LUCIANO LOPES QUEIROZ

PADRÕES DE DIVERSIDADE MICROBIANA
EM SEDIMENTOS MARINHOS PROFUNDOS INFLUENCIADOS
POR UMA EXSUDAÇÃO DE ASFALTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

LUCIANO LOPES QUEIROZ

PADRÕES DE DIVERSIDADE MICROBIANA
EM SEDIMENTOS MARINHOS PROFUNDOS INFLUENCIADOS
POR UMA EXSUDAÇÃO DE ASFALTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Vivian Helena Pellizari

Versão original

São Paulo
2015

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

© reprodução total

Queiroz, Luciano Lopes.

Padrões de diversidade microbiana em sedimentos marinhos
profundos influenciados por uma exsudação de asfalto / Luciano Lopes
Queiroz. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de
concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Microbiologia
ambiental.

Versão do título para o inglês: Microbial diversity patterns in deep-
sea sediments influenced by asphalt seep.

1. Fundo oceânico 2. Ecologia dos microorganismos 3. Microbiologia
ambiental 4. Biologia molecular 5. Biodiversidade 6. Ecologia de
comunidades I. Pellizari, Profa. Dra. Vivian Helena II. Universidade de
São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB032/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luciano Lopes Queiroz.

Título da Dissertação: Padrões de diversidade microbiana em sedimentos marinhos profundos influenciados por uma exsudação de asfalto.

Orientador(a): Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 554/12 referente ao projeto intitulado: *"Influência da distância geográfica na estrutura das comunidades microbianas do fundo oceânico na região do Saco do Mamanguá em Paraty, Rio de Janeiro"* sob a responsabilidade de Luciano Lopes Queiroz, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 18 de setembro de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a um conjunto de eventos aleatórios, desde a origem do universo, passando pela formação da nossa galáxia, a origem da vida na Terra até o meu nascimento. Sem eles não teria sido possível o desenvolvimento desse e de futuros trabalhos.

À minha orientadora, Dra. Vivian Helena Pellizari pela oportunidade de desenvolver meu trabalho em um ambiente tão instigante como o fundo do mar, além do apoio e orientação no decorrer do desenvolvimento deste trabalho. Sem dúvida contribuiu muito para formação como cientista e pessoa.

Ao Dr. Artur Silva pelo apoio no desenvolvimento do trabalho e por me receber em seu laboratório em Belém – PA.

Ao Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte pela orientação não oficial, por ouvir minhas reclamações e desabafos pacientemente e sempre me dar bons conselhos em momentos difíceis desse período.

À Msc. Rosa de Carvalho Gamba, A *Manager* do LECOM, pela amizade, puxões de orelha quando necessário e por administrar de forma magistral as finanças do laboratório.

À todos os colegas de laboratório, Adriana Torres, Amanda Bendia, Ana Carolina, André Rosh, Diego Castillo, Fabiana Paula, Francielli Peres, Felipe Nóbrega, Luana Agostini, Marina Bruza, Natascha Bergo, Thiago Molina e Victor Vital pela ajuda me ensinando alguma técnica, teoria, conceito ou simplesmente desabafando os problemas de cada um.

Ao grande amigo Bruno Spacek, sua esposa Sara Lodi e sua filha Gabriela por me receberem tão bem durante um mês em sua casa em Belém-PA.

À grande amiga Mariana Benites pelo companheirismo e por ouvir pacientemente minhas reclamações diárias.

Aos amigos Adriana Torres, Bruno Spacek, Diego Assis e Kleber do Espírito Santo Filho pela leitura crítica e de grande importância para minha dissertação.

Aos amigos da pós-graduação, Aline Amorim, Atila Iamarino, Felipe Rezende, Marina Seixas e Vanessa Feitosa pela amizade, pelos cafés e bons momentos de descontração e conversa.

Aos amigos que me ajudam a desenvolver o podcast de divulgação científica Dragões de Garagem, Lucas Camargos, Cristiano Silvério, Felipe Benites, Marcos V. Dantas-Queiroz,

Dônovan Ferreira e a Mariana Fioravanti por conversas descontraídas sobre outros assuntos que não tinham relação nenhuma com a minha pesquisa, contribuindo muito para minha formação fora da academia.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro e concessão da bolsa de mestrado, processo: 2013/09159-2.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Ciências Biomédicas, pela oportunidade.

Ao Instituto de Oceanografia e a *Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology* (JAMSTEC), por me darem a oportunidade de trabalhar com os micro-organismos do fundo do mar.

À minha família pelo apoio incondicional na busca dos meus sonhos.

E a todos que contribuíram de alguma forma no desenvolvimento desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

“De fato, as únicas questões realmente sérias são aquelas que até uma criança pode formular. Apenas as questões mais inocentes são realmente sérias. Elas são as questões sem resposta. Uma questão sem resposta é uma barreira intransponível. Em outras palavras, são as questões sem resposta que definem as limitações das possibilidades humanas, que descrevem as fronteiras da existência humana”

Milan Kundera

RESUMO

QUEIROZ, L. L. **Padrões de diversidade microbiana em sedimentos marinhos profundos influenciados por uma exsudação de asfalto.** 2015. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Sedimentos de mar profundo são ambientes estáveis e homogêneos, apesar disso, eles apresentam uma grande variedade de habitats disponíveis, possibilitando uma alta diversidade microbiana. A distribuição espacial dos micro-organismos é influenciada por fatores locais e regionais. Os fatores locais são associados à estrutura do ambiente e os fatores regionais, a limitação na dispersão dos micro-organismos que compõem as comunidades e eventos históricos que eventualmente podem modificar o ambiente. Eventos como a liberação de hidrocarbonetos das camadas mais profundas do sedimento para superfície podem alterar os padrões de distribuição espacial das comunidades microbianas, devido o aumento na disponibilidade de carbono e consequentemente selecionando as espécies capazes de degradá-los. Esses eventos são denominados de exsudações de asfalto e foram encontradas na região de estudo. Considerando a falta de conhecimento e a importância dos micro-organismos em sedimentos de mar profundo do oceano Atlântico Sul, o objetivo desse estudo foi compreender os padrões de diversidade microbiana nessas regiões e também investigar como o óleo proveniente da exsudação de asfalto influencia as comunidades de micro-organismos no seu entorno. Esse estudo foi realizado na região do Platô de São Paulo que foi dividido em duas regiões, norte e sul. A diversidade microbiana foi estudada em 14 amostras de sedimento de mar profundo, nove amostras na região norte e cinco na sul. A exsudação de asfalto foi encontrada na região norte, influenciando diretamente três das nove amostras. As comunidades foram estudadas através dos métodos de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), PCR quantitativa (qPCR) e sequenciamento de última geração (*Ion Torrent*). A distribuição espacial das comunidades foi analisada em diferentes escalas espaciais: verticalmente, variando com a profundidade do sedimento (≤ 4 cm), localmente, em cada uma das regiões amostradas (1-34 Km) e regionalmente, comparando as regiões norte e sul (> 250 Km). O perfil da comunidade obtido com a técnica de DGGE mostrou que as comunidades microbianas foram menos similares entre as regiões e apresentaram relação com a distância geográfica para arqueia e bactéria. Os valores de similaridade foi maior localmente do que regionalmente. A similaridade obtida nas camadas de profundidade analisadas foi alta e não houve relação com a distância geográfica. O número de células entre as camadas de profundidades foi diferente, com tendência de diminuição com o aumento da profundidade. As classes bacterianas mais abundantes foram Alphaproteobacteria (30%), Acidimicrobiia (18%), Gammaproteobacteria (16%), Deltaproteobacteria e Gemmatimonadetes (3%). A composição das comunidades influenciadas pela exsudação de asfalto não teve relação com a presença do óleo ou com as camadas de profundidade. A distância geográfica e a exsudação de asfalto foram importantes fatores para determinação da distribuição geográfica das comunidades microbianas em sedimento marinhos profundos do Platô de São Paulo. Apesar da ausência de relação entre o óleo proveniente da exsudação de asfalto e a composição das comunidades, a alta abundância de Alphaproteobacteria e a importância da distância dentro da região norte são indicativos do aumento da heterogeneidade causado pela exsudação de asfalto. Mais estudos procurando compreender a composição geoquímica dos sedimentos e do óleo são necessários para explicar como esses fatores influenciam a estruturação das comunidades microbianas estudadas.

Palavras-chave: Diversidade microbiana. Mar profundo. Sedimento. Exsudação de asfalto. Oceano Atlântico Sul.

ABSTRACT

QUEIROZ, L. L. **Microbial diversity patterns in deep-sea sediments influenced by asphalt seep**. 2015. 59 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Deep-sea sediments are stable and homogeneous environments, however, they have a high variety of available habitats, allowing a high microbial diversity to occur. Microbial spatial distribution is determined by local and regional factors. Local factors are associated to environment structure and regional factors, to microbial dispersal limitation and historical events that may cause environmental changes. Historical events such as hydrocarbon emanation from sub-seafloor to seafloor may change the patterns of microbial spatial distribution, due to an increase of carbon, thus, selecting species capable to degrade them. These events are denominated as asphalt seep and they were found on the studied region. Considering the lack of knowledge and the importance of microorganisms on deep-sea sediments from South Atlantic ocean, this study aims to understand the patterns of microbial spatial distribution and how the oil from asphalt seep influence the microbial communities.

This study was realized in São Paulo Plateau region. The plateau was divided in two regions, north and south. Microbial diversity was studied from 14 deep-sea sediment samples, nine samples from north region and five from south region. The asphalt seep was found in north region from São Paulo Plateau, directly affecting three of the nine samples. The communities were studied through denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), quantitative PCR (qPCR) and next generation sequencing (Ion Torrent). The spatial distribution of the communities was analyzed at different spatial scales: sediment depth (≤ 4 cm), local (1-34 Km) and regional (> 250 Km). Microbial communities were less similar between regions and showing relation with geographic distance to archaea and bacteria. Similarity values within regions were higher than between them, but the geographic distance was also important to both domains, despite samples being closer. Similarity values between sediment depths were high and have no relation with geographic distance. The cell number between sediment depths was different, with tendency to decrease with depth increase. The most abundant classes were Alphaproteobacteria (30%), Acidimicrobia (18%), Gammaproteobacteria (16%), Deltaproteobacteria e Gemmatimonadetes (3%). The communities composition influenced by asphalt seep have no relation with oil presence and sediment depths. Geographic distance and asphalt seep were important factors to determine the spatial distribution of microbial communities in deep-sea sediments from São Paulo Plateau. Despite the absence of relation between oil from asphalt seep and communities composition, the high abundance of Alphaproteobacteria and the importance of distance within north region are indicative of heterogeneity increase caused by asphalt seep. More studies aiming to understand the geochemical composition from sediments and oil are necessary to explain how these factors influence the communities structure.

