JULIA GASPARINI PASSOS

Processos microbianos do ciclo do carbono em exsudações frias no mar profundo (Atlântico Sudoeste)

São Paulo

2023

JULIA GASPARINI PASSOS

Processos microbianos do ciclo do carbono em exsudações frias no mar profundo (Atlântico Sudoeste)

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

Orientador: Prof. Dra. Camila Negrão Signori

São Paulo

2023

PASSOS, Julia Gasparini. **Processos microbianos do ciclo do carbono em exsudações frias no mar profundo (Atlântico Sudoeste)**. Dissertação (Mestrado) apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

Aprovado em: ___/___/_____.

Versão Corrigida

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição_____

Julgamento_____ Assinatura_____

Prof. Dr. _____ Instituição_____

Julgamento_____ Assinatura_____

Prof. Dr. _____ Instituição_____

Julgamento_____ Assinatura_____

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Oceanográfico, pela oportunidade de realização do curso.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Universidade de São Paulo (FUSP) pela concessão de bolsa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Essa pesquisa foi realizada em associação projeto P&D registrado como ANP 21012-0, "MARINE LIFE - BMC - OIL AND GAS SEEPS (BIOIL)" (Universidade de São Paulo / Shell Brasil / ANP) – Avaliação da Biologia e Geoquímica de Exsudações de Óleo e Gás na Costa Sudeste do Brasil, patrocinado pela Shell Brasil sob a P&D da ANP como "Compromisso de Investimentos com Pesquisa e Desenvolvimento".

Agradeço à Profa. Dra. Camila Negrão Signori pela orientação, pela paciência e apoio no meu trabalho durante esse período. É uma honra ter sido orientada por alguém tão dedicada e entusiasmada pela Oceanografia!

Á todos os integrantes do Microcean Lab, pelo apoio e acolhimento, principalmente à minha colega de projeto, Luiza, pelo apoio durante esses anos de BIOIL.

À as meninas do LECOM, pela ajuda durante e após os embarques.

À todos outros grupos de pesquisa que firzeram parte do projeto BIOIL, especialmente ao grupo da Profa. Dra. Vivian H. Pellizari, Prof. Dr. Michel de Mahiques e Prof. Rafael Lourenço pelos dados de parâmetros ambientais.

À Flávia e Maísa pelo apoio para a preparação dos embarques e por ajudar a esclarecer qualquer dúvida de laboratório.

À Paulinha pela ajuda para conseguir a bolsa FUSP.

Agradeço aos meus pais pelo apoio e por me fornecerem uma educação de qualidade.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

PASSOS, Julia Gasparini. **Processos microbianos do ciclo do carbono em exsudações frias no mar profundo (Atlântico Sudoeste)**. 2023. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

No mar profundo, a produção primária quimiossintética (PPQ) é uma fonte de carbono lábil, enquanto a produção microbiana heterotrófica (PMH) reintroduz a matéria orgânica dissolvida na cadeia trófica pela alça microbiana. Este estudo tem como objetivo investigar a relevância desses processos e elucidar as principais vias metabólicas nas exsudações frias e arredores na Bacia de Santos, Atlântico Sudoeste. As amostras foram coletadas ao longo de dois cruzeiros a bordo do Noc. Alpha Crucis. No primeiro cruzeiro (BIOIL 1), a PPQ e PMH foram estimadas em três profundidades, compreendendo a zona epipelágica e mesopelágica, e em sedimentos. No segundo cruzeiro (BIOIL 2), foi determinado apenas o PPQ para a coluna d'água e, além disso, foram realizados experimentos em microcosmos da PPQ para quatro tratamentos diferentes (amônio, nitrito, tiossulfato e acetato). PPQ e PMH foram determinadas pela incorporação de ^{14}C-bicarbonato e ^{3}H-leucina, respectivamente, em temperaturas *in situ* simuladas no escuro. Contudo, neste estudo, não foram identificadas exsudações frias na Bacia de Santos, mas foi possível coletar amostras das zonas pelágicas e bentônicas usuais. Na zona pelágica, a PPQ variou de 5,22 x 10^{0} a 3,24 x 10^{2} µgC.m^{-3}.h^{-1}, que foram até quatro ordens de magnitude inferiores à PMH, que variou de 1,26 x 10^{2} a 1,48 x 10^{4} µgC.m^{-3}.h^{-1}. Nos sedimentos, a PPQ variou de 1,15 x 10^{4} a 1,83 x 10^{5} µgC.m^{-3}.h^{-1}, enquanto o HMP foi até quatro ordens de magnitude menor, de 3,22 x 10^{1} a 1,56 x 10^{3} µgC.m^{-3}.h^{-1}. Comparada com outras bacias oceânicas, a coluna d'água da Bacia de Santos apresenta taxas relativamente superiores de PPQ; no entanto, zona bentônica se mostrou como o local com maiores taxas quimioautotróficas devido à uma maior disponibilidade de fontes de energia nos sedimentos do que na água oligotrófica acima. O PMH teve um padrão oposto, com maiores taxas na zona pelágica, provavelmente devido a associação da heterotrofia com a produção primária fotossintética na camada eufótica. Embora a via quimioautotrófica preferencial permaneça incerta em mar profundo, os experimentos de microcosmos indicam que, na zona pelágica da Bacia de Santos, o PPQ é principalmente estimulado pela adição de amônio – via oxidação de amônio, mas também possui um potencial para redução da oxidação de enxofre em condições específicas. Este estudo representa novos *insights* sobre os processos microbianos do Oceano Atlântico

Sudoeste, o que reforça a necessidade da inclusão do PPQ nas estimativas globais do ciclo do carbono.

Palavras-chave: Produção primária quimiossintética. Produção microbiana heterotrófica. Ciclo do carbono marinho. Zonas pelágicas e bentônicas.

