24.35533333	-46.01416667	50	5	1.84E+02	1.04E+03	2.02E+02	1.19E+05	6.17E+02
				10	4.50E+01	3.03E+02	8.02E+01	*	4.33E+01
				20	4.30E+01	2.52E+04	2.30E+01	*	4.09E+01
				30	4.14E+01	6.76E+03	4.12E+02	*	*
				42	4.13E+01	1.92E+03	6.64E+02	4.08E+03	2.14E+03
2	-24.6695	-45.84778333	75	5	1.30E+02	1.08E+04	2.15E+02	8.23E+04	9.20E+02
				10	2.87E+02	9.41E+01	1.23E+02	6.41E+03	7.31E+01
				20	7.07E+01	3.88E+03	7.21E+01	1.01E+04	4.99E+02
				35	5.53E+01	1.10E+03	**7.00E+00**	8.81E+04	3.70E+00
				50	*	5.40E+02	2.06E+01	3.62E+03	*
				60	4.94E+01	1.78E+03	1.88E+01	6.07E+03	7.63E+02
3	-25.14816667	-45.59766667	100	5	4.72E+00	1.66E+02	1.32E+01	1.35E+04	1.57E+03
				10	1.60E+01	7.55E+03	7.00E+01	2.34E+04	2.32E+01
				20	2.57E+00	5.30E+02	1.05E+01	2.11E+04	2.88E+02
				40	3.04E+01	1.88E+03	7.82E+01	3.11E+04	2.23E+02
				60	5.84E+01	4.39E+03	1.64E+02	4.22E+03	5.67E+01
				80	6.37E+01	4.19E+02	9.45E+02	5.55E+04	5.28E+02
4	-25.41533333	-45.46001667	130	10		5.19E+03	**2.94E+04**	1.44E+04	1.07E+02
				30	1.17E+02	4.34E+03	2.54E+02	7.86E+04	8.09E+02
				50	1.55E+02	2.54E+02	2.00E+02	3.54E+04	8.26E+02
				70	2.74E+02	8.82E+03	1.36E+03	1.14E+05	2.81E+03
				100	1.37E+02	1.79E+03	1.36E+03	2.30E+03	2.12E+00
				120	*	*	*	1.55E+04	2.03E+01
5	-25.76783	-45.28373	200	10	2.69E+00	7.36E+02	1.64E+02	7.68E+03	1.60E+03

				20	3.53E+00	3.43E+03	4.84E+02	1.63E+04	3.35E+02
				70	3.62E+00	5.82E+02	2.93E+02	1.36E+05	1.92E+03
				100	6.39E+00	8.76E+02	8.42E+02	2.88E+04	7.91E+02
				190	8.87E+02	8.57E+03	1.17E+04	2.88E+04	6.89E+01
6	-26.02766667	-45.1541	1500	20	1.03E+02	1.79E+04	6.33E+03	7.07E+03	6.75E+01
				60	1.78E+02	1.40E+03	8.00E+02	1.17E+04	4.34E+02
				110	1.78E+02	9.12E+01	1.50E+02	2.70E+05	6.82E+02
				160	1.19E+02	3.01E+02	1.91E+03	*	*
				200	2.66E+02	7.01E+02	8.33E+03	*	9.90E+00
				240	6.63E+02	2.03E+03	2.39E+01	5.21E+04	**1.92E+00**
7	-26.18383333	-45.07508333	2000	20	**1.20E+00**	1.97E+02	1.32E+03	1.46E+05	4.39E+02
				60	*	*	*	*	1.25E+03
				110	2.61E+01	8.06E+02	1.54E+03	**1.34E+07**	*
				160	5.37E+01	1.56E+02	2.42E+03	1.58E+04	7.24E+02
				200	3.13E+02	6.18E+02	4.80E+03	6.98E+03	8.12E+01
				240	2.21E+02	7.73E+02	4.47E+03	**1.77E+03**	3.25E+02
8	-26.18483333	-45.07546667	2000	20	1.44E+01	5.78E+02	6.21E+03	2.64E+04	2.53E+01
				60	1.31E+00	**3.94E+01**	2.37E+04	3.12E+04	6.26E+00
				110	7.87E+02	2.93E+04	2.05E+04	1.06E+04	2.67E+01
				160	*	*	*	3.05E+04	**4.90E+03**
				200	**2.72E+03**	2.01E+03	3.71E+03	2.64E+04	5.88E+02
9	-26.71533333	-45.7882	2500	10	6.62E+01	2.80E+04	2.69E+04	1.57E+04	7.97E+01
				70	1.11E+02	9.48E+01	1.63E+03	3.56E+04	7.69E+01
				105	5.50E+01	*	5.42E+02	1.70E+04	5.17E+01
				160	1.01E+02	5.01E+02	5.69E+02	1.11E+04	7.78E+02
				200	9.87E+02	2.90E+03	5.75E+03	*	*
				240	2.21E+02	1.33E+03	5.44E+02	*	*
Média total					2.15E+02	4.10E+03	3.57E+03	3.50E+05	6.14E+02