Keywords: Microbial diversity. Deep-sea. Sediment. Asphalt seep. South Atlantic ocean.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Perfil vertical do assoalho oceânico e os ambientes de mar profundo (Fonte: adaptado a partir de JØRGENSEN; BOETIUS, 2007)	18
Figura 2 - O submersível SHINKAI 6500 retornando ao RV Yokosuka após coleta de amostras na região sul do Platô de São Paulo.	23
Figura 3 – Pontos de coleta de sedimento no Platô de São Paulo (mais informações vide tabela 1). A) Localização do Platô de São Paulo no Atlântico Sul e a região de coleta (B); B) Detalhamento das duas regiões de coleta no Platô de São Paulo, regiões norte (C) e sul (D); C) Região norte do Platô de São Paulo e identificação das amostras coletadas; D) Região sul do Platô de São Paulo e identificação das amostras coletadas.	24
Figura 4 - Testemunho de sedimento marinho coletado (seta vermelha: interseção água-sedimento).	26
Figura 5 - Perfil de DGGE das comunidades de bactéria. <i>Primer</i> para o gene RNAr 16S utilizado CG338F-518R, gradiente desnaturante 30-70%. Dendrograma construído pela matriz de similaridade de Jaccard.....	32
Figura 6 - Escalonamento multidimensional não-métrico das comunidades bacterianas a partir do perfil de DGGE da região norte (círculos preenchidos) e sul (círculos vazios). Diferença significativa entre os grupos determinada pela análise de PERMANOVA ($F_{1,26}=2,2$, $R^2=0,078$, $P=0,028$).	33
Figura 7 - Perfil de DGGE das comunidades de arqueia. <i>Primer</i> utilizado para o gene RNAr 16S GC344F-519R, gradiente desnaturante 30-70%. Dendrograma construído pela matriz de similaridade de Jaccard.....	33
Figura 8 - Escalonamento multidimensional não-métrico das comunidades de arqueia a partir do perfil de DGGE da região norte (círculos preenchidos) e sul (círculos vazios). Diferença significativa entre os grupos determinada pela análise de PERMANOVA ($F_{1,26}=4,4$, $R^2=0,145$, $P=0,001$).	34
Figura 9 - Número de células bacterianas encontradas na região norte e obtidos através dos valores de Ct resultantes da técnica de qPCR.....	35
Figura 10 - Número de células bacterianas encontradas na região sul e obtidos através dos valores de Ct resultantes da técnica de qPCR.....	36
Figura 11 - Número de células de arqueias encontradas na região norte e obtidos através dos valores de Ct resultantes da técnica de qPCR.....	36

Figura 12 - Número de células de arqueias encontradas na região sul e obtidos através dos valores de Ct resultantes da técnica de qPCR.....	37
Figura 13 - Dendrograma de similaridade das comunidades bactérias da região norte do platô de São Paulo. Matriz de distância construída a partir do método de Jaccard e utilizando as OTUs com <i>cutoff</i> de 0,03.....	39
Figura 14 - Escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) entre as comunidades bacterianas presentes nas amostras com (azuis) e sem óleo (vermelhas), e profundidade no sedimento 1 cm (circulo) e 4 cm (triangulo), da região norte do platô de São Paulo. Matriz de distância construída a partir do método de Jaccard e utilizando as OTUs com <i>cutoff</i> de 0,03.	39
Figura 15 - Abundância relativa dos principais filos encontrados na região norte do platô de São Paulo, classificados utilizando o banco de dados do SILVA (QUAST et al., 2013).	41
Figura 16 - Abundância relativa das principais classes encontradas na região norte do platô de São Paulo, classificadas utilizando o banco de dados do SILVA (QUAST et al., 2013).....	42
Figura 17 - Os 50 gêneros mais abundantes encontrados na região norte do platô de São Paulo. Dados referentes a abundância relativa dos gêneros classificados, os não classificados foram excluídos do gráfico.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de região, coordenadas, profundidade e camadas das amostras de sedimento coletadas nas regiões norte e sul do Platô de São Paulo.....	25
Tabela 2 - Primers utilizados para realização dos métodos DGGE e qPCR para Bacteria e Archaea.....	27
Tabela 3 - Resultados do teste de Mantel parcial para as regiões norte e sul (escalas locais) e total (escala regional).....	35
Tabela 4 - Dados de riqueza e diversidade encontrados na região norte e obtidos através do sequenciamento por Ion Torrent.....	38
Tabela 5 - Número de sequências classificadas e não classificadas de acordo com o nível taxonômico.	40
Tabela 6 - Dez classes mais abundantes encontradas na região norte do Platô de São Paulo. Dados referentes a abundância relativa das classes classificadas, as não classificadas foram excluídas da tabela. Valores entre parêntese referentes a porcentagem do número total de sequências da amostra.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AOM	<i>Anaerobic oxidation methane</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C	Carbono
CH ₄	Gás metano
CO ₂	Dióxido de carbono
Ct	<i>Cycle threshold</i>
d.f.	<i>Degrees of freedom</i>
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dsDNA	<i>Double strain deoxyribonucleic acid</i>
DDSP	<i>Deep Sea Drilling Project</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
Fe ²⁺	Íon de ferro (II)
Fe ³⁺	Íon de ferro (III)
H	Hidrogênio
H ⁺	Íon de hidrogênio
H ₂ O	Água
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
IFremer	<i>French Research Institute for Exploration of the Sea</i>
IO	Instituto Oceanográfico
IODP	<i>Integrated Ocean Drilling Program</i>
JAMSTEC	<i>Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology</i>
Mn ²⁺	Íon de manganês (II)
N ₂	Gás nitrogênio
NH ₃	Amônia
NMDS	Escalonamento multidimensional não métrico
NO ²⁻	Nitrito
NO ³⁻	Nitrato
ODP	<i>Ocean Drilling Program</i>
OTU	<i>Operational taxonomic unit</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PERMANOVA	<i>Permutational multivariate analysis of variance</i>
PGM	<i>Personal genome machine</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>

QUEST	<i>Quest for limit of life</i>
RNAr	RNA ribossômico
S ₀	Enxofre elementar
SO ₂	Dióxido de enxofre
SO ₄ ²⁻	Sulfato
TAE	Tris – Acetato - EDTA
UPGMA	<i>Unweighted pair group method with arithmetic mean</i>
WHOI	<i>Woods Hole Oceanographic Institution</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos.....	22
2 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 Área de estudo e amostragem.....	23
2.2 Extração de DNA total	26
2.3 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)	27
2.4 PCR quantitativo	28
2.5 Sequenciamento do gene RNAr 16S por Ion Torrent	29
2.6 Bioinformática	30
2.7 Análises estatísticas	31
3 RESULTADOS	32
4 DISCUSSÃO	45
4.1 Distribuição espacial das comunidades de micro-organismos no Platô de São Paulo	45
4.2 Composição das comunidades bacterianas influenciadas pela exsudação de asfalto na região norte do Platô de São Paulo	47
5 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Os ambientes marinhos ocupam grande parte da superfície terrestre e participam de vários processos ambientais globais, como os ciclos geoquímicos do carbono, nitrogênio, enxofre, ferro e outros (MADIGAN; MARTINKO; STAHL, 2010). Dentre os ambientes marinhos, destacam-se os ambientes abaixo de 1000 metros de profundidade, classificados como mar profundo, que compõem cerca de 75% de todo o volume de água dos oceanos (ORCUTT et al., 2011). Considerando que a penetração de luz é praticamente nula a partir dos 300 metros, o metabolismo fotossintético, responsável pela produtividade primária na coluna d'água é praticamente inexistente, o que torna o mar profundo um ambiente menos ativo biologicamente do que os ambientes rasos. Assim, a obtenção de nutrientes pelos microrganismos de mar profundo fica dependente de fontes alóctones de nutrientes, derivada principalmente de matéria orgânica produzida na zona eufótica (EDWARDS; BECKER; COLWELL, 2012; KONHAUSER, 2007; ORCUTT et al., 2011).

O maior ambiente de mar profundo em extensão é o assoalho oceânico, compondo cerca de 67% da superfície terrestre. O assoalho oceânico é uma região extrema, devido a pouca disponibilidade de nutrientes, alta pressão hidrostática (aumento de 1 atm a cada 10 metros de profundidade na coluna d'água) (KATO, 2011) e temperaturas muito baixas variando de -1 a 4 °C, sendo composto por duas camadas: superfície e sub-superfície (JØRGENSEN; BOETIUS, 2007). A superfície do assoalho oceânico é coberta por uma camada heterogênea de partículas biogênicas, terrígeas, vulcanogênicas e autínogênicas, denominada de sedimento. O sedimento é formado pela deposição dessas partículas durante um longo período de tempo e limitada a poucos centímetros por ano dependendo da região. A sub-superfície é a região mais profunda (mais de 1,5m de profundidade) da camada de sedimento (D'HONDT et al., 2009).

Não havia indicativos da existência de vida em ambientes de mar profundo até a década de 50, quando as primeiras amostras de sedimentos foram coletadas a 10 mil metros de profundidade, observando uma rica e abundante comunidade de micro-organismos (JØRGENSEN; BOETIUS, 2007). Desde então, vários projetos foram criados com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre a vida em ambientes de mar profundo, como os projetos *Deep Sea Drilling Project* (DSDP), *Ocean Drilling Program* (ODP) e o *Integrated Ocean Drilling Program* (IODP), além da utilização de submersíveis tripulados e não tripulados como o ALVIN operado pelo *Woods Hole Oceanographic Institution* (WHOI), o SHINKAI 6500 e o KAIKO 7000II operados pela *Japan Agency for Marine-Earth Science and*

Technology (JAMSTEC) e o Nautilo operando pelo *French Research Institute for Exploration of the Sea* (IFremer).

O avanço científico e tecnológico na exploração do fundo do mar permitiu a descoberta de vários ambientes completamente diferentes do assoalho oceânico, como as exsudações, que são aberturas no assoalho oceânico liberando gases ou magma. Existem dois tipos de exsudações, quentes e frias. As exsudações quentes estão associadas principalmente a formação e deformação do assoalho oceânico próximo as cordilheiras meso-oceânicas e zonas de subducção. Estas áreas exalam gases provenientes do próprio magma associado a atividade vulcânica, elevando as temperaturas nesses locais até 400 °C (KONHAUSER, 2007). O gás exalado é composto principalmente de misturas de vapores de H₂O, CO₂, N₂, SO₂, H e C, cujas composições variam de acordo com a temperatura e o conteúdo de minerais dissolvidos (REYSENBACH; SHOCK, 2002). As exsudações frias ocorrem na região do talude continental ou em bacias ricas em sedimentos, devido à presença de compostos derivados da decomposição de matéria orgânica; formando compostos de H₂S, CH₄ e hidrocarbonetos que são liberados no assoalho oceânico (ORCUTT et al., 2011). A variedade de micro-organismos capazes de oxidar os compostos de hidrocarbonetos utilizando em seu metabolismo o oxigênio ou sulfato comoceptor final de elétrons é uma das principais características das comunidades presentes nesses ambientes (Figura 1).

Figura 1 - Perfil vertical do assoalho oceânico e os ambientes de mar profundo (Fonte: adaptado a partir de JØRGENSEN; BOETIUS, 2007)

Existem diferentes tipos de formações associadas às exsudações frias como os *pockmarks*, chaminés de gás (*gas chimneys*), vulcões de lama (*mud volcanoes*), *brine ponds* e as exsudações de óleo e asfalto (*oil e asphalt seep*). As *pockmarks* são depressões no assoalho oceânico que variam de 1 a 100 metros de diâmetro e são formadas pela liberação de gases acumulados na sub-superfície. As chaminés de gás são tubos verticais circulares que funcionam como caminhos para o gás presente no sedimento. Os vulcões de lama são formados pela erupção de gases, fluidos e lama da sub-superfície. Os *brine ponds* são formados pelo acúmulo de água densa e salgada presente na sub-superfície que se desloca para a superfície, formando uma depressão no assoalho oceânico. E as exsudações de óleo e asfalto são vazamentos de hidrocarbonetos da sub-superfície para o assoalho oceânico (JØRGENSEN; BOETIUS, 2007).

As exsudações de asfalto são de particular interesse por serem fontes de hidrocarbonetos para o oceano e atmosfera (VALENTINE et al., 2010). Os hidrocarbonetos acumulados na sub-superfície migram verticalmente através de falhas presentes no sedimento para o assoalho oceânico (JONES et al., 2014). Esses hidrocarbonetos formam agregados de asfalto solidificado, que podem variar desde pequenos aglomerados com menos de 0,5 metros de diâmetro a aglomerados maiores, com até 50 metros de diâmetro, como os encontrados próximos à margem da Angola (JONES et al., 2014) e nas regiões Puma e Shenzi do Golfo do México (WEILAND et al., 2008; WILLIAMSON; ZOIS; HEWITT, 2008). Também existem

largas estruturas similares a vulcões que liberam um grande fluxo de hidrocarbonetos e formam montes de asfalto como os encontrados em Campeche Knolls no Golfo do México (MACDONALD et al., 2004) e na Bacia de Santa Barbara na costa da Califórnia (KELLER et al., 2007).