ABSTRACT

PASSOS, Julia Gasparini. **Processos microbianos do ciclo do carbono em exsudações frias no mar profundo (Atlântico Sudoeste)**. 2023. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

In the deep ocean, the chemosynthetic primary production (PPQ) is a source of new and labile carbon, while the heterotrophic microbial production (PMH), reintroduces dissolved organic matter into the food chain through the microbial loop. This study aims to investigate the relevance of these processes and enlighten the metabolic pathway of PPQ in cold seep and surroundings of the Santos Basin, Southwestern Atlantic Ocean. The samples were collected throughout two cruises aboard of the R/V Alpha Crucis. In the first cruise (BIOIL 1), the PPQ and PMH were estimated in three water depths, comprising the epipelagic and mesopelagic, and in sediments. In the second cruise (BIOIL 2), only the PPQ was determined for the water column and, in addition, a microcosms experiment was performed for four different amendments (ammonium, nitrite, thiosulphate and acetate). PPQ and PMH rates were measured by ^{14}C-bicarbonate and ^{3}H-leucine incorporation, respectively, and incubated *in situ* simulated temperatures, in the dark. However, no active cold seep were identified in the Santos Basin in this study, but it was still possible to sample the usual pelagic and benthonic zones. In the pelagic zone, the PPQ ranged from 5.22 x 10^{0} to 3.24 x 10^{2} µgC.m^{-3}.h^{-1}, which were up to four orders of magnitude lower than the PMH, which varied from 1.26 x 10^{2} to 1.48 x 10^{4} µgC.m^{-3}.h^{-1}. In the sediments, the PPQ ranged from 1.15 x 10^{4} to 1.83 x 10^{5} µgC.m^{-3}.h^{-1}, while HMP was up to four orders of magnitude lower, 3.22 x 10^{1} to 1.56 x 10^{3} µgC.m^{-3}.h^{-1}. Compared with other ocean basins, the water column of the Santos Basin has relatively higher rates of PPQ; however, the benthic zone had shown to be the prime location for the chemoautotrophy due to higher availability of energy sources in the sediments than in the oligotrophic water above. The PMH had an opposite pattern, with higher rates in the pelagic zone likely due the relation of heterotrophs with the photosynthetic primary production in the euphotic layer. Although the preferential chemoautotrophic pathway remains uncertain in the deep ocean, the microcosms experiments indicate that, in the pelagic realm of the Santos Basin, the PPQ is mostly stimulated with ammonium amendments – via ammonium oxidation, but with the potential for reduced sulfur oxidation in specific conditions. This study represents new insights into the microbial

processes of the Southwestern Atlantic Ocean, which reinforces the need for the inclusion of the PPQ in global carbon cycle estimations.

Keywords: Chemosynthetic primary production. Heterotrophic microbial production. Marine carbon cycle. Pelagic and benthic zones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização das estações oceanográficas realizadas durante o BIOIL 1 (vermelho) e 2 (preto).....8

Figura 2 - Esquerda: processo de filtração das amostras de água em kit de filtração manifold. Direita: membrana (0,22 µm) após o processo de filtração, sendo armazenada em criotubo para, em seguida, ser congelada à -80°C.....10

Figura 3 - Amostras de sedimento no processo de aeração com HCl 1% para remoção do CO_2 remanescente.....10

Figura 4 - Amostras em sucessivas etapas de centrifugação para a precipitação de proteína.....12

Figura 5 - Vials de cintilação a serem analisados no contador cintilador líquido (Packard Tricarb 2100 TR) 13

Figura 6 - Esquema metodológico do experimento em microcosmos realizado no BIOIL 2. 14C: ^{14}C-bicarbonato ($NaH^{14}CO_3$), Formol: controle fixado com formaldeído 2%, Sem adição: apenas com ^{14}C-bicarbonato, TS: tiossulfato de sódio, AM: cloreto de amônio, NT: nitrito de sódio, AC: acetato de sódio.....14

Figura 7 - Diagrama temperatura-salinidade espalhado para o talude da Bacia de Santos durante o BIOIL 1 (esquerda) durante novembro, 2019; e o BIOIL 2 (direita) durante julho, 2022.....16

Figure 8 – Concentrações dos nutrientes: fosfato, silicato, nitrato, nitrito e amônio representadas em $\mu mol.L^{-1}$ por profundidade aproximada (m) da coluna d'água. Concentrações representadas como média ± desvio padrão.....17

Figure 9 – Carbono orgânico total, nitrogênio total, conteúdo de Carbonato de Cálcio (%) e $\delta_{13}C$ (‰) por estrato de sedimento, representados como média ± desvio padrão.....18

Figura 10 - Produção Primária Quimiossintética média ± desvio padrão ($\mu gC.m^{-3}.h^{-1}$) da coluna d'água do BIOIL 1, por zona pelágica (A) e área (B). Produção Microbiana Heterotrófica média ± desvio padrão ($\mu gC.m^{-3}.h^{-1}$) da coluna d'água do BIOIL 1, por profundidade (C) e área (D). Pontos representam observações independentes.....19

Figura 11 - Produção Primária Quimiossintética média ± desvio padrão ($\mu gC.m^{-3}.h^{-1}$) do sedimento do BIOIL 1, por zona pelágica (A) e área (B). Produção Microbiana Heterotrófica média ± desvio padrão ($\mu gC.m^{-3}.h^{-1}$) do sedimento do BIOIL 1, por profundidade (C) e área (D). Pontos representam observações independentes.....20

Figura 12 - Produção Primária Quimiossintética média ± desvio padrão ($\mu gC.m^{-3}.h^{-1}$) da coluna d'água do BIOIL 1. Pontos representam observações independentes.....21

Figura 13 - Produção Primária Quimiossintética média ± desvio padrão ($\mu gC.m^{-3}.h^{-1}$) da coluna d'água do BIOIL 1 e 2. Pontos representam observações independentes.....21

Figura 14 - Gráfico da correlação entre a produção primária quimiossintética (PPQ) e produção microbiana heterotrófica (PMH) na coluna d'água.....22
Figura 15 - Análise de componentes principais para a coluna d'água da Bacia de Santos durante o BIOIL 1 com vetores de produção primária quimiossintética (PPQ), produção microbiana heterotrófica (PMH), profundidade, salinidade, fosfato, silicato, nitrato, nitrito e amônio.....23
Figura 16 - Gráfico da correlação entre a produção primária quimiossintética (PPQ) e carbono orgânico total (COT), produção microbiana heterotrófica (PMH) e COT e nitrogênio total (NT) em sedimento.....24
Figura 17 – Gráfico da correlação entre a produção primária quimiossintética (PPQ) e produção microbiana heterotrófica (PMH) no sedimento.....24
Figura 18 - Análise de componentes principais para o sedimento da Bacia de Santos durante o BIOIL 1 com vetores de produção primária quimiossintética (PPQ), produção microbiana heterotrófica (PMH), conteúdo de areia, lama e carbonato de cálcio ($CaCO_3$), $\delta_{13}C$, carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT).....25
Figura 19 - Razão das taxas de produção primária quimiossintética (PPQ) obtidas nos diferentes tratamentos dividida pelo controle da PPQ. Valores acima da linha y = 1 representam uma resposta ao tratamento com o específico nutriente.....26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 5