* amostra não amplificou; **negrito**: maior valor e menor valor; em verde: camada subsuperficial de clorofila.

Tabela 10. Abundância de transcritos das enzimas rubisco e proteorodpsina quantificados por qPCR a partir do cDNA total das amostras de água coletadas no período diurno.

PCR em Tempo Real - Expressão Gênica Período Diurno							
Estação	Latitude	Longitude	Hora da coleta	Isobata local (m)	Profundidade (m)	Proteorodopsina (n° cópias de transcritos/ml)	Rubisco (n° cópias de transcritos/ml)
3	-25.14816667	-45.59766667	10:00	100	5	1.35E+04	1.57E+03
					10	2.34E+04	2.32E+01
					20	2.11E+04	2.88E+02
					40	3.11E+04	2.23E+02
					60	4.22E+03	5.67E+01
					80	5.55E+04	5.28E+02
4	-25.41533333	-45.46001667	09:00	130	10	1.44E+04	1.07E+02
					30	7.86E+04	8.09E+02
					50	3.54E+04	8.26E+02
					70	1.14E+05	**2.81E+03**
					100	2.30E+03	**2.12E+00**
					120	1.55E+04	2.03E+01
7	-26.18383333	-45.07508333		2000	20	1.46E+05	4.39E+02
					60	*	1.25E+03
					110	**1.34E+07**	*
					160	1.58E+04	7.24E+02
					200	6.98E+03	8.12E+01
					240	**1.77E+03**	3.25E+02
9	-26.71533333	-45.7882	15:00	2500	10	1.57E+04	7.97E+01
					70	3.56E+04	7.69E+01
					105	1.70E+04	5.17E+01
					160	1.11E+04	7.78E+02
					200	*	*
					240	*	*
Média total						6.69E+05	5.27E+02

Tabela 11. Abundância de transcritos das enzimas rubisco e proteorodpsina quantificados por qPCR a partir do cDNA total das amostras de água coletadas no período noturno.

PCR em Tempo Real - Expressão Gênica Período Noturno							
Estação	Latitude	Longitude	Hora da coleta	Isobata local (m)	Profundidade (m)	Proteorodopsina (n° cópias de transcritos/ml)	Rubisco (n° cópias de transcritos/ml)
1	-24.3553	-46.0142	21:00	50	5	1.19E+05	6.17E+02
					10	*	4.33E+01
					20	*	4.09E+01
					30	*	*
					42	4.08E+03	2.14E+03
2	-24.6695	-45.8478	00:00	75	5	8.23E+04	9.20E+02
					10	6.41E+03	7.31E+01
					20	1.01E+04	4.99E+02
					35	8.81E+04	3.70E+00
					50	**3.62E+03**	*
					60	6.07E+03	7.63E+02
5	-25.7678	-45.2837	21:00	200	10	7.68E+03	1.60E+03
					20	1.63E+04	3.35E+02
					70	1.36E+05	1.92E+03
					100	2.88E+04	7.91E+02
					190	2.88E+04	6.89E+01
6	-26.0277	-45.1541	02:00	1500	20	7.07E+03	6.75E+01
					60	1.17E+04	4.34E+02
					110	**2.70E+05**	6.82E+02
					160	*	*
					200	*	9.90E+00
					240	5.21E+04	**1.92E+00**
8	-26.1848	-45.0755	10:00	2000	20	2.64E+04	2.53E+01
					60	3.12E+04	6.26E+00
					110	1.06E+04	2.67E+01
					160	3.05E+04	**4.90E+03**
					200	2.64E+04	5.88E+02
Média total						4.21E+04	7.55E+02

Tabela 12. Correlação de *Spearman* entre os dados de expressão gênica (proteorodopsina e rubisco) e os parâmetros físico–químicos durante o dia (A) e a noite (B).