Os principais ciclos biogeoquímicos associados aos sedimentos de mar profundo são o do carbono, nitrogênio, enxofre e ferro. O assoalho oceânico é o maior reservatório de carbono existente na Terra, seu conteúdo de carbono inorgânico corresponde a 50 vezes mais do que o encontrado na atmosfera (MADIGAN; MARTINKO; STAHL, 2010). Vários metabolismos microbianos estão associados ao ciclo do carbono, como o metanogênico e metanotrófico, fotossintético e decomposição de carbono orgânico (DANOVARO; SNELGROVE; TYLER, 2014). Além disso, os ciclos de carbono e nitrogênio se interligam, os organismos fotossintetizantes, capazes de fixar carbono da atmosfera necessitam de compostos de nitrogênio para seu metabolismo. Os compostos de nitrogênio fazem parte de vários processos metabólicos básicos dos micro-organismos, comoceptor final de elétrons em condições anaeróbicas e na composição de várias macromoléculas (e.g. aminoácidos, nucleotídeos) (BAKER et al., 2013; ZEHR; KUDELA, 2011).

O ciclo do enxofre envolve a transformação dos compostos de enxofre em vários estados de oxidação e esses estados podem ser utilizados pelos micro-organismos. O grupo mais abundante capaz de metabolizar compostos de enxofre são as bactérias redutoras de sulfato (SO_4^{2-}), elas são globalmente distribuídas e compõem uma parte considerável das comunidades associadas a exsudações frias (KONHAUSER, 2007; MADSEN, 2011). Outros metabolismos microbianos baseados no enxofre são a oxidação de sulfeto de hidrogênio (H_2S) em enxofre elementar S_0 e sulfato, assimilação de sulfato e redução de enxofre elementar. Por fim, o ciclo do ferro é importante devido à grande concentração de ferro na crosta terrestre, as duas formas mais abundantes de ferro são Fe^{2+} e Fe^{3+} . Essas duas formas podem ser reduzidas ou oxidadas pelos micro-organismos ou por processos químicos (MADIGAN; MARTINKO; STAHL, 2010).

Os padrões de diversidade microbiana em sedimentos de mar profundo têm sido foco de vários estudos. Esses ambientes são muito estáveis, sofrendo poucas alterações em suas variáveis ambientais e consequentemente na estrutura das comunidades. As classes de micro-organismos comumente mais abundantes nesses ambientes são Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Planctomycetes, Actinobacteria e Acidobacteria. Esses grupos compreendem micro-organismos microaerofílicos ou anaeróbicos heterotróficos e

quimioautotróficos (SCHAUER et al., 2010; ZINGER et al., 2011). Os micro-organismos quimioautotróficos são comumente encontrados em ambientes de exsudações frias e quentes, como as bactérias redutoras de sulfato e as arqueias oxidadoras de metano (AOM, *anaerobic oxidation methane*) são os metabolismos chaves, sendo essa última o processo dominante nos ambientes de exsudações frias e um dos mais importantes consumidores de CH₄ do globo (KNITTEL et al., 2005; KNITTEL; BOETIUS, 2009; REEBURGH, 2007).

A composição e distribuição dos grupos taxonômicos e funcionais das comunidades microbianas têm sido relacionadas a fatores locais (dentro do habitat) e regionais (entre os habitats) (LINDSTRÖM; LANGENHEDER, 2012; MARTINY et al., 2006). Os fatores locais são determinados pelas variáveis ambientais como, temperatura, pH, luz, fontes de carbono e energia química disponíveis no habitat. As variáveis ambientais podem ser quantificadas e relacionadas às variáveis biológicas – táxons microbianos presentes e adaptados ao habitat (NEMERGUT et al., 2013). Os fatores regionais abrangem variáveis em uma escala maior do que o habitat e estão relacionados, principalmente, ao deslocamento dos táxons entre os habitats (LANGENHEDER; RAGNARSSON, 2007).

Nos estudos de biogeografia de micro-organismos os fatores locais sempre foram considerados os principais responsáveis pelos padrões de biodiversidade. Essa visão é advinda do conhecimento de que os organismos unicelulares podem ser cosmopolitas, sendo as relações de interação entre as comunidades e o meio um dos únicos fatores limitantes de sua ocorrência. Este fato é representado pela célebre frase, “*everything in everywhere, but environment select*” (BAAS BECKING, 1934). No entanto, abordagens mais recentes têm apontado a importância dos fatores regionais, e. g. a distância geográfica entre os habitats. Estes podem causar mudanças estruturais no ambiente e nas comunidades microbianas (HANSON et al., 2012). Nos ambientes de mar profundo os micro-organismos presentes no assoalho oceânico podem dispersar entre os habitats passiva e ativamente. A principal forma ativa de dispersão dos micro-organismos é pelo deslocamento vertical entre os grãos que compõem o sedimento e de forma passiva, eles podem dispersar horizontalmente através das correntes marinhas profundas e fixados a animais (LINDSTRÖM; LANGENHEDER, 2012).

O estudo de ambientes marinhos profundos têm se tornado fundamental para compreensão de processos globais, como os ciclos biogeoquímicos, mudanças climáticas e a descoberta de ambientes quimiossintéticos. Entretanto a maior parte desses estudos são realizados nos oceanos Pacífico e Atlântico Norte. Com o objetivo de incrementar o conhecimento desses processos no Atlântico Sul, três regiões próximas da margem continental brasileira foram

exploradas: Elevação do Rio Grande, Dorsal de São Paulo e Platô de São Paulo. O Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP), a CPRM Serviço Geológico Brasileiro e a JAMSTEC realizaram a expedição denominada “Iatá-piuna” que compôs o estudo QUEST (*Quest for Limit of Life*) organizado pela JAMSTEC utilizando o navio RV Yokosuka e o submersível tripulado SHINKAI 6500. Durante os mergulhos no Platô de São Paulo, localizada na região sudoeste do oceano Atlântico Sul e distante cerca de 260 km do litoral do estado do Espírito Santo. Uma exsudação de asfalto foi encontrada na região norte do Platô de São Paulo, formando uma camada viscosa de hidrocarbonetos solidificados.

Para investigar os padrões de diversidade microbiana na região do Platô de São Paulo e a influência dos hidrocarbonetos provenientes da exsudação de asfalto, foram utilizados os métodos independentes de cultivo baseados no gene RNAr 16S como eletroforese em gel gradiente desnaturante (DGGE), PCR quantitativa (qPCR) e sequenciamento de última geração (*Ion Torrent*).

O DGGE permite a rápida caracterização de diferenças na riqueza e distribuição de populações microbianas em amostras ambientais (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993). O DGGE consiste na separação, por meio de eletroforese, dos produtos de PCR que possuam tamanhos iguais e que tenham diferença na sequência de nucleotídeos. O gel é preparado com poliacrilamida e agentes desnaturantes (formamida e uréia), os quais causam o rompimento das pontes de hidrogênio que interligam as fitas de DNA. Os agentes desnaturantes são distribuídos em gradiente percentual, determinado pelo pesquisador, e à medida que os fragmentos de DNA migram no gel ocorre a separação das bandas. Os fragmentos de DNA (fita dupla, fita simples, ou parcialmente desnaturados pela formamida e uréia) migram com velocidades diferentes, permitindo a separação das moléculas de acordo com sua composição nucleotídica (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993). Os fragmentos de DNA ficam agrupados de acordo com sua similaridade de nucleotídeos, assim cada banda presente no gel indica um organismo específico e o perfil de bandas indica a diversidade de espécies do ambiente.

A PCR quantitativa permite a análise da abundância ou número de cópias de um determinado gene na amostra. O DNA ambiental extraído das amostras é submetido a um processo de amplificação que a cada ciclo emite uma fluorescência e a intensidade dela será quantificada pelo sensor do equipamento. A fluorescência pode ser obtida de duas formas, utilizando reagentes que intercalam todo DNA de fita dupla presente na reação e a cada ciclo quando ocorre a formação de uma nova fita dupla, ocorre a excitação desse marcador e ele emite

fluorescência (e.g. SYBR Green), ou utilizando uma sonda fluorescente que irá hibridizar com uma região específica do DNA (e.g. TaqMan®) (HEID et al., 1996; SMITH; OSBORN, 2009). Os valores de fluorescência são convertidos para número de cópias do gene, no caso do gene RNAr 16S, calcula-se uma estimativa do número de células presentes na amostra. Esses dados podem ser correlacionadas com as variáveis ambientais e biológicas do local de estudo e auxiliar na compreensão de como as comunidades de micro-organismos estão organizadas (SMITH; OSBORN, 2009).

O sequenciamento de última geração utilizando o *Ion Torrent Personal Genome Machine* (PGM) permite a identificação e quantificação dos micro-organismos presentes no ambiente, a partir das sequências são determinados as OTUs (*Operational Taxonomic Unit*) e realizadas as análises ecológicas. O PGM possui o funcionamento muito semelhante ao pirosequenciamento (ou 454), ambos utilizam uma etapa anterior de PCR em emulsão, mas ao invés de detectar a fluorescência quando uma base é incorporada, ele detecta a mudança no pH devido a liberação de íons de H^+ (PYLRO et al., 2014; ROTHBERG et al., 2011). Os últimos melhoramentos no método permitiram a obtenção de fragmentos de DNA maiores e com menor número de erros na incorporação das bases. Além disso, os custos operacionais do *Ion Torrent* são baixos quando comparados ao 454.

1.1 Objetivos

Considerando a presença da exsudação de asfalto, os impactos causados pela liberação de hidrocarbonetos no sedimento marinho e os padrões de diversidade microbiana em sedimentos de mar profundo na região do Platô de São Paulo, o presente estudo teve como objetivos: (1) compreender como as escalas espaciais e a distância geográfica influenciam os padrões de diversidade microbiana, (2) mensurar qual a variação da abundância de micro-organismos nas camadas de profundidade do sedimento, (3) verificar se e como, a presença da exsudação de asfalto influencia na composição das comunidades microbiana e (4) a partir dos dados taxonômicos, inferir quais são os principais metabolismos microbianos encontrados e relaciona-los com os ciclos biogeoquímicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e amostragem

As coletas foram realizadas a bordo do RV Yokosuka e do submersível tripulado SHINKAI 6500 (Figura 2) na região conhecida como Platô de São Paulo, localizado cerca de 260 km da costa dos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, entre os dias 10 e 24 de maio de 2013. O Platô de São Paulo foi dividido espacialmente em duas regiões: norte e sul. A região norte está localizada entre as coordenadas 20°30' - 21°30' S e 39°30' - 38°30' O (Figura 3C); a região sul está localizada entre as coordenadas 22°50' - 23°00' S e 39°10' - 38°30' O (Figura 3D). As amostras da região norte foram coletadas a uma profundidade média de 2.650 metros, e as da região sul a 3.120 metros de profundidade (Tabela 1). A salinidade da massa de água variou de 34,9 a 35,0 e as temperaturas entre 3 e 4 °C em ambas as regiões de coleta. Esses valores são característicos da massa de Água Profunda do Atlântico Norte (*North Atlantic Deep Water* – NADW), ela possui altas concentrações de O₂ e baixas concentrações de nutrientes. A NADW ocupa uma camada entre 1200 e 4000 metros de profundidade (MOROZOV et al., 2010; STRAMMA; ENGLAND, 1999).

Figura 2 - O submersível SHINKAI 6500 retornando ao RV Yokosuka após coleta de amostras na região sul do Platô de São Paulo.

Figura 3 – Pontos de coleta de sedimento no Platô de São Paulo (mais informações vide tabela 1). A) Localização do Platô de São Paulo no Atlântico Sul e a região de coleta (B); B) Detalhamento das duas regiões de coleta no Platô de São Paulo, regiões norte (C) e sul (D); C) Região norte do Platô de São Paulo e identificação das amostras coletadas; D) Região sul do Platô de São Paulo e identificação das amostras coletadas. As camadas de profundidade no sedimento não estão representadas no mapa.

Tabela 1 - Dados de região, coordenadas, profundidade e camadas das amostras de sedimento coletadas nas regiões norte e sul do Platô de São Paulo.