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 5

3. MATERIAIS E MÉTODOS 6

3.1. ÁREA DE ESTUDO 6

3.2. AMOSTRAGEM 6

3.2.1. BIOIL 1 6

3.2.2. BIOIL 2 7

3.3. VARIÁVEIS AMBIENTAIS 8

3.4. PRODUÇÃO PRIMÁRIA QUIMIOSSINTÉTICA (PPQ) 9

3.5. PRODUÇÃO MICROBIANA HETEROTRÓFICA (PMH) 11

3.6. EXPERIMENTO PILOTO EM MICROCOSMOS 13

3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS 15

4. RESULTADOS 16

4.1. VARIÁVEIS AMBIENTAIS 16

4.2. PROCESSOS MICROBIANOS 18

4.3. ANÁLISES MULTIVARIADAS 22

4.4. EXPERIMENTO PILOTO EM MICROCOSMOS 26

5. DISCUSSÃO 27

5.1. DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL 27

5.2. EXPERIMENTO EM MICROCOSMOS 31

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 34

6.1. CONCLUSÃO 34

6.2. TRABALHOS FUTUROS 35

REFERÊNCIAS 36

APÊNDICE 49

1. INTRODUÇÃO

O mar profundo é um ambiente altamente conectado, com ligações à atmosfera, ao oceano superior e bacias oceânicas (LEVIN et al., 2019), estando nele os principais ambientes hipóxicos e anóxicos da Terra (DANOVARO et al., 2014). Abaixo de 200 m, mudanças no ambiente físico, redução no suprimento de alimentos e a ausência de algas fotossinteticamente típicas levam a alterações da composição taxonômica dos seres vivos, morfologias dos organismos, atividade metabólica e fluxos de energia no mar profundo, tanto na coluna de água (HERRING, 2002) quanto no sedimento (DANOVARO et al., 2014).

Nos últimos anos, novas tecnologias como *remotely operated vehicles* (ROVs) e *autonomous underwater vehicles* (AUVs) facilitaram nossa capacidade de estudar o mar profundo, no entanto, por razões históricas e econômicas, o oceano profundo ainda permanece sub-amostrado, particularmente no Hemisfério Sul (LLODRA et al., 2003; LEVIN et al., 2019; FRAZÃO et al., 2021). Frazão et al. (2021) revisou publicações sobre ecologia microbiana no Oceano Atlântico Sul e, apesar do aumento do esforço científico nas últimas décadas, a quantidade de publicações ainda é baixa, de apenas 38, quando comparadas com as 209 do Atlântico Norte.

Existe uma quantidade ainda inferior de estudos publicados sobre *cold seeps* do que outros ecossistemas de mar profundo, como fontes hidrotermais. Os primeiros relatos de *cold seeps*, ou exsudações frias, foram feitos há cerca de 40 anos por Paull et al. (1984) no Golfo do México. Com base em buscas bibliográficas, encontrou-se que as pesquisas nesses ambientes se concentram no Oceano Pacífico e Atlântico Norte (ex: PAULL et al.,1984; DAS et al., 2011; VIGNERON et al., 2015; SEABROOK et al., 2017), enquanto que o Hemisfério Sul recebe menor atenção e/ou investimento, com alguns relatos na costa da África, Peru, Chile e Nova Zelândia (ex: LLODRA et al., 2003; THURBER et al., 2009; OLU-LE ROY et al., 2019).

Apesar disso, sua ocorrência é ampla, estando presente em ambas as margens continentais ativas e passivas, nas dorsais meso-oceânicas, montes submarinos, margens de plataformas continentais e até fossas oceânicas (LLODRA et al., 2003; LEVIN et al., 2016). Também se encontram associados a diversas estruturas geológicas, como *pockmarks*, diápiros de sal, montes carbonáticos e *brine pools* (CERAMICOLA et al., 2018). Essas exsudações frias são caracterizadas pelo escape de hidrocarbonetos do assoalho oceânico, frequentemente sendo abastecido por um reservatório em subsuperfície de gás metano ou enxofre (SMITH, 2012; LE

BRIS et al., 2016). Essa migração de hidrocarbonetos ocorre devido a processos de subducção de placas, formação de diápiros, compressão pelos sedimentos ou a dissociação de hidratos de gás (LE BRIS et al., 2016).

Evidências biológicas e geológicas indicam que esses ecossistemas podem ser comuns na costa brasileira. Recentemente, houve a descoberta de escape de gás metano junto de uma comunidade biológica quimiossintética típica de *cold seeps* no Cone de Rio Grande, na Bacia de Pelotas (GIONGO et al., 2016). Além disso, Sumida et al. (2004) registraram a presença de um poliqueta (*Amelinna* sp.) que geralmente habita ecossistemas redutores, indicando também a ocorrência desses ambientes na Bacia de Santos. Posteriormente, uma série de estruturas geomorfológicas que atestam a presença de óleo e gás em subsuperfície foram descobertas nessa mesma região, como *pockmarks* e diápiros de sal (DE MAHIQUES et al., 2017) e a descoberta do Monte Carbonático Alpha Crucis (MALY et al., 2019).