A

Variáveis	Profundidade (m)	Temperatura (°C)	Salinidade	Florescência	Fosfato (µM)	Silicato (µM)	Nitrito (µM)	Nitrato (µM)	Amônio (µM)	COD (mg/L)	ND (mg/L)	Proteorodopsina	Rubisco
Profundidade (m)	1.000	**-0.695**	-0.016	-0.141	**0.482**	0.299	0.191	0.360	-0.170	**-0.626**	0.179	-0.267	-0.113
Temperatura (°C)		1.000	**0.417**	0.188	**-0.840**	**-0.691**	-0.354	**-0.566**	0.088	**0.690**	-0.256	0.184	0.119
Salinidade			1.000	0.148	**-0.607**	-0.379	-0.024	-0.286	-0.303	0.304	0.159	0.316	0.136
Florescência				1.000	-0.263	-0.121	0.308	-0.035	0.037	0.221	-0.218	0.130	0.029
Fosfato (µM)					1.000	**0.724**	**0.462**	**0.651**	0.026	**-0.748**	0.317	-0.400	-0.138
Silicato (µM)						1.000	**0.433**	**0.590**	0.200	**-0.702**	0.169	-0.179	0.101
Nitrito (µM)							1.000	**0.684**	0.123	-0.350	**0.445**	-0.072	0.162
Nitrato (µM)								1.000	0.189	**-0.694**	0.190	-0.066	0.375
Amônio (µM)									1.000	0.041	-0.150	-0.075	0.387
COD (mg/L)										1.000	-0.090	0.394	-0.018
ND (mg/L)											1.000	-0.136	-0.186
Proteorodopsina												1.000	0.353
Rubisco													1.000

B

Variáveis	Profundidade (m)	Temperatura (°C)	Salinidade	Florescência	Fosfato (µM)	Silicato (µM)	Nitrito (µM)	Nitrato (µM)	Amônio (µM)	COD (mg/L)	ND (mg/L)	Proteorodopsina	Rubisco
Profundidade (m)	1.000	**-0.679**	0.298	-0.132	0.329	-0.021	-0.115	**0.496**	-0.361	**-0.518**	0.073	0.141	-0.126
Temperatura (°C)		1.000	0.220	-0.355	**-0.805**	**-0.438**	-0.121	**-0.743**	0.193	0.362	-0.248	0.054	0.137

Salinidade	1.000	**-0.405**	**-0.583**	**-0.687**	-0.185	-0.172	-0.097	-0.382	**-0.547**	-0.223	0.025
Florescência		1.000	0.255	0.154	0.454	0.318	0.345	0.002	0.317	-0.024	0.278
Fosfato (µM)			1.000	0.696	0.128	**0.595**	-0.264	-0.229	0.233	-0.155	-0.069
Silicato (µM)				1.000	0.088	**0.491**	0.026	0.168	0.419	-0.224	0.047
Nitrito (µM)					1.000	0.325	0.340	-0.071	-0.017	0.194	0.140
Nitrato (µM)						1.000	0.069	-0.279	0.357	0.010	0.098
Amônio (µM)							1.000	0.395	0.185	0.122	0.180
COD (mg/L)								1.000	0.289	0.100	-0.216
ND (mg/L)									1.000	0.075	-0.249
Proteorodopsina										1.000	-0.074
Rubisco											1.000

*Correlações marcadas são significativas a p <, 0,50 e r = 0,10 até 0,30 (fraco); r = 0,40 até 0,6 (moderado); r = 0,70 até 1 (forte).