Região	Amostra	Latitude	Longitude	Prof. (m)	Camadas
Sul	01	22°56'26.39" S	39° 8'8.35" O	2997	S01-1 S01-2
	02	22°57'49.00" S	38°56'7.76" O	3127	S02-1 S02-2
	03	22°57'11.83" S	38°35'57.42" O	3148	S03-1 S03-2
	04	22°55'44.55" S	38°35'32.83" O	3123	S04-1 S04-2
	05	22°57'16.69" S	38°18'53.35" O	3602	S05-1 S05-2
Norte	06	20°41'37.57" S	38°38'11.86" O	2728	N06-1 N06-2
	07	20°40'14.45" S	38°38'5.83" O	2456	N07-1 N07-2
	08	20°38'1.88" S	38°47'7.73" O	2499	N08-1 N08-2
	09	20°39'6.19" S	38°46'53.20" O	2308	N09-1 N09-2
	10	20°43'8.05" S	38°39'6.23" O	2715	N10-1 N10-2
	11	20°43'8.05" S	38°39'6.23" O	2720	N11-1* N11-2*
	12	20°43'54.20" S	38°39'43.76" O	2651	N12-1* N12-2*
	13	20°43'54.20" S	38°39'43.76" O	2651	N13-1* N13-2*
	14	20°44'17.20" S	38°40'7.61" O	2456	N14-1 N14-2

*Amostras coletadas nos locais que possuíam exsudações de asfaltos.

A coleta foi composta por 9 mergulhos, sendo cinco na região norte e quatro na região sul do Platô de São Paulo. As amostras de sedimento foram coletadas utilizando testemunhadores, que são tubos de acrílico inserido no sedimento e manipulados pelo braço do submersível (Figura 4). A amostragem dos testemunhos foi realizada duas vezes em cada mergulho: i) no momento da chegada do SHINKAI 6500 na profundidade máxima do local de coleta e ii) antes do SHINKAI 6500 emergir. Caso fossem encontrados ambientes de exsudações frias durante o percurso do mergulho, um testemunho era coletado substituindo esse último. Em cada mergulho um ou dois testemunhos foram destinados à equipe de microbiologia. O processamento dos testemunhos foi realizado durante o período do embarque no laboratório específico para microbiologia do próprio navio, os testemunhos foram divididos em camadas de profundidade a partir da interface água-sedimento: 0-1 cm, 1-4 cm, 4-7 cm, 7-10 cm, 10-13 cm, e a cada 5 cm a partir deste e armazenadas em freezer -80 °C. O trabalho foi realizado utilizando as camadas de profundidade, 0-1 cm e 1-4 cm e foram organizadas com os

seguintes critérios: região aonde foram coletados os testemunhos, norte (N) ou sul (S), número da amostra (de 01 a 14) e a camada de profundidade (1 para 0-1 cm e 2 para 1-4 cm) (Tabela 1). Por exemplo, a amostra 10 possui os rótulos: N10-1 e N10-2, primeira e segunda camadas, respectivamente.

Figura 4 - Testemunho de sedimento marinho coletado (seta vermelha: interseção água-sedimento).

Para verificar como as escalas de estudo influenciaram a distribuição espacial das comunidades microbianas, foram definidas três escalas: escala regional, distâncias entre as regiões maiores que 250 km; escala local, distância dentro de cada região de 1 a 34 km e camadas de profundidade no sedimento, distâncias menores ou iguais a quatro centímetros.

2.2 Extração de DNA total

As extrações de DNA foram realizadas para todos os 14 testemunhos de sedimento e suas respectivas camadas. Para tal foi utilizado o kit de extração e protocolo do PowerSoil DNA Isolation Kit (MOBIO, Carlsbad, CA., EUA) com algumas adaptações: 0,5 g de sedimento por tubo e após a etapa de lise celular as amostras foram submetidas a um choque térmico, 5 minutos em banho-maria à 55 °C e em seguida transferidas para -20 °C, por 1 minuto.

A qualidade do DNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1% (v/v) preparado em tampão TAE 1X (Tris 0,04 M, ácido acético glacial 1M, EDTA 50 mM, em pH 8), usando Lambda Hind III (Life Technologies, Carlsbad, CA., EUA) como marcador

molecular. A quantificação das concentrações do DNA foi realizado pelo espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e pelo Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay (Life Technologies).

2.3 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

Os *primers* utilizados para realização dos perfis de DGGE foram GC338F-518R (Bacteria) e GC344F-519R (Archaea) (Tabela 2). Ambos os *primers* amplificam a região variável V3 do gene RNAr 16S gerando um fragmento de aproximadamente 190 pb (DELONG, 1992; LANE, 1991; MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993; RASKIN et al., 1994).

Tabela 2 - *Primers* utilizados para realização dos métodos DGGE e qPCR para Bacteria e Archaea.

Domínio	Nome do <i>primer</i>	Sequência (5' – 3')
Bacteria	GC338F*	ACTCCTACGGGAGGCAGC
	518R	GTATTACCGCGGCTGCTGG
	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
Archaea	GC344F*	ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA
	519R	GWATTACCGCGGCKGCTG
	340F	CCCTACGGGGCGCAGCAG
	1000R	GAGAGGAGGTGCATGGCC

* Grupo GC 40-pb: CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G

As amplificações foram realizadas utilizando-se o mix para PCR GoTaq® Green Master Mix (Promega, Fitchburg, WI., EUA). O volume final das reações foi de 50 µl; 25 µL de GoTaq® Green Master Mix, 0,2 µM de cada *primer* e 4 µL (6-8 ng) de DNA. As condições de amplificação, para ambos os *primers*, foram: desnaturação a 95 °C por 5 min; seguido por 35 ciclos de 1 min de desnaturação a 95 °C, 1 min de anelamento a 59 °C e 1 min de extensão a 72 °C; por fim a extensão final a 72 °C por 7 min. Todas as reações de PCR foram acompanhadas de um controle positivo, preparado utilizando 20 ng de DNA de *Escherichia coli* DH5α para Bacteria e 20 ng de DNA de *Haloferax sp.* para Archaea, e um controle negativo preparado substituindo o volume do DNA molde pelo de água MilliQ esterilizada. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, MA., EUA).

Os produtos obtidos na amplificação foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% (v/v) em TAE 1X a 70V, corados com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies), expostos ao fotodocumentador E-Gel® Imager Camera Hood (Life Technologies). Foi utilizado como marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Life Technologies).

Os produtos obtidos pela amplificação com os *primers* para Bacteria e Archaea foram submetidos à análise em DGGE utilizando-se o sistema Dcode Universal Mutation Detection

System (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA., EUA). Os géis utilizados foram preparados com poliacrilamida 8% (solução estoque 40% acrilamida/bis acrilamida 37,5:1; Bio Rad Laboratories) em tampão TAE 1X. O gradiente de destanuração utilizado foi de 30-70% para ambos os Domínios, sendo que a solução desnaturante 100% continha 7 M de uréia e 40% de formamida. A eletroforese foi realizada a 60 V e 60 °C durante 15 horas. Os géis foram corados com nitrato de prata segundo o protocolo modificado de SANGUINETTI et al., (1994), e as imagens foram obtidas através do scanner HP Photosmart Plus, 1200 dpi e formato TIFF.

2.4 PCR quantitativo

O DNA utilizado nas reações de PCR quantitativo (qPCR) foram purificados utilizando o kit para remoção de inibidores da OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research, Irvine, CA., EUA) e diluído na proporção de 1:2 e 1:5 para Archaea e Bacteria, respectivamente. As reações foram realizadas em triplicatas e utilizando o sistema de detecção SYBR Green I (Life Technologies). O volume final das reações foi de 25 µl; 12,5µl do kit Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG (Life Technologies) e 0,2 µM dos *primers* 27F-518R (Bacteria) e 340F-1000R (Archaea) (tabela 2), 0,5µl de BSA (*Bovine Serum Albumin*), 5µl do DNA alvo purificado e diluído e o volume foi completado com água MilliQ esterilizada.

As condições de amplificação, para o *primer* de 27F-518R (LANE, 1991; MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993) de Bacteria, foram: desnaturação a 95 °C por 10 min; seguido por 40 ciclos de 1 min de desnaturação a 95 °C, 30 segundos de anelamento a 56 °C e 30 segundos de extensão a 72 °C. Para o *primer* 340F-1000R (GANTNER et al., 2011) de Archaea foram: desnaturação a 95 °C por 10 min; seguido por 45 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95 °C, 30 segundos de anelamento a 57 °C e 1 min de extensão a 70 °C.

A curva padrão foi construída utilizando diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) dos DNAs de plasmídeos do gene RNAr 16S de Bacteria e Archaea. Os plasmídeos foram construídos a partir de produtos de PCR amplificados com os *primers* 27F-1401 (LANE, 1991) e 340F-1000R (GANTNER et al., 2011). Os produtos foram clonados utilizando o kit TOPO® TA Cloning® Kit® (Life Technologies) e os plasmídeos resultantes foram utilizados para transformar células competentes de E. coli. As colônias transformadas foram selecionadas utilizando meio de culturas Luria Bertani – LB, contendo ampicilina e X-Gal. Por fim, o DNA plasmidial das culturas foi extraído utilizando o *kit Pure Link™ Quick Plamid Miniprep* (Life Technologies).

Com o intuito de verificar a especificidade da reação de amplificação foram construídas curvas de desnaturação com temperaturas variando entre 72 °C e 96 °C. Os dados foram analisados através do software fornecido pela Applied Biosystems, foram calculados os valores de *cycle threshold* (Ct), a correção logarítmica (R2) entre o número de ciclos e a quantidade de DNA nas amostras, além da eficiência da reação (E) (SMITH; OSBORN, 2009). Desta forma os valores de Cts obtidos em cada reação foram utilizados para determinar a quantidade absoluta do DNA alvo nas amostras.

2.5 Sequenciamento do gene RNAr 16S por Ion Torrent

As amplificações do gene RNAr 16S para o sequenciamento foram realizadas utilizando-se as duas primeiras camadas de profundidade das amostras 06, 11, 12, 13 e 14, todas da região norte. As cinco amostras foram selecionadas para o sequenciamento devido a presença da exsudação de asfalto na região norte. Sendo que, as amostras 11, 12 e 13 estavam dentro da área de influência da exsudação e havia óleo no sedimento coletado. As amplificações foram realizadas com o volume final de 25µl; 0,3mg/ml BSA (*Bovine Serum Albumin*), 0,2mM de dNTP, 0,5µM de cada primer, 0,7U de Taq DNA Polimerase (Life Technologies), 1X Buffer e 4mM de MgCl₂. O *primer* utilizado foi o 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') e 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'), tendo maior cobertura para o domínio Bacteria (86%, SILVA Data Base SSU r119; QUAST et al., 2013).

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; seguido por 2 ciclos, consistindo de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 48 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min; 2 ciclos, consistindo de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 50 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min; 2 ciclos, consistindo de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 52 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min; e por fim 22 ciclos, consistindo de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 54 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min.

Após amplificadas, as bibliotecas foram purificadas com o Purelink PCR Purification Kit (Life Technologies) e quantificadas, utilizando o Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay (Life Technologies), para realização das emulsões. As emulsões das bibliotecas foram processadas no Ion OneTouch 2 Instrument, utilizando o kit Ion PGM Template OT2 Reagents 400 Kit; enriquecidas no OneTouch ES (Life Technologies). As bibliotecas foram sequenciadas no ION PGM, utilizando o Ion PGM Sequencing 400 Kit e finalmente depositadas, em dois Ion 318 chip Kit v2, de acordo com o protocolo do fabricante (Life Technologies).

2.6 Bioinformática

As sequências obtidas foram submetidas a um pré-tratamento para remoção das regiões dos *primers* e *barcodes*, utilizando o próprio software da plataforma de sequenciamento. Após o pré-tratamento, as sequências foram analisadas utilizando o software *mothur* v1.34.0 (SCHLOSS et al., 2009). Inicialmente elas foram submetidas a um filtro de qualidade que levou em consideração os critérios de tamanho mínimo das sequências (100 pb), *score* de qualidade Phred (>20) e quantidade máxima de homopolímeros (seis). As sequências com maior qualidade foram alinhadas e submetidas a avaliação de quimeras com o algoritmo *chimera.uchime* (EDGAR et al., 2011). Depois as sequências tiveram seu início e fim trimados para um tamanho de 180 pb através do comando *chop.seqs*, que representa a região V3 do gene RNAr 16S. Para redução do tamanho dos arquivos e menor necessidade computacional para o processamento das sequências na próxima etapa, foi selecionada uma única sequência representativa de cada e sua informação de abundância foi mantida em outro arquivo.