Ambientes redutores possuem energia e carbono limitado, devido à isso, houve a necessidade da adaptação da microbiota de mar profundo. Por exemplo, os micro-organismos quimioautotróficos (fixadores de carbono no escuro), que obtêm carbono de fontes inorgânicas e sua energia da oxidação de substratos inorgânicos, como enxofre, ferro ou nitrogênio. Em mar profundo, seu principal papel é de produtor primário de novos materiais orgânicos, fornecendo alimento e energia para os demais níveis da teia trófica (HERRING, 2002). No oceano, a quimiossíntese tem sido estudada principalmente em interfaces óxicas-anóxicas (TAYLOR et al., 2001), nas fontes hidrotermais profundas (SIEVERT & VETRIANI, 2012; MCNICHOL et al., 2018) e exsudações frias (VIGNERON et al., 2015; SAVVICHEV et al., 2018), isso é devido a necessidade desses microrganismos à presença de compostos oxidados e reduzidos para fixar o carbono inorgânico em ambientes afóticos (carbono escuro) (ENRICH-PRAST et al., 2014). Esse processo ocorre por diversas vias metabólicas: ciclo de Calvin Benson Bassham (CBB), ciclo redutor do ácido tricarboxilico (rTCA), via redutiva do acetil-CoA (Wood-Ljungdahl, WL), ciclo de 3-hidroxipropionato (3HP) e 3-hidroxipropionato/4-hidroxibutirato (3HP/4HB) (HÜGLER & SIEVERT, 2011).

Nas exsudações frias, devido à alta concentração de substâncias redutoras, o sedimento é geralmente colonizado por micro-organismos quimiossintetizantes - bactérias e arqueias - formadores de tapetes microbianos, que se distribuem em mosaicos de variados tamanhos (LEVIN, 2005; ORCUTT et al. 2011). As comunidades de *cold seeps* apresentam, principalmente, micro-organismos aeróbicos e anaeróbicos que oxidam metano, enxofre

reduzido e fixam nitrogênio (LEVIN, 2005). Essas regiões são dominadas por bactérias da classe Deltaproteobacteria – que são em sua maioria redutoras de enxofre – e arqueias do grupo Methanomicrobia – compreendendo organismos metanogênicos e metanotróficos (ORCUTT et al., 2011).

Além disso, descobertas recentes revelaram a crescente necessidade de esforços na quantificação e compreensão da fixação de carbono no escuro na coluna d'água óxica (ex., REINTHALER et al., 2010; SWAN et al., 2011; HERNDL & REINTHALER, 2013; BALTAR et al., 2016). No ambiente pelágico, a quimioautotrofia está relacionada ao metabolismo do nitrogênio por bactérias oxidantes de nitrito e arqueias oxidantes de amônia (MIDDELBURG, 2011; PACHIADAKI et al., 2017), com uma pequena contribuição da oxidação de enxofre reduzido. Na camada d'água do Atlântico Sudoeste, a quimiossíntese é dominada por bactérias da classe Gammaproteobacteria e do filo Nitrospinota, e arqueias da classe Nitrososphaeria (JUNIOR, et al., 2015; COUTINHO et al., 2021; BENDIA et al., 2021). Entretanto, no sedimento, a quimiossíntese está associada a oxidação de enxofre reduzido, particularmente sulfeto (MIDDELBURG, 2011; DYSKMA et al., 2016) por Gammaproteobacteria, com uma pequena contribuição da oxidação de nitrogênio (DYSKMA et al., 2016; BENDIA et al., 2021).

Assim como as bactérias e arqueias quimiossintetizantes, os micro-organismos heterotróficos, atuando pela alça microbiana, são igualmente fundamentais para o ciclo do carbono marino. A microbiota heterotrófica, composta tanto por bactérias quanto arqueias, é responsável por consumir a matéria orgânica dissolvido (MOD) - proveniente dos produtores primários – e transforma-la em matéria orgânica particulada (MOP) (AZAM et al., 1983). Desta forma, o carbono, antes inacessível, é reintroduzido na cadeia trófica e passa a ser transferível a níveis tróficos superiores (AZAM et al., 1983). A zona eufótica, onde os processos de produção primária ocorrem de forma intensificada, exporta a matéria orgânica para camadas mais profundas da coluna d'água, por meio da advecção vertical do MOD e do afundamento de MOP, como pelotas fecais, neve marinha, fitodetritos (TURNER, 2015). Nesse transporte, a matéria orgânica é remineralizada pela microbiota da coluna d'água, que desta forma, conecta diferentes zonas pelágicas (ROBINSON, 2008). Parte desse material pode vir a alcançar o sedimento, o qual possui uma grande biomassa e diversidade de micro-organismos, que em grande parte são heterotróficos (MAHMOUNDI et al., 2020), e aproveitam tanto a matéria orgânica proveniente do ambiente pelágico quanto a que é produzida no próprio sedimento.

Além do seu papel na alça microbiana, os micro-organismos heterotróficos podem participar da fixação de carbono inorgânico via reações anapleróticas do ciclo do ácido tricarboxilico (TCA) (ALONSO-SÁEZ et al., 2010). A dimensão dessas reações é principalmente determinada pela disponibilidade de carbono orgânico lábil (REINTHALER et al., 2010), visto que as enzimas envolvidas aumentam com o *input* de matéria orgânica (BALTAR et al., 2016).

Os *seeps* são conhecidos por serem muito produtivos e por possuírem micro-organismos quimiolitoautotróficos na base da cadeia trófica (TUNNICLIFFE et al., 2003), que fornecem matéria orgânica para os organismos heterotróficos; de forma que a produtividade desses ecossistemas foi vista como sendo contribuinte para a pesca de certos locais (LEVY & LEE, 1988). Além disso, o fluxo de energia proporcionado por esses ecossistemas constitui relevantes fontes e/ou sumidouros de carbono e enxofre nos ciclos biogeoquímicos e no balanço termal global (LEVIN et al., 2016).

Como mencionado anteriormente, as pesquisas em mar profundo no Atlântico Sudoeste ainda estão incompletas, isso inclui a descoberta e a descrição de comunidades microbianas quimiossintéticas. Entretanto, o uso de abordagens baseadas em radioisótopos, associada a exposição dos micro-organismos a diferentes tratamentos, proporcionarão um melhor panorama e entendimento da produtividade desses ambientes, clarificando processos quimioautotróficos e heterotróficos, e a conexão do *input* de nutrientes com as vias metabólicas associadas ao ciclo do carbono (HALLAM et al., 2006; BERG et al., 2007; BALTAR et al., 2016; DYKSMA et al., 2016).

2. OBJETIVOS

Neste cenário, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de comunidades microbianas na produção de matéria orgânica via quimiossíntese, a atividade heterotrófica local, e elucidar as principais vias metabólicas nas exsudações frias e arredores na Bacia de Santos, Atlântico Sudoeste.