As sequências obtidas após o processo de filtragem de qualidade foram classificadas taxonomicamente utilizando o banco de dados do SILVA (QUAST et al., 2013) e as sequências classificadas como Eukaryota, Mitochondria, Chloroplasto e unknown foram excluídas. Em seguida, as sequências foram utilizadas para construção da matriz de distância em coluna e posterior determinação das OTUs. Após filtragem, construção da matriz de distância e determinação das OTUs, as amostras N06-2 e N12-1 apresentaram um baixo número de sequências devido problemas apresentados durante o sequenciamento ou baixa concentração de DNA na amostra, sendo portanto excluídas das análises de diversidade. Devido ao número variável de sequências entre as amostras, as análises de diversidade foram realizadas com uma sub-amostragem de 15457 sequências selecionadas aleatoriamente de cada sedimento. Este valor foi determinado com base na amostra que apresentou menor número de sequências após os filtros de qualidade descritos acima.

As análises de diversidade e composição das comunidades microbianas também foram realizadas através do software *mothur* (SCHLOSS et al., 2009). Em todas as análises os limites de corte para as OTUs, foi de 97%. As análises realizadas foram, estimadores de riqueza de Ace e Chao1, os índices de diversidade de Simpson e Shannon e a cobertura das sequências (KREBS, 1999; MAGURRAN, 2004).

2.7 Análises estatísticas

A análise dos géis de DGGE foram realizadas utilizando o programa BioNumerics (Applied Maths, Bélgica). O perfil de DGGE foi normalizado com os controles e as bandas foram detectadas. A partir das bandas detectadas e as OTUs obtidas através do sequenciamento do gene RNAr 16S foram construídos dendrogramas utilizando a distância de similaridade de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998). As matrizes de distância utilizadas para construção dos dendrogramas também foram utilizadas para realização do escalonamento multidimensional não métrico (NMDS em inglês). O critério para seleção do número de eixos do NMDS foi o valor de *stress* obtido em cada, eixos com valores menores do que 0,2 foram selecionados (FAITH; MINCHIN; BELBIN, 1987; LEGENDRE; LEGENDRE, 1998). A comparação se existe diferenças entre as regiões, presença do óleo e camadas de profundidade foi realizada através do teste de correlação PERMANOVA (ANDERSON, 2001) e a diferença entre os índices de diversidade utilizando o teste ANOVA (SOKAL; ROHLF, 1995).

A relação entre a distância geográfica, diferenças ambientais e o dados biológicos foi realizada por meio do teste de Mantel (MANTEL, 1967) e Mantel parcial (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998). O teste consiste na comparação entre duas matrizes de similaridade ou distância para o Mantel ou três para o Mantel parcial, obtidas de forma independente. Os resultados do Mantel permitem observar a correlação entre as variáveis e indicar se, e como, as distâncias geográficas e as diferenças ambientais entre as amostras influenciam a estrutura das comunidades microbianas. As matrizes utilizadas foram, distância geográfica entre as amostras, obtidas a partir das coordenadas geográficas de cada uma das amostras, sendo que as coordenadas foram convertidas em radianos para a construção da matriz de distância. Para os dados biológicos a matriz de distância foi construída a partir dos dados de ocorrência de bandas obtidos pelo DGGE para cada uma das amostras. E a matriz de diferenças ambientais foi construída considerando as camadas de profundidade do sedimento como categorias diferentes. As análises foram realizadas nas amostras localizadas dentro da mesma região de estudo, norte e sul (local) e entre as duas regiões (regional). Para verificar a diferença entre o número de células, obtidos através da qPCR, entre as duas camadas de sedimento foi utilizado o Teste-T pareado (SOKAL; ROHLF, 1995). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R (R CORE TEAM, 2014) e os pacotes *vegan* (OKSANEN et al., 2013) e *phyloseq* (MCMURDIE; HOLMES, 2013).

3 RESULTADOS

O perfil de DGGE das comunidades de bactéria apresentou entre 19 e 34 (média=24,53) bandas (Figura 5). As comunidades encontradas na região norte e sul formaram menos similares e formaram dois principais grupos no dendrograma. Essa separação também foi evidenciada no gráfico do NMDS (Figura 6) e a correlação entre as comunidades presentes nas duas áreas foi significativa (PERMANOVA; $F_{1,26}=2,2$, $R^2=0,078$, $P=0,028$). O perfil de DGGE para as comunidades de arqueia apresentou resultados semelhantes aos obtidos para bactéria. O número de bandas encontradas foi entre 9 e 28 (média=19,53) (Figura 7). As comunidades das duas áreas foram menos similares, formando dois principais grupos no dendrograma e no NMDS (Figura 8) e a correlação entre as comunidades das duas áreas foi significativa ($F_{1,26}=4,4$, $R^2=0,145$, $P=0,001$).

Figura 5 - Perfil de DGGE das comunidades de bactéria. *Primer* para o gene RNAr 16S utilizado CG338F-518R, gradiente desnaturante 30-70%. Dendrograma construído pela matriz de similaridade de Jaccard.

Figura 6 - Escalonamento multidimensional não-métrico das comunidades bacterianas a partir do perfil de DGGE da região norte (círculos preenchidos) e sul (círculos vazios). Diferença significativa entre os grupos determinada pela análise de PERMANOVA ($F_{1,26}=2,2$, $R^2=0,078$, $P=0,028$).

Figura 7 - Perfil de DGGE das comunidades de arqueia. *Primer* utilizado para o gene RNAr 16S GC344F-519R, gradiente desnaturante 30-70%. Dendrograma construído pela matriz de similaridade de Jaccard.

Figura 8 - Escalonamento multidimensional não-métrico das comunidades de arqueia a partir do perfil de DGGE da região norte (círculos preenchidos) e sul (círculos vazios). Diferença significativa entre os grupos determinada pela análise de PERMANOVA ($F_{1,26}=4,4$, $R^2=0,145$, $P=0,001$).

A correlação entre os dados biológicos de ocorrência das bandas e a distância geográfica das amostras apresentou distintos resultados dependendo da escala de estudo (Tabela 3). Quando comparadas as comunidades entre as regiões norte e sul (escala regional), a distância geográfica apresentou relação com a ocorrência das bandas, indicando uma diferenciação das comunidades em cada região e para ambos os domínios. A distância também apresentou correlação com as comunidades de bactéria e arqueia localizadas dentro da região norte, apesar das distâncias entre as amostras serem menores e dentro da região sul a distância apresentou correlação apenas para as comunidades de arqueia (escala local). E por fim, as camadas de profundidade no sedimento não foram importantes para as comunidades de bactéria e arqueia de cada amostra (Mantel; Bacteria $rM=-0,0521$, $p=0,916$; Archaea $rM=-0,237$, $p=0,717$).

Tabela 3 - Resultados do teste de Mantel parcial para as regiões norte e sul (escalas locais) e total (escala regional).

Domínio	Norte		Sul		Total	
	rM	p	rM	p	rM	p
Archaea	0,6997	0,001*	0,4751	0,001*	0,3712	0,002*
Bacteria	0,5683	0,001*	0,2276	0,108	0,1996	0,006*

Obs.: rM – coeficiente de correlação; p – significância do teste; * resultados significantes

A média do número de células bacterianas encontradas nos dois estratos do sedimento (0-1cm e 1-4cm) foi de 3.88×10^5 na região norte (Figura 9) e 2.15×10^5 na região sul (Figura 10); e de arqueia a média de número de células foi de 1.12×10^6 na região norte (Figura 11) e 1.08×10^6 na região sul (Figura 12). O DNA da amostra N06-2 não amplificou para bactéria e as amostras N06-2, N07-1, N09-2, N11-2, S01-2, S03-2 e S04-1 também não amplificaram para arqueia. Foi encontrada uma diferença entre o número de células das camadas de profundidade do sedimento para bactéria (Teste-T pareado; $t=2,574$, $d.f.=12$, $P=0,024$) e para arqueia (Teste-T pareado; $t=3.157$, $d.f.=6$, $P=0,019$).

Figura 9 - Número de células bacterianas encontradas na região norte e obtidos através dos valores de Ct resultantes da técnica de qPCR.

Figura 10 - Número de células bacterianas encontradas na região sul e obtidos através dos valores de Ct resultantes da técnica de qPCR.

Figura 11 - Número de células de arqueias encontradas na região norte e obtidos através dos valores de Ct resultantes da técnica de qPCR.

Figura 12 - Número de células de arqueias encontradas na região sul e obtidos através dos valores de Ct resultantes da técnica de qPCR.

O número total de sequências obtidas depois das análises de bioinformática foi de 1.168,469. Sendo que o número de sequências obtidas entre as amostras variou de 2083 a 267600 e devido essa grande diferença foi necessária a realização de uma sub-amostragem e a exclusão de duas amostras das análises posteriores. O número de OTUs (ou riqueza observada) para as oito amostras submetidas as análises de diversidade alfa, variou de 2207 a 4272. Os valores obtidos para o estimador de riqueza de Ace variaram de 11582 a 34833 e Chao1 variaram de 6543 a 16732. O índice de diversidade de Simpson apresentou valores entre 0,985 e 0,993 e o de Shannon entre 6 e 6,4. O índice de Shannon não apresentou diferença entre as amostras com ou sem óleo (ANOVA, $F=1,004$, $p=0,372$) e entre as camadas de profundidade ($F=0,239$, $p=0,650$). Entretanto o índice de Simpson apresentou diferença entre as amostras com ou sem óleo ($F=7,995$, $p=0,047$) e não houve diferença entre as camadas de profundidade (ANOVA, $F=4,477$, $p=0,101$). Os valores para cobertura das sequências variaram de 0,79 a 0,91 (Tabela 4).

Tabela 4 - Dados de riqueza e diversidade encontrados na região norte e obtidos através do sequenciamento por *Ion Torrent*.

Amostras	Número de sequências	Número de OTU _{0,03}	Chao1	Ace	Shannon	Simpson	Cobertura
N06-1	189850	3183	9503	18578	6,0	0,986	0,86
N06-2	7779	-	-	-	-	-	-
N11-1	86662	2910	12774	25903	6,1	0,990	0,86
N11-2	15457	2207	6543	11582	6,0	0,993	0,91
N12-1	2083	-	-	-	-	-	-
N12-2	144307	2912	8028	14093	6,0	0,989	0,88
N13-1	267600	3727	11806	23333	6,2	0,988	0,83
N13-2	223301	4272	16732	34833	6,4	0,990	0,79
N14-1	177717	3478	12047	23566	6,0	0,985	0,84
N14-2	53713	3124	8716	15877	6,1	0,987	0,86

Obs.: As amostras N06-2 e N12-1 não possuem resultados de riqueza e diversidade porque foram excluídas das análises por apresentarem baixo número de sequências.

As amostras N14-1, N06-1, N13-1 e N13-2 apresentaram comunidades microbianas mais similares, formando um agrupamento bem evidente no dendrograma (Figura 13). As amostras N14-2 e N12-2 foram mais similares entre si, mas menos quando comparada aos demais agrupamentos e as amostras N11-1 e N11-2 foram as que apresentaram menores valores de similaridade quando comparada as demais. A presença do óleo e a camada de profundidade no sedimento, correlacionadas individualmente com os dados biológicos não tiveram influência na composição das comunidades (Camada: $F_{1,7}=1,31$, $R^2=0,1875$, $P=0,188$; Óleo: $F_{1,7}=0,91$, $R^2=0,1306$, $P=0,474$), quando correlacionadas em conjunto o resultado se manteve (Camada:Óleo: $F_{1,7}=0,79$, $R^2=0,1127$, $P=0,711$). A ordenação das comunidades através do NMDS confirma os resultados (Figura 14), os pontos ficaram espalhados e os agrupamentos formados não separaram as comunidades pela presença do óleo e a camada de profundidade do sedimento.

Figura 13 - Dendrograma de similaridade das comunidades bactérias da região norte do platô de São Paulo. Matriz de distância construída a partir do método de Jaccard e utilizando as OTUs com *cutoff* de 0,03.

Figura 14 - Escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) entre as comunidades bacterianas presentes nas amostras com (azuis) e sem óleo (vermelhas), e profundidade no sedimento 1 cm (círculo) e 4 cm (triângulo), da região norte do platô de São Paulo. Matriz de distância construída a partir do método de Jaccard e utilizando as OTUs com *cutoff* de 0,03.