2.1. Objetivos Específicos

- Determinar as taxas de produção primária quimiossintética, em coluna d'água e sedimento;
- Determinar as taxas de produção microbiana heterotrófica, em coluna d'água e sedimento;
- Comparar as taxas estimadas entre si e entre as diferentes áreas e profundidades/estratos amostrados;
- Analisar a variação das taxas estimadas em relação as variáveis ambientais aferidas.
- Verificar a resposta das taxas de quimiossíntese aos diferentes tratamentos do experimento piloto em microcosmos.

Este estudo ocorreu no escopo do Projeto BIOIL – *Biology and Geochemestry of Oil and Gas Seepages*, financiado pela empresa petrolífera Shell, cujo objetivo principal era de descobrir e caracterizar áreas de *cold seep* na Bacia de Santos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo

A Bacia de Santos se localiza no Oceano Atlântico Sudoeste, e está compreendida entre a costa Estado do Rio de Janeiro (Alto de Cabo Frio - 23° S) até o Estado de Santa Catarina (Plataforma de Florianópolis - 28° S), totalizando uma área estimada em 350.000 km^2 (MOREIRA et al., 2007). Os padrões de circulação e empilhamento de massas d'água são bem definidos no Atlântico Sul; na camada superficial há o predomínio da Corrente do Brasil (CB), uma corrente de contorno oeste que se inicia na latitude de 10° S, com alta salinidade e temperatura, e características oligotróficas (SILVEIRA et al., 2000). Ela exerce grande influência nas porções da plataforma externa e principalmente no talude superior (DELLA GIUSTINA, 2006). Na Bacia de Santos, a CB flui para Sul e promove o transporte da Água Tropical (AT) e Água Central do Atlântico Sul (ACAS). A AT é uma massa d'água superficial, que possui temperatura superior à 20 ºC e salinidade acima de 36 (EMILSON, 1961). A ACAS ocorre até 550 m de profundidade, com temperatura entre 6-20 ºC e salinidade entre 34,6-36 (MIRANDA, 1982; STRAMMA & ENGLAND, 1999). Abaixo da CB, a Corrente de Contorno Intermediário (CCI) transporta a Água Intermediária Antártica (AIA) em direção ao equador (BOEBEL et al., 1997; LEGEAIS et al., 2013). A AIA ocorre até 1200 m de profundidade, possuindo temperatura entre 3-6, salinidade entre 34,2-34,6 e alto teor de oxigênio dissolvido (SVERDRUP et al., 1942; STRAMMA & ENGLAND, 1999). Abaixo da AIA, a Água Profunda do Atlântico Norte (APAN) é transportada pela Corrente de Contorno Profunda (CCP), ocupando profundidades de até 3000 m ao largo do sudeste brasileiro (STRAMMA & ENGLAND, 1999; SILVEIRA et al., 2000; LEGEAIS et al., 2013).

3.2. Amostragem

3.2.1. BIOIL 1

A primeira expedição oceanográfica do projeto BIOIL (SUMIDA et al., 2022) ocorreu entre 11 e 25 de novembro de 2019, com apoio logístico do navio de pesquisa *Alpha Crucis* (Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo). Foram realizadas 12 estações oceanográficas na Bacia de Santos (Figura 1, detalhado no Apêndice A e B), abrangendo isóbatas de 400 m até 800 m. As estações oceanográficas foram estrategicamente divididas em três áreas com diferentes estruturas geomorfológicas: área 1 (estações 681, 682, 683 e 684) com potencial para *pockmarks* ativos (MALY et al., 2019); área 2 (estações 685, 686, 687 e 688)

associadas com o Monte Carbonático *Alpha Crucis* (MALY et al., 2019); área 3 (estações 690, 691, 692 e 693) associadas com *pockmarcks* e diápiros de sal (SCHATTNER et al., 2016; DE MAHIQUES et al., 2017; SCHATTNER et al., 2018; RAMOS et al., 2019). O cruzeiro se iniciou nas estações localizadas no extremo nordeste (área 1), onde havia um maior potencial de se encontrar exsudações ativas.

Diariamente, antes de qualquer lançamento de equipamentos e coleta de amostras, foram realizados levantamentos geofísicos com uso de *multibeam* e perfilador acústico de 3,5 kHz. Após a inspeção geofísica da área, foram realizadas as coletas de amostras de água e sedimento para a determinação das Variáveis Ambientais (Tópico 2.3.) PPQ (Tópico 2.4.) e PMH (Tópico 2.5.). A água foi coletada em uma profundidade do epipelágico (~40 m) e duas profundidades do mesopeágico (~250 m e ~600 m), com uso do sistema Sea-Bird 911 CTD-Rosette equipado com 12 garrafas Niskin de 10 L. Amostras de sedimento foram coletadas em três estratos: 0-5, 5-10 e 10-15 cm, com o uso de Box-corer (Ocean Instruments ®, 50 cm x 50 cm x 50 cm). Antes da abertura do Box-corer, a água superficial dentro do equipamento foi drenada e, após aberto, o sedimento foi sub-amostrado nos estratos mencionados acima.

3.2.2. BIOIL 2

A segunda expedição oceanográfica do projeto BIOIL ocorreu entre 08 e 16 de julho de 2022, com apoio logístico do navio de pesquisa *Alpha Crucis* (Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo). As estações do segundo cruzeiro foram definidas de acordo com os resultados integrados dos grupos de pesquisa envolvidos no primeiro embarque. Foram observadas evidências de um potencial ecossistema quimiossintético na área 3 e, portanto, essa área possuiria maiores probabilidades de se encontrar um *cold seep* ativo. Desta forma, foram realizadas 6 estações oceanográficas adicionais na área 3 (Figura 1, detalhado no Apêndice A) (estações 819, 821, 822, 823, 824 e 825), abrangendo isóbatas de 500 até 700 m. O cruzeiro se iniciou nas estações localizadas no extremo sudeste da área 3, onde havia um maior potencial de exsudações ativas.

No BIOIL 2, foram coletadas amostras de água para a determinação da PPQ (Tópico 2.4.) em profundidades semelhantes ao primeiro embarque (Tópico 2.1.1.). Já as amostras para os experimentos de microcosmos (Tópico 2.4.) foram coletadas na primeira e última profundidades superfície (~40m) e fundo (~600m), em 5 das 6 estações oceanográficas. Ambas

as coletas foram realizadas com uso do sistema Sea-Bird 911 CTD-Rosette equipado com 12 garrafas Niskin de 10 L.