O número de sequências classificadas diminuiu com o aumento da resolução taxonômica, a maioria das sequências foram classificadas ao nível de filo (97,58%), seguido de uma pequena diminuição ao nível de classe (91%) e ordem (80,53%). A diminuição maior no número de sequências classificadas foi para os níveis de família e gênero, sendo que, menos de 20% das sequências foram classificadas ao nível de gênero (Tabela 5).

Tabela 5 - Número de sequências classificadas e não classificadas de acordo com o nível taxonômico.

Táxon	Classificadas	Não classificadas	% classificados
Filo	1140616	28256	97,58
Classe	1063727	105145	91,00
Ordem	941305	227567	80,53
Família	713329	455543	61,03
Gênero	226428	942444	19,37

Os filos mais abundantes a partir da abundância relativa foram Proteobacteria e Actinobacteria, em seguida apresentando valores menores estão Acidobacteria, Bacterioidetes, Chloroflexi e Gemmatimonadetes (Figura 15). As classes mais abundantes em todas as amostras foram Alphaproteobacteria (30%), Acidimicrobiia (18%), Gammaproteobacteria (16%), Deltaproteobacteria e Gemmatimonadetes (3%) (Figura 16), essas cinco classes também foram as dominantes em cada uma das amostras, exceto por algumas exceções (Tabela 6). As ordens mais abundantes entre as sequências de Alphaproteobacteria foram Rhodospirillales (42%), Rhizobiales (25%) e Rhodobacterales (12%). A classe Acidimicrobiia é composta por uma única ordem, Acidimicrobiales e a principal família encontrada foi OM1_clade (89%). Entre as sequências da classe Gammaproteobacteria, as ordens mais abundantes foram Xanthomonadales (41%), Chromatiales (10%) e Legionellales (4%).

Os 50 gêneros mais abundantes classificados estão apresentados na figura 17. Sendo que os principais foram *Pedomicrobium*, *Rhodobium* (ordem Rhizobiales), *Defluviicoccus*, *Tistlia*, *Pelagibius* (ordem Rhodospirillales) e *Nitrosococcus* (ordem Chromatiales) *Jannaschia* (ordem Rhodobacterales), *Marinicella* (classe Gammaproteobacteria), *Coxiella* (ordem Legionellales), *Nitrospira* e *Nitrosomonas* (classe Betaproteobacteria).

Figura 15 - Abundância relativa dos principais filos encontrados na região norte do platô de São Paulo, classificados utilizando o banco de dados do SILVA (QUAST et al., 2013).

Figura 16 - Abundância relativa das principais classes encontradas na região norte do platô de São Paulo, classificadas utilizando o banco de dados do SILVA (QUAST et al., 2013).

Figura 17 - Os 50 gêneros mais abundantes encontrados na região norte do platô de São Paulo. Dados referentes a abundância relativa dos gêneros classificados, os não classificados foram excluídos do gráfico.

Tabela 6 - Dez classes mais abundantes encontradas na região norte do Platô de São Paulo. Dados referentes a abundância relativa das classes classificadas, as não classificadas foram excluídas da tabela. Valores entre parêntese referentes a porcentagem do número total de sequências da amostra.

N06-1	N06-2	N11-1	N11-2	N12-1
Alphaproteobacteria (27)	Alphaproteobacteria (27)	Alphaproteobacteria (33)	Alphaproteobacteria (33)	Alphaproteobacteria (27)
Acidimicrobiia (22)	Gammaproteobacteria (14)	Acidimicrobiia (15)	Gammaproteobacteria (14)	Acidimicrobiia (21)
Gammaproteobacteria (18)	Acidimicrobiia (12)	Gammaproteobacteria (15)	Deltaproteobacteria (10)	Deltaproteobacteria (16)
Deltaproteobacteria (7)	Rubrobacteria (6)	Deltaproteobacteria (9)	Acidimicrobiia (7)	Gammaproteobacteria (14)
Gemmatimonadetes (2)	Bacilli (4)	Gemmatimonadetes (3)	Gemmatimonadetes (3)	Betaproteobacteria (3)
Cytophagia (1)	Gemmatimonadetes (4)	Rubrobacteria (2)	Actinobacteria (3)	Cytophagia (2)
Holophagae (1)	Deltaproteobacteria (4)	SAR202_clade (2)	Acidobacteria (2)	Gemmatimonadetes (1)
S085 (1)	Actinobacteria (4)	Acidobacteria (2)	SAR202_clade (2)	Actinobacteria (1)
Betaproteobacteria (1)	Betaproteobacteria (4)	Betaproteobacteria (1)	Holophagae (2)	Sphingobacteriia (1)
Acidobacteria (1)	Cytophagia (2)	Holophagae (1)	Betaproteobacteria (1)	Nitrospira (1)
N12-2	N13-1	N13-2	N14-1	N14-2
Alphaproteobacteria (34)	Alphaproteobacteria (28)	Alphaproteobacteria (27)	Alphaproteobacteria (33)	Alphaproteobacteria (32)
Gammaproteobacteria (17)	Acidimicrobiia (20)	Acidimicrobiia (18)	Acidimicrobiia (22)	Gammaproteobacteria (15)
Acidimicrobiia (10)	Gammaproteobacteria (15)	Gammaproteobacteria (17)	Gammaproteobacteria (13)	Acidimicrobiia (15)
Deltaproteobacteria (10)	Deltaproteobacteria (8)	Deltaproteobacteria (8)	Deltaproteobacteria (6)	Deltaproteobacteria (9)
Gemmatimonadetes (4)	Gemmatimonadetes (2)	Gemmatimonadetes (2)	Gemmatimonadetes (2)	Gemmatimonadetes (3)
SAR202_clade (2)	Acidobacteria (1)	Cytophagia (2)	Holophagae (2)	SAR202_clade (2)
Acidobacteria (2)	Anaerolineae (1)	Betaproteobacteria (1)	Acidobacteria (2)	Holophagae (2)
Holophagae (1)	Cytophagia (1)	Holophagae (1)	Cytophagia (1)	Acidobacteria (2)
Nitrospira (1)	Holophagae (1)	Acidobacteria (1)	S085 (1)	Cytophagia (1)
Cytophagia (1)	Betaproteobacteria (1)	Anaerolineae (1)	Betaproteobacteria (1)	S085 (1)

4 DISCUSSÃO

4.1 Distribuição espacial das comunidades de micro-organismos no Platô de São Paulo

Estudos recentes têm levantando a importância dos fatores espaciais na manutenção dos padrões de distribuição espacial das comunidades microbianas (GREEN; BOHANNAN, 2006; HANSON et al., 2012; LINDSTRÖM; LANGENHEDER, 2012; POP RISTOVA et al., 2014). Nesse estudo evidenciou-se que as comunidades microbianas respondem de diferentes maneiras de acordo com a distância geográfica entre as amostras e em diferentes escalas espaciais. Os baixos valores de similaridade entre as comunidades de arqueia e bactéria presentes nas regiões norte e sul (escala regional; > 250Km) indicam que há uma diferença entre as espécies que compõem as comunidades em cada região.

Além disso, a distância geográfica entre as regiões e para ambos os grupos é um importante fator na distribuição espacial das comunidades devido a limitação e os tipos de dispersão (e.g. ativa ou passiva) dos grupos microbianos. Esses resultados confirmam outros estudos relacionados a padrões espaciais bem conhecidos para comunidades de micro-organismos como *distance-decay*, no qual a similaridade descrese com o aumento da distância entre as amostras (MARTINY et al., 2011; NEKOLA; WHITE, 1999; SOININEN; MCDONALD; HILLEBRAND, 2007) e em diferentes habitats como, solos (RODRIGUES et al., 2013), lagos (LANGENHEDER; RAGNARSSON, 2007) rios (HEINO et al., 2014), ambientes marinhos (SCHAUER et al., 2010; ZINGER; BOETIUS; RAMETTE, 2014), entre outros.

Os valores de similaridades das comunidades localizadas dentro de cada região (escala local; 1-34Km) foram maiores quando comparados aos valores entre as regiões. Em escalas locais de estudo, a distribuição espacial está mais relacionada aos fatores locais das amostras (e.g. pH, temperatura, fontes de carbono, etc) (LINDSTRÖM; LANGENHEDER, 2012; POP RISTOVA et al., 2014), mas a distância geográfica entre as amostras da região norte também foi importante (Mantel; Bacteria $rM=0,6997$, $p=0,001$; Archaea $rM=0,5683$, $p=0,001$). Essa importância pode ser explicada pela presença do óleo proveniente da exsudação de asfalto, tornando o ambiente mais heterogêneo e modificando os fatores locais do ambiente (JONES et al., 2014). Essas mudanças permitem que vários grupos de organismos (micro- e macro-organismos) colonizem esse substrato e limitem a dispersão dos micro-organismos mesmo entre locais próximos. A distância também foi importante para as comunidades de arqueia na

região sul, podendo ser explicado pelos tipos de dispersão e seletividade aos fatores locais, das espécies que as compõem (BATES et al., 2011; MILFERSTEDT; YOUNGBLUT; WHITAKER, 2010).

Diferentes profundidades do sedimento possuem diferentes condições ambientais e consequentemente a composição das comunidades microbianas muda com o aumento da profundidade no sedimento (JACOB et al., 2013; MEYER et al., 2013). Nesse trabalho foram analisadas apenas duas camadas de profundidade no sedimento (0-1cm e 1-4cm), em pequenas distâncias as espécies de micro-organismos conseguem dispersar ativamente entre os grãos do sedimento através da divisão celular, crescimento das populações e motilidade entre as partículas do sedimento, o que pode explicar a não influência da distância na estruturação das comunidades (LONG; AZAM, 2001). Estudos procurando entender a organização espacial das comunidades microbianas em micro escalas estão ganhando cada vez mais importância, principalmente em ambientes terrestres (RAYNAUD; NUNAN, 2014; VOS et al., 2013).

Além disso, as variáveis ambientais entre as duas camadas mudam muito pouco, apenas em camadas de profundidade maiores que se começam a observar mudanças mais evidentes (BIDDLE et al., 2008, 2011; ORCUTT et al., 2011). Entretanto o número de células entre as camadas foi diferente, com uma tendência geral de diminuir com o aumento da profundidade, para as comunidades de bactéria e arqueia. Com o aumento da profundidade no sedimento as condições podem ficar mais anóxicas e o número de células também diminuiu devido a utilização de outros metabolismos (ORCUTT et al., 2011), as espécies são muito similares entre as camadas, mas o número de células diminui.

Os fatores regionais, como a distância geografia e a presença da exsudação de asfalto, foram importantes para estruturação das comunidades de bactéria e arqueia entre as regiões e dentro da região norte, mas os fatores locais também foram importantes para as comunidades da região norte devido à presença da exsudação de asfalto. Ambos os fatores são importantes na manutenção dos padrões de distribuição espaciais de micro-organismos e devem ser mais estudadas (HANSON et al., 2012; LINDSTRÖM; LANGENHEDER, 2012).

4.2 Composição das comunidades bacterianas influenciadas pela exsudação de asfalto na região norte do Platô de São Paulo

Sedimentos de mar profundo comumente apresentam comunidades microbianas muito diversas por serem altamente estáveis e homogêneos, além da alta disponibilidade de habitats e particionamento de recursos permitindo a coexistência de micro-organismos metabolicamente distintos (LOZUPONE; KNIGHT, 2007; ZINGER et al., 2011). Eventos históricos, como a migração de hidrocarbonetos acumulados abaixo do assoalho oceânico para a superfície do sedimento, podem causar mudanças nas condições ambientais, tornando o ambiente mais heterogêneo e selecionando as populações microbianas mais adaptadas (HANSON et al., 2012; NEMERGUT et al., 2013). Os resultados desse estudo mostraram que as comunidades influenciadas pela exsudação de asfalto, possuem padrões de diversidade similares as não diretamente influenciadas. Diferente do que era esperado, o óleo proveniente da exsudação de asfalto não alterou os valores de diversidade, exceto pelo resultado obtido para o índice de Simpson, indicando uma maior dominância das espécies mais abundantes nas amostras não influenciadas pelo óleo. O óleo pode ter criado condições para as populações das espécies menos abundantes e dormentes se desenvolverem, enquanto que nas amostras não influenciadas mantiveram-se as proporções (NEMERGUT et al., 2013). A composição das comunidades também não apresentou relação com a presença do óleo e com as camadas de profundidade. Cabe lembrar aqui que não é sabido se o pulso de expulsão de óleo para a superfície oceânica foi recente. Dessa forma as adaptações decorrentes da presença de hidrocarbonetos podem ainda não ser evidenciadas na comunidade microbiana.