Para clarificação, como ambos o primeiro e segundo embarque possuem a mesma área em comum, a área 3; essa área do primeiro cruzeiro será referida como 3a e as estações do segundo cruzeiro como 3b.

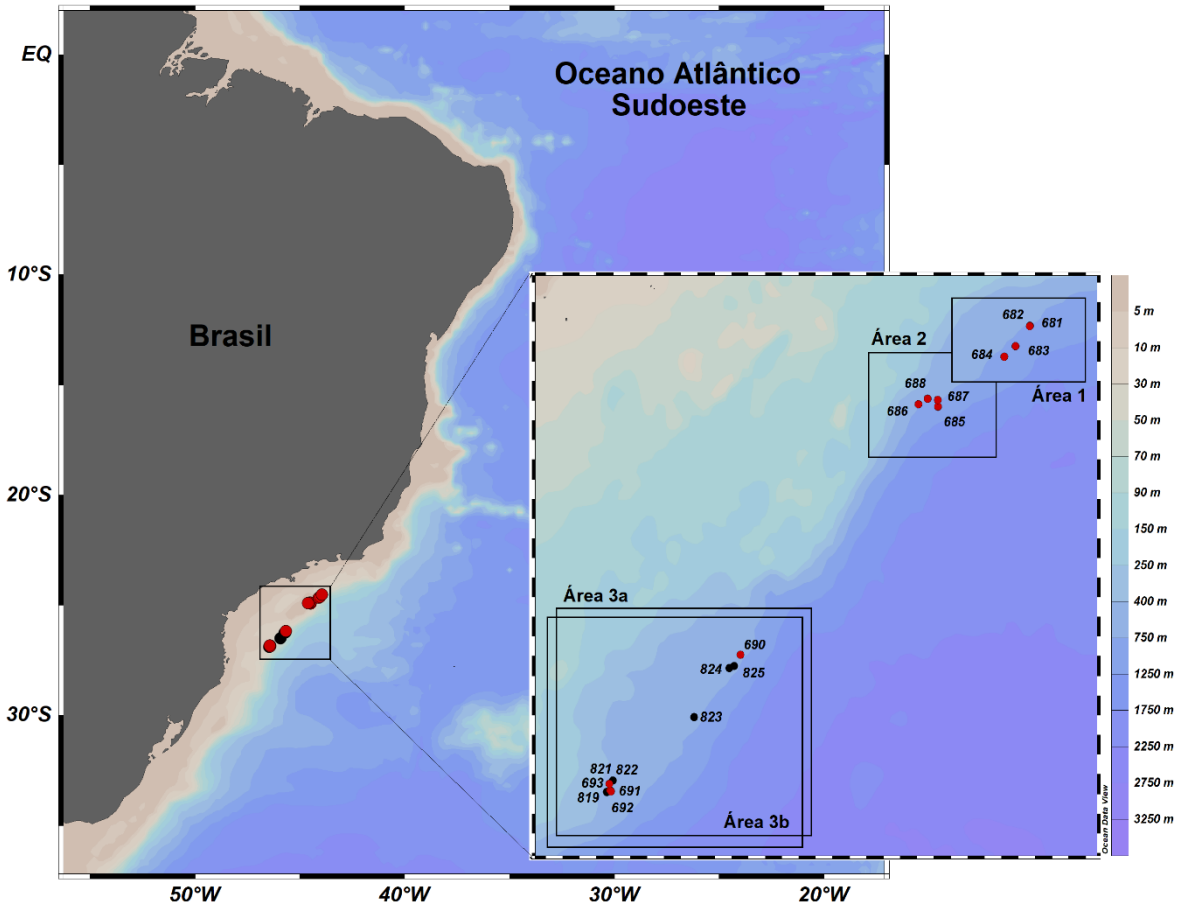


Figura 1 – Localização das estações oceanográficas realizadas durante o BIOIL 1 (vermelho) e 2 (preto).

3.3. Variáveis Ambientais

Temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido (apenas para o segundo embarque) foram medidos *in situ* com uso do sistema Sea-Bird 911 CTD-Rosette. Os dados de concentração de nutrientes em água foram cedidos pelo grupo da Profa. Dra. Vivian H. Pellizari; os dados de granulometria de sedimento foram cedidos pelo grupo do Prof. Dr. Michel de Mahiques; e os dados geoquímicos do sedimento foram cedidos pelo grupo do Prof. Rafael Lourenço.

A análise de nutrientes foi realizada apenas no primeiro embarque. As amostras de água foram filtradas em membrana de 0,22 μm (Sterivex^{TM}) e em seguida, foram armazenas em garrafas ou frascos âmbar (para amônia) e congeladas em -80°C (BERTINI & BRAGA, 2022). Posteriormente, a análise da concentração de fosfato, silicato, nitrato, nitrito e amônia, foi realizada no laboratório de Nutrientes, Micronutrientes e Traços no Mar do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP), de acordo com Grasshoff et al. (2009). Fosfato, silicato e amônia foram analisados em espectrofotômetro (*Thermo Scientific Spectrophotometer Evolution 200*), enquanto o nitrato e nitrito foram analisados com o autoanalyzer (*SEAL Analytical AutoAnalyzer II*).

A análise granulométrica e geoquímica dos sedimentos foi realizada apenas no primeiro embarque. A granulometria de sedimento foi determinada com *Malvern Mastersizer 2000 Laser Analyzer* no laboratório de Geologia de Margens Continentais do IOUSP, de acordo com o sistema ISO (ISO13320 2009). Carbono Orgânico Total (COT), Nitrogênio Total (NT) e $\delta_{13}C$ (‰ PDB) foram determinados com um analisador elementar (*EA - Costec*) acoplado com espectrômetro de massa de razão isotópica (*IRMS - Delta Advantage – Thermo Scientific*) após a acidificação das amostras com HCl 2M. O Carbonato de Cálcio (% de peso seco) foi determinado por análises gravimétricas antes e depois dessa acidificação. As análises acima foram realizadas no laboratório de Química Orgânica Marinha do IOUSP.