Os índices de diversidade e estimadores de riqueza têm sido a muito tempo questionados sobre sua validade e utilidade para os estudos de ecologia (HILL, 1973; MAGURRAN, 2004), especialmente para ecologia microbiana. Em um trabalho recente HAEGEMAN et al., (2013) demonstraram que as métricas de diversidade altamente dependentes das espécies raras são muito susceptíveis a erros. O estimador de Chao1 por exemplo, é muito dependente do número de espécies raras, quando elas aumentam os valores estimados também aumento devido à incerteza nas estimativas. Os índices de diversidade de Shannon e Simpson são menos dependentes da quantidade de espécies raras porque, além da riqueza de espécies, eles também consideram os valores de abundância (equitabilidade). Os autores recomendam a utilização dos índices

diversidade para quantificar e comparar a diversidade taxonômica. Sendo assim, os índices de diversidade foram apresentados.

Classificar os micro-organismos taxonomicamente tem sido foco de muitas discussões, principalmente na definição de espécies, comumente definida em ecologia de micro-organismos, como 97% de similaridade do gene RNAr 16S (FRASER et al., 2009). Entretanto para estudos de ecologia que procuram compreender padrões de distribuição espaciais e temporais, níveis taxonômicos mais altos (e.g. filo e classe) são bons indicativos de características ecológicas que podem determinar a presença ou ausência de grupos nos mais variados ambientes (PHILIPPOT et al., 2010). Nesse trabalho foi encontrado um alto número de sequências classificadas para os níveis taxonômicos de filo e classe e para o nível de gênero foi baixo. Sendo que, ao nível de gênero o número de sequências não classificadas correspondeu a mais de 80%. Considerando as informações metabólicas específicas e gerais obtidas a partir dos níveis taxonômicos baixos e altos, respectivamente. Optou-se por discutir os principais filos, classes e gêneros encontrados nesse trabalho.

Os micro-organismos já relatados como os mais abundantes encontrados em sedimento de mar profundo pertencem aos filos Proteobacteria e Actinobacteria (MEYER et al., 2013; ORCUTT et al., 2011; POP RISTOVA et al., 2014; ZINGER et al., 2011). Nesse estudo os dois filos também compuseram a maior parte das sequências, mas diferente dos demais estudos em sedimentos de mar profundo, uma vez que as classes dominantes foram outras. As classes mais abundantes e comumente encontradas em sedimentos marinhos foram Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria e Planctomycetes (ZINGER et al., 2011), sendo que, a classe Gammaproteobacteria normalmente é a mais abundante, seguida da Deltaproteobacteria, em sedimentos marinhos não influenciados por exsudações. Entretanto, os resultados desse estudo mostraram que Alphaproteobacteria foi a classe dominante em todas as amostras, esse grupo normalmente é encontrado em sedimentos de mar profundo, mas em menores proporções (JAMIESON et al., 2013; NUNOURA et al., 2012; ZINGER et al., 2011). Estudos recentes têm mostrado um aumento na abundância de espécies de Alphaproteobacteria em ambientes marinhos impactados por óleo (MASON et al., 2014), como por exemplo em um experimento de microcosmos realizado por JUNG et al., (2010) no qual evidenciaram o aumento da abundância do gênero *Jannaschia* em resposta ao aumento na concentração de óleo bruto. Esse mesmo

gênero foi abundantes nas amostras desse estudo, sendo assim, o óleo proveniente da exsudação de asfalto pode ser o principal causador da inversão nas abundâncias entre Alpha- e Gammaproteobacteria.

Os organismos que compõem a classe Alphaproteobacteria possuem uma grande variedade de formas de vida, mutualismo com plantas, patógenos de plantas e animais e vida livre. Além de uma variedade de estratégias metabólicas, fotossintéticos, fixadores de nitrogênio, oxidantes de amônia e metilotróficos (DWORKIN et al., 2006; MADIGAN; MARTINKO; STAHL, 2010). Nesse estudo os gêneros *Pedomicrobium* e *Rhodobium* (ordem Rhizobiales) foram os mais abundantes.

O gênero *Pedomicrobium* é composto por organismos com morfologia de hifas, divisão por brotamento (*budding*) e metabolismo quimiorganotrófico, sendo que o principal metabolismo apresentado é o de oxidação de manganês (Mn^{2+}) (TEBO et al., 2005). No assoalho oceânico do Atlântico Sul e mais especificamente, próximo a região de estudo existe uma grande concentração de manganês no sedimento (AGUIAR et al., 2014), o que pode explicar os altos valores de abundância para o gênero *Pedomicrobium*. O gênero *Rhodobium* é composto por organismos com morfologia de bastonetes, divisão por brotamento e pertencem ao grupo das bactérias purpuras não-sulfurosas (DWORKIN et al., 2006; HIRAISHI; URATA; SATOH, 1995). Os gêneros *Defluviicoccus* e *Pelagibius* também pertencem a esse grupo e possuem metabolismos semelhantes (CHOI; HWANG; CHO, 2009; MASZENAN et al., 2005). Eles são fotossintéticos anoxigênicos, mas que também crescem na ausência de luz utilizando a fermentação ou respiração anaeróbica e são capazes de fixar nitrogênio (N_2). Essas bactérias são importantes componentes de ambientes marinhos profundos, sendo encontrado em sedimentos ou em simbiose a animais (SUN et al., 2014).

Outros gêneros encontrados e que também participam do ciclo do nitrogênio foram *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Tistlia*, e *Nitrospira*. Os gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrosococcus* são capazes de oxidar amônia (NH_3) em nitrito (NO^{2-}) e os gêneros *Tistlia* e *Nitrospira* oxidam nitrito (NO^{2-}) em nitrato (NO^{3-}) ambos em condições aeróbicas (DÍAZ-CÁRDENAS; PATEL; BAENA, 2010; MADIGAN; MARTINKO; STAHL, 2010). Os dois metabolismos compõem o ramo da nitrificação no ciclo do nitrogênio, sendo importantes agentes na produção de nitrato que será usado por outros micro-organismos principalmente na respiração anaeróbica e em outros ramos do ciclo do nitrogênio (e.g. denitrificação e assimilação) (FRANCIS; BEMAN; KUYPERS,

2007). Os micro-organismos envolvidos na nitrificação são comumente encontrados na coluna d'água, entretanto, estudos recentes têm encontrado genes relacionados ao ciclo do nitrogênio em ambientes marinhos profundos (BAKER et al., 2013) e em sedimentos impactados por derramamento de óleo (LU et al., 2012; MASON et al., 2014). Sendo assim, a presença do óleo e as condições ambientais da região de estudo podem ter criado condições ideais para os micro-organismos que participam do ciclo do nitrogênio, confirmando os resultados encontrados em outros locais.

O filo Actinobacteria representa uma linhagem filogenética bem definida de bactérias gram-positivas com alta proporção de G + C, elas têm sido encontradas em ambientes de água doce e marinhos, bentônicos e pelágicos. Nos ambientes marinhos pelágicos elas são abundantes e possuem uma abrangente distribuição, compondo uma parte do bacterioplankton (GHAI et al., 2013; MORRIS; FRAZAR; CARLSON, 2012) e em ambientes bentônicos, dependendo das condições, ele podem apresentar altos valores de abundância (BULL et al., 2005). Nesse estudo foi encontrado um grande número de sequências pertencentes à classe Acidimicrobiia, sendo que a maioria delas representam uma bactéria não classificada pertencente ao grupo OM1. Apesar de sequências pertencentes ao grupo OM1 serem frequentemente encontradas em ambientes marinhos, ainda pouco se sabe quais são suas funções e como eles contribuem para os ciclos biogeoquímicos (JENSEN; LAURO, 2008).

As comunidades microbianas em sedimentos marinhos estão associadas a fatores locais do sedimento como, conteúdo de oxigênio e de carbono, camadas do sedimento e influências hidrotermais (ORCUTT et al., 2011). Sendo assim, esperava-se que a presença do óleo tivesse influência na composição das comunidades, entretanto, apesar dos grupos taxonômicos encontrados estarem possivelmente associados a presença do óleo (e.g. Alphaproteobacteria), as análises de similaridade e os índices de diversidade entre as amostras não mostraram diferenças na composição das espécies entre as amostras.

5 CONCLUSÃO

Evidenciou-se que a distribuição espacial das comunidades microbianas em sedimentos de mar profundo é influenciada por fatores locais e regionais. A distância geográfica apresentou diferentes respostas nas comunidades microbianas de acordo com a escala de estudo. Na escala regional (entre as regiões norte e sul), os baixos valores de similaridade entre as comunidades de bactéria e arqueia são um indicativo da importância da distância geográfica na estruturação das comunidades microbianas. Sendo assim, a distância entre as regiões é suficiente para limitar a dispersão de alguns grupos de micro-organismos. Na escala local (dentro de cada região), a distância geográfica foi mais importante na região norte devido ao aumento da heterogeneidade ambiental possivelmente causada pela liberação de óleo na área de exsudação de asfalto. Isso pode ser confirmado para as comunidades de bactéria que apresentaram altos valores de abundância relativa para alguns grupos taxonômicos (e.g. Alphaproteobacteria), que são comumente encontrados em ambientes impactados por óleo. Entre as camadas de profundidade no sedimento, as comunidades microbianas foram muito similares e a distância geográfica não foi um importante fator na estruturação das comunidades nessa escala de estudo. A abundância de células microbianas diminuiu com o aumento na profundidade do sedimento, indicando uma mudança nas variáveis ambientais entre as camadas de profundidade.

Os filos mais abundantes foram Proteobacteria e Actinobacteria, sendo que a soma de suas abundâncias corresponde a aproximadamente 80% das sequências. Diferente de outros ambientes de sedimento marinho profundo, a classe Alphaproteobacteria foi a mais abundante, seguido por Acidimicrobiia, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Gemmatimonadetes. A maioria dos gêneros mais abundantes pertencem aos grupos das bactérias púrpuras não-sulfurosas (*Rhodobium*, *Defluviicoccus* e *Pelagibius*), das bactérias oxidantes de nitrogênio ou amônia (*Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosomonas* e *Tistlia*) e das oxidantes de manganês (*Pedomicrobium*). Os principais metabolismos encontrados estão relacionados ao ramo da nitrificação do ciclo do nitrogênio. A maioria das sequências de Acidimicrobiia pertence ao grupo OM1, que apesar de vários trabalhos também encontrarem micro-organismos desse grupo, pouco se sabe sobre seu metabolismo.

Por fim, a distância geográfica e a exsudação de asfalto foram importantes fatores para determinação da distribuição espacial das comunidades microbianas em sedimento

marinhos profundos do Platô de São Paulo. Mais estudos procurando compreender a composição geoquímica dos sedimentos e do óleo são necessários para explicar como esse fator influencia a estrutura das comunidades microbianas. Esse foi o primeiro trabalho de ecologia microbiana desenvolvido em sedimentos de mar profundo do sudoeste do oceano Atlântico Sul, contribuindo para o conhecimento dos padrões de diversidade das comunidades microbianas em ambientes de sedimento influenciadas por exsudação de asfalto.