3.4. Produção Primária Quimiossintética (PPQ)

A produção primária quimiossintética (PPQ) foi estimada pela assimilação de ^{14}C-bicarbonato ($NaH^{14}CO_3$) de acordo com Steemann-Nielsen (1952) e Teixeira (1973), com adaptações de Reinthaler et al. (2010).

Após a coleta, ainda embarcado, um controle (fixado com formaldeído 2%) e duas réplicas de 50 ml de água e 5 g de sedimento foram incubados no escuro com 10 μCi ^{14}C-bicarbonato (primeiro embarque) e 2,5 μCi ^{14}C-bicarbonato (segundo embarque) (atividade específica de 56 mCi mmol^{-1}, Perkin Elmer, USA), por 12 h em temperaturas *in situ* simuladas. Antes da incubação, adicionou-se água de fundo filtrada (0,22 μm) ao sedimento para a formação do *slurry*. Após a incubação, as amostras de água do mar foram filtradas em membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,22 μm (Sartorius Stedim Biotech) (Figura 2), utilizando-se o kit de filtração manifold Sartorius e bomba à vácuo. A incubação de sedimento foi interrompida pela adição de formaldeído com concentração final de 2%. O

material foi congelado à -80° e transportado em gelo até o Laboratório Multiusuário de Radioisótopos do Departamento de Oceanografia Biológica do IOUSP.

Figura 2 – Esquerda: processo de filtração das amostras de água em kit de filtração manifold. Direita: membrana (0,22 µm) após o processo de filtração, sendo armazenada em criotubo para, em seguida, ser congelada à -80°C.

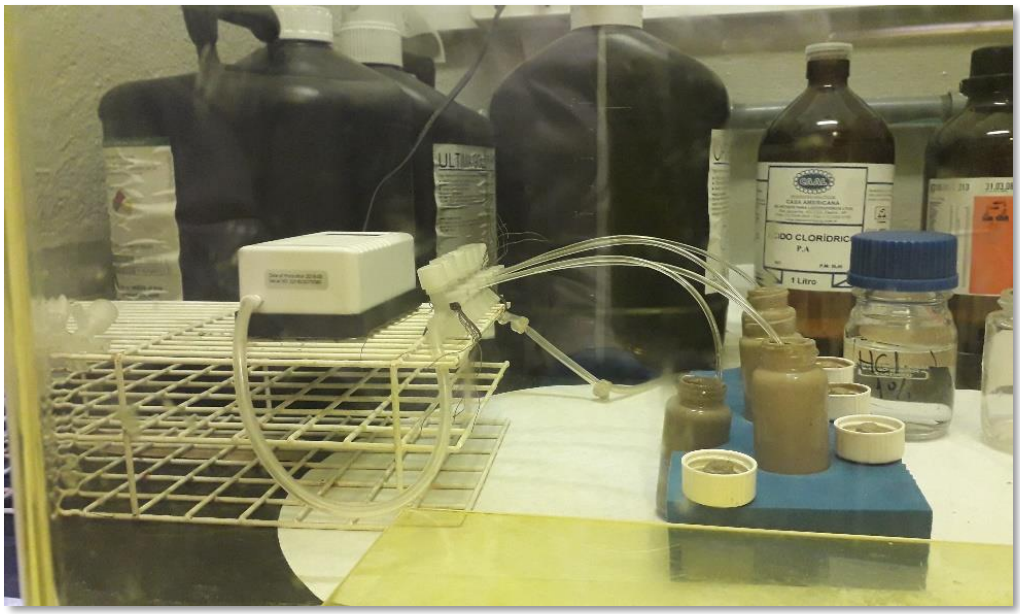


Figura 3 – Amostras de sedimento no processo de aeração com HCl 1% para remoção do CO_2 remanescente.

No laboratório, para a remoção do CO_2 remanescente, as membranas foram expostas a vapores de HCl 37% e, para o sedimento, adicionou-se 100 µl de HCl 1% e foi-se mantido em aeração por 1 h (Figura 3). Por fim, as membranas e o sedimento foram colocados em vials de cintilação com 5 ml de substância cintiladora (Optiphase Hisafe 3, Perkin Elmer) e deixadas no escuro (geladeira) por 24 h antes de serem analisadas através do contador cintilador líquido (Packard Tricarb 2100 TR), com tempo de leitura de 30 min para a membrana e 60 min para o sedimento. Os resultados apresentados em desintegrações por minuto (DPM) foram calculados e convertidos em taxas de produção ($gC.m^{-3}.h^{-1}$) de acordo com Steemann-Nielsen (1952) e Teixeira (1973):

$$PPQ = \frac{\frac{DPM}{DPM_{adicionado}} * 1{,}05 * \sum CO_2 * \frac{12}{44}}{t} \quad , \qquad (1)$$

onde t: tempo de incubação (h); 1,05: razão isotópica $^{14}C/^{12}C$; $\sum CO_2$: CO_2 total na água, no oceano é considerada como 90 mg/l por Steemann-Nielsen (1952).

3.5. Produção Microbiana Heterotrófica (PMH)

Para amostras de água, a produção de bactérias e arqueias heterotróficas (PMH) foi analisada através da assimilação de ^{3}H-leucina de acordo com Kirchman et al. (1985) e com adaptações de Smith e Azam (1992), utilizando etapas de centrifugação ao invés de filtração. Para as amostras de sedimento, foram utilizados os métodos adaptados de Svensson et al. (2001) e Santoro et al. (2013).

Para as amostras de água, dois controles (fixados com formaldeído 2%) e as três réplicas de 1 ml foram colocados em microtubos (Eppendorf de 2 ml) e incubados no escuro com 10 nM de ^{3}H-leucina (atividade específica de 125,6 Ci $mmol^{-1}$, Perkin Elmer, USA), por 6 h em temperatura *in situ* simulada. Para o sedimento, amostras de 1 g (junto com uma camada da água circundante, formando um *slurry*) foram homogeneizadas em vórtex e incubadas da mesma forma que a água. A incubação foi interrompida pela adição de formaldeído com concentração final de 2%. O material foi congelado em -80°C e transportado em gelo até o Laboratório multiusuário de Radioisótopos do Departamento de Oceanografia Biológica do IOUSP.