REFERÊNCIAS¹

- AGUIAR, J. E. et al. The geostatistics of the metal concentrations in sediments from the eastern Brazilian continental shelf in areas of gas and oil production. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 51, p. 91–104, 2014.
- ANDERSON, M. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral ecology**, n. 2001, p. 32–46, 2001.
- BAAS BECKING, L. G. M. **Geobiologie of inleiding tot de milieukunde**. 1. ed. Den Haag, Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon, 1934. 263 p.
- BAKER, B. J. et al. Community transcriptomic assembly reveals microbes that contribute to deep-sea carbon and nitrogen cycling. **The ISME journal**, v. 7, n. 10, p. 1962–1973, 2013.
- BATES, S. T. et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **The ISME journal**, v. 5, n. 5, p. 908–917, 2011.
- BIDDLE, J. F. et al. Metagenomic signatures of the Peru Margin subseafloor biosphere show a genetically distinct environment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 30, p. 10583–10588, 2008.
- BIDDLE, J. F. et al. Metagenomics of the subsurface Brazos-Trinity Basin (IODP site 1320): comparison with other sediment and pyrosequenced metagenomes. **The ISME journal**, v. 5, n. 6, p. 1038–1047, 2011.
- BULL, A. T. et al. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 87, p. 65–79, 2005.
- CHOI, D. H.; HWANG, C. Y.; CHO, B. C. *Pelagibius litoralis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium in the family Rhodospirillaceae isolated from coastal seawater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 818–823, 2009.
- D'HONDT, S. et al. Subseafloor sedimentary life in the South Pacific Gyre. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 28, p. 11651–11656, 2009.
- DANOVARO, R.; SNELGROVE, P. V. R.; TYLER, P. Challenging the paradigms of deep-sea ecology. **Trends in ecology & evolution**, v. 29, n. 8, p. 465–475, 2014.
- DELONG, E. F. Archaea in coastal marine environments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 12, p. 5685–5689, 1992.

¹ De acordo com:

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

DÍAZ-CÁRDENAS, C.; PATEL, B. K. C.; BAENA, S. *Tistlia consotensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, chemoheterotrophic, free-living, nitrogen-fixing alphaproteobacterium, isolated from a Colombian saline spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1437–1443, 2010.

DWORKIN, M. et al. **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria**. 3. ed. New York: Springer, 2006. 919 p.

EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194–2200, 2011.

EDWARDS, K. J.; BECKER, K.; COLWELL, F. The Deep, Dark Energy Biosphere: Intraterrestrial Life on Earth. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 40, n. 1, p. 551–568, 2012.

FAITH, D. P.; MINCHIN, P. R.; BELBIN, L. Compositional dissimilarity as a robust measure of ecological distance. **Vegetatio**, v. 69, p. 57–68, 1987.

FRANCIS, C. A.; BEMAN, J. M.; KUYPERS, M. M. M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. **The ISME journal**, v. 1, p. 19–27, 2007.

FRASER, C. et al. The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. **Science**, v. 323, n. 5915, p. 741–746, 2009.

GANTNER, S. et al. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. **Journal of microbiological methods**, v. 84, n. 1, p. 12–18, 2011.

GHAI, R. et al. Metagenomics uncovers a new group of low GC and ultra-small marine Actinobacteria. **Scientific reports**, v. 3, p. 1–8, 2013.

GREEN, J.; BOHANNAN, B. J. M. Spatial scaling of microbial biodiversity. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, n. 9, p. 501–507, 2006.

HAEGEMAN, B. et al. Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. **The ISME journal**, v. 7, p. 1092–1101, 2013.

HANSON, C. A. et al. Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 497–506, 2012.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986–994, 1996.

HEINO, J. et al. Microbial diversity and community-environment relationships in boreal streams. **Journal of Biogeography**, v. 41, n. 12, p. 2234–2244, 2014.

HILL, M. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. **Ecology**, v. 54, n. 2, p. 427–432, 1973.

HIRAISHI, A.; URATA, K.; SATOH, T. A new genus of marine budding phototrophic bacteria, *Rhodobium* gen. nov., which includes *Rhodobium orientis* sp. nov. and *Rhodobium marinum* comb. nov. **International journal of systematic bacteriology**, v. 45, p. 226–234, 1995.

JACOB, M. et al. Biogeography of Deep-sea benthic bacteria at regional scale (LTER HAUSGARTEN, Fram Strait, Arctic). **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e72779, 2013.

JAMIESON, R. E. et al. Bacterial biodiversity in deep-sea sediments from two regions of contrasting surface water productivity near the Crozet Islands, Southern Ocean. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 75, p. 67–77, 2013.

JENSEN, P. R.; LAURO, F. M. An assessment of actinobacterial diversity in the marine environment. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 94, p. 51–62, 2008.

JONES, D. O. B. et al. Asphalt mounds and associated biota on the Angolan margin. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 94, p. 124–136, 2014.

JØRGENSEN, B. B.; BOETIUS, A. Feast and famine--microbial life in the deep-sea bed. **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 770–781, 2007.

JUNG, S. W. et al. Effects of crude oil on marine microbial communities in short term outdoor microcosms. **Journal of microbiology**, v. 48, n. 5, p. 594–600, 2010.

KATO, C. Distribution of Piezophiles. In: HORIKOSHI, K. . et al. (Eds.). . **Extremophiles Handbook**. 1. ed. Tokyo: Springer, 2011. p. 643–655.

KELLER, E. A. et al. Tectonic geomorphology and hydrocarbon induced topography of the Mid-Channel Anticline, Santa Barbara Basin, California. **Geomorphology**, v. 89, p. 274–286, 2007.

KNITTEL, K. et al. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 1, p. 467–479, 2005.

KNITTEL, K.; BOETIUS, A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 311–34, jan. 2009.

KONHAUSER, K. **Introduction to Geomicrobiology**. Malden: Blackwell Publishing, 2007. 425 p.

KREBS, C. J. **Ecological Methodology**. 2. ed. San Francisco: Benjamin/Cummings, 1999. 620 p.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Eds.). . **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: Wiley, 1991. p. 115–175.

- LANGENHEDER, S.; RAGNARSSON, H. The role of environmental and spatial factors for the composition of aquatic bacterial communities. **Ecology**, v. 88, n. 9, p. 2154–2161, 2007.
- LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. F. J. **Numerical Ecology**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Science, 1998. 852 p.
- LINDSTRÖM, E. S.; LANGENHEDER, S. Local and regional factors influencing bacterial community assembly. **Environmental Microbiology Reports**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2012.
- LONG, R.; AZAM, F. Microscale patchiness of bacterioplankton assemblage richness in seawater. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 26, p. 103–113, 2001.
- LOZUPONE, C. A; KNIGHT, R. Global patterns in bacterial diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 27, p. 11436–11440, 2007.
- LU, Z. et al. Microbial gene functions enriched in the Deepwater Horizon deep-sea oil plume. **The ISME Journal**, v. 6, p. 451–460, 2012.
- MACDONALD, I. R. et al. Asphalt volcanism and chemosynthetic life in the Campeche Knolls, Gulf of Mexico. **Science**, v. 304, n. 5673, p. 999–1002, 2004.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A. **Brock Biology of Microorganisms**. 13. ed. [s.l.] Benjamin Cummings, 2010. 1152 p.
- MADSEN, E. L. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 456–464, 2011.
- MAGURRAN, A. E. **Measuring Biological Diversity**. 3. ed. Malden, MA: Wiley-Blackwell, 2004. 264 p.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer research**, v. 27, n. 2, p. 209–220, 1967.
- MARTINY, J. B. H. et al. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 102–112, 2006.
- MARTINY, J. B. H. et al. Drivers of bacterial beta-diversity depend on spatial scale. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 19, p. 7850–7854, 2011.
- MASON, O. U. et al. Metagenomics reveals sediment microbial community response to Deepwater Horizon oil spill. **The ISME journal**, v. 8, n. 7, p. 1464–1475, 2014.
- MASZENAN, A. M. et al. Defluvicoccus vanus gen. nov., sp. nov., a novel Gram-negative coccus/coccobacillus in the “Alphaproteobacteria” from activated sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 2105–2111, 2005.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.

MEYER, S. et al. Microbial habitat connectivity across spatial scales and hydrothermal temperature gradients at Guaymas Basin. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 207, 2013.

MILFERSTEDT, K.; YOUNGBLUT, N. D.; WHITAKER, R. J. Spatial structure and persistence of methanogen populations in humic bog lakes. **The ISME journal**, v. 4, n. 6, p. 764–776, 2010.

MOROZOV, E. G. et al. **Abyssal Channels in the Atlantic Ocean: Water Structure and Flows**. [s.l.] Springer Netherlands, 2010. p. 266

MORRIS, R. M.; FRAZAR, C. D.; CARLSON, C. A. Basin-scale patterns in the abundance of SAR11 subclades, marine Actinobacteria (OM1), members of the Roseobacter clade and OCS116 in the South Atlantic. **Environmental microbiology**, v. 14, n. 5, p. 1133–1144, 2012.

MUYZER, G.; WAAL, E. C. DE; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993.

NEKOLA, J. C.; WHITE, P. S. The distance decay of similarity in biogeography and ecology. **Journal of Biogeography**, v. 26, p. 867–878, 1999.

NEMERGUT, D. R. et al. Patterns and processes of microbial community assembly. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 77, n. 3, p. 342–356, 2013.

NUNOURA, T. et al. Microbial Diversity in Deep-sea Methane Seep Sediments Presented by SSU rRNA Gene Tag Sequencing. **Microbes and Environments**, v. 27, n. 4, p. 382–390, 2012.

OKSANEN, J. et al. **vegan: Community Ecology Package**, 2013. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>>

ORCUTT, B. N. et al. Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. **Microbiology and molecular biology reviews MMBR**, v. 75, n. 2, p. 361–422, 2011.

PHILIPPOT, L. et al. The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 523–529, 2010.

POP RISTOVA, P. et al. Spatial scales of bacterial community diversity at cold seeps (Eastern Mediterranean Sea). **The ISME journal**, p. 1–13, 2014.

PYLRO, V. S. et al. Data Analysis for 16S Microbial Profiling from Different Benchtop Sequencing Platforms. **Journal of microbiological methods**, v. 107, p. 30–37, 2014.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Database issue, p. 590–596, 2013.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing, , 2014. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>>

RASKIN, L. et al. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 4, p. 1232–1240, 1994.

RAYNAUD, X.; NUNAN, N. Spatial Ecology of Bacteria at the Microscale in Soil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87217, 2014.

REEBURGH, W. S. Oceanic methane biogeochemistry. **Chemical reviews**, v. 107, n. 2, p. 486–513, 2007.

REYSENBACH, A.-L.; SHOCK, E. Merging genomes with geochemistry in hydrothermal ecosystems. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1077–1082, 2002.

RODRIGUES, J. L. M. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 3, p. 988–993, 2013.

ROTHBERG, J. M. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 348–352, 2011.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **BioTechniques**, v. 17, n. 5, p. 914–921, 1994.

SCHAUER, R. et al. Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean. **The ISME journal**, v. 4, n. 2, p. 159–170, 2010.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SMITH, C. J.; OSBORN, A. M. **Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology** FEMS Microbiology Ecology, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120456>>

SOININEN, J.; MCDONALD, R.; HILLEBRAND, H. The distance decay of similarity in ecological communities. **Ecography**, v. 30, n. 1, p. 3–12, 2007.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. 3. ed. New York: W. H. Freeman, 1995. 887 p.

STRAMMA, L.; ENGLAND, M. On the water masses and mean circulation of the South Atlantic Ocean. **Journal of Geophysical Research**, v. 104, p. 20863–20883, 1999.

SUN, W. et al. Pyrosequencing Reveals Diverse Microbial Community Associated with the Zoanthid *Palythoa australiae* from the South China Sea. **Microbial Ecology**, v. 67, p. 942–950, 2014.

TEBO, B. M. et al. Geomicrobiology of manganese(II) oxidation. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 421–428, 2005.

VALENTINE, D. L. et al. Asphalt volcanoes as a potential source of methane to late Pleistocene coastal waters. **Nature Geoscience**, v. 3, n. 5, p. 345–348, 2010.

VOS, M. et al. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, p. 936–954, 2013.

WEILAND, R. J. et al. **Geological and Biological Relationships in the Puma Appraisal Area: from Salt Diapirism to Chemosynthetic Communities**. Offshore Technology Conference. **Anais...** Houston, Texas, USA: 2008

WILLIAMSON, S. C.; ZOIS, N.; HEWITT, A. T. **Integrated site investigation of seafloor features and associated fauna, Shenzi Field, Deepwater Gulf of Mexico**. Offshore Technology Conference. **Anais...** Houston, Texas, USA: 2008

ZEHR, J. P.; KUDELA, R. M. Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems. **Annual review of marine science**, v. 3, p. 197–225, 2011.

ZINGER, L. et al. Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24570, 2011.

ZINGER, L.; BOETIUS, A.; RAMETTE, A. Bacterial taxa-area and distance-decay relationships in marine environments. **Molecular ecology**, v. 23, n. 4, p. 954–964, 2014.