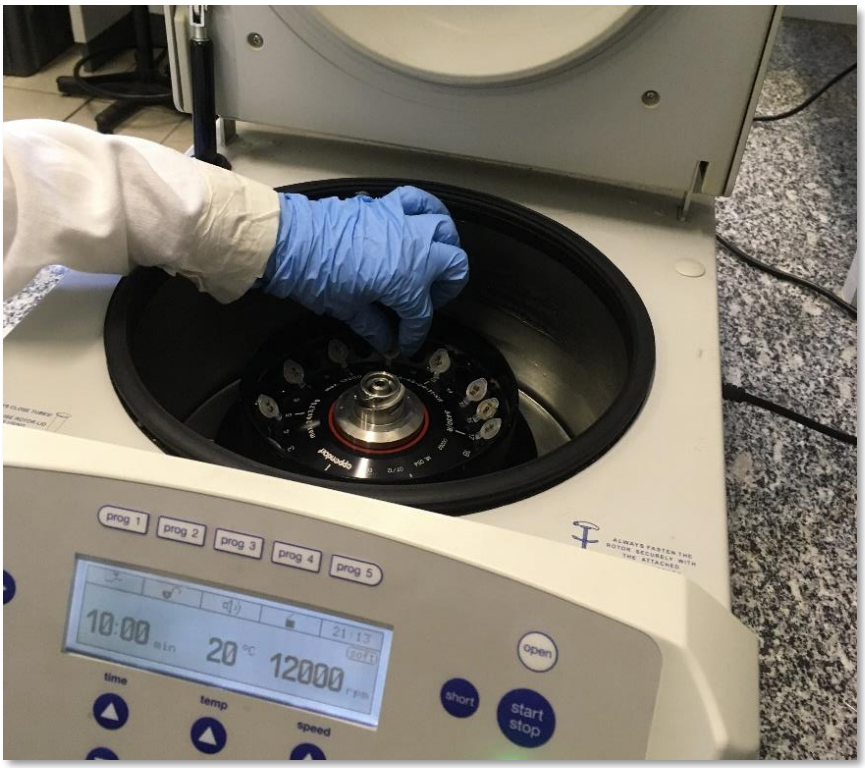


Figura 4 – Amostras em sucessivas etapas de centrifugação para a precipitação de proteína.

No laboratório, as amostras foram tratadas com ácido tricloroacético 5%, água Mili-Q e etanol, passando por sucessivas etapas de centrifugação (SMITH & AZAM, 1992) (Figura 4), para a precipitação da proteína. Por fim, foram adicionados 1,5 ml de substância cintiladora (Optiphase Hisafe 3, Perkin Elmer) e deixados no escuro (geladeira) por 24 h antes de serem analisadas utilizando-se o contador cintilador líquido (Packard Tricarb 2100 TR) (Figura 5). Os resultados apresentados em desintegrações por minuto (DPM) foram calculados e convertidos em taxas de produção ($gC.m^{-3}.h^{-1}$). A leucina total incorporada ($nmol_{inc}$) foi calculada de acordo com Wetzel e Linkens (1991):

$$\text{nmol}_{inc} = \frac{DPM_{réplica} - DPM_{controle}}{\Delta E * 2{,}22 * 10^6} \quad (2)$$

onde ΔE: atividade específica do radioativo (Ci/nmol); $2{,}22*10^6$: DPM de 1 Ci.

De acordo com Simon & Azam (1989), a taxa de incorporação de leucina, ou produção de proteína bacteriana (BPP) é calculada pela equação:

$$BPP = \frac{\text{nmol}_{inc}}{V*t} * \frac{100}{7{,}3} * 131{,}2 * ID \quad (3)$$

onde V: volume da amostra (L); t: tempo de incubação (h); 100/7,3: percentagem de leucina em uma molécula de proteína; 131,2: peso molecular da leucina; ID: diluição isotópica da leucina, considerada como 2 por Simon & Azam (1989).

Por fim, a PMH foi encontrada pela multiplicação da BPP por 0,86, de acordo com Simon & Azam (1989).

Figura 5 – Vials de cintilação a serem analisados no contador cintilador líquido (Packard Tricarb 2100 TR).

3.6. Experimento Piloto em Microcosmos

Os experimentos preliminares em microcosmos para a avaliação da potencial conexão dos nutrientes com a via quimioautotrofica foram realizados de acordo com métodos adaptados de Baltar et al. (2016). Nos tratamentos de adição, foram utilizados enxofre (tiossulfato) e nitrogênio inorgânico (amônio e nitrito), por serem as principais fontes de energia para a fixação de carbono escuro no oceano (ALONSO-SÁEZ et al, 2010; SWAN et al, 2011; MIDDELBURG, 2011; PACHIADAKI et al., 2017) além de uma fonte orgânica de carbono (acetato), que foi demonstrada como um parte significante da assimilação de carbono orgânico por microrganismos (HO et al., 2002; GÓMEZ-CONSARNAU et al., 2012). Além disso, a

escolha do acetato foi inicialmente planejada com o intuito da comparação dos experimentos em água e sedimento, onde o acetato é utilizado como *proxy* na decomposição anaeróbica de carbono orgânico (HO et al., 2002), sendo o doador de elétrons em até 65 % das reações de sulfato-redução em regiões costeiras (SORENSEN et al., 1981).

Os experimentos ocorreram em duplicata em 5 estações da área 3b (estações 819, 821, 822, 823 e 824). O microcosmo foi realizado de acordo com o esquema da Figura 6, em que foram usados os seguintes tratamentos: controle (fixado com formaldeído 2%); controle da quimiossíntese (sem nenhuma adição); adição de tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$); adição de cloreto de amônio (NH_4Cl); adição de nitrito de sódio ($NaNO_2$); adição de acetato de sódio ($C_2H_3NaO_3$). A concentração final dos nutrientes foi de 50 µM para amostras de água, valores escolhidos com base nas concentrações de nutrientes *in situ* obtidas por outros autores na região de estudo (AIDAR et al., 1993; MARINELLI et al., 1998; BRANDINI et al., 2007) e com base em experimentos similares de Signori et al. (não publicado). Todos os controles e tratamentos foram incubados com ^{14}C-bicarbonato ($NaH^{14}CO_3$) de acordo com a metodologia de PPQ, descrita no tópico anterior (2.3.) e os resultados foram apresentados em taxas de produção ($gC.m^{-3}.h^{-1}$), de acordo com a equação 1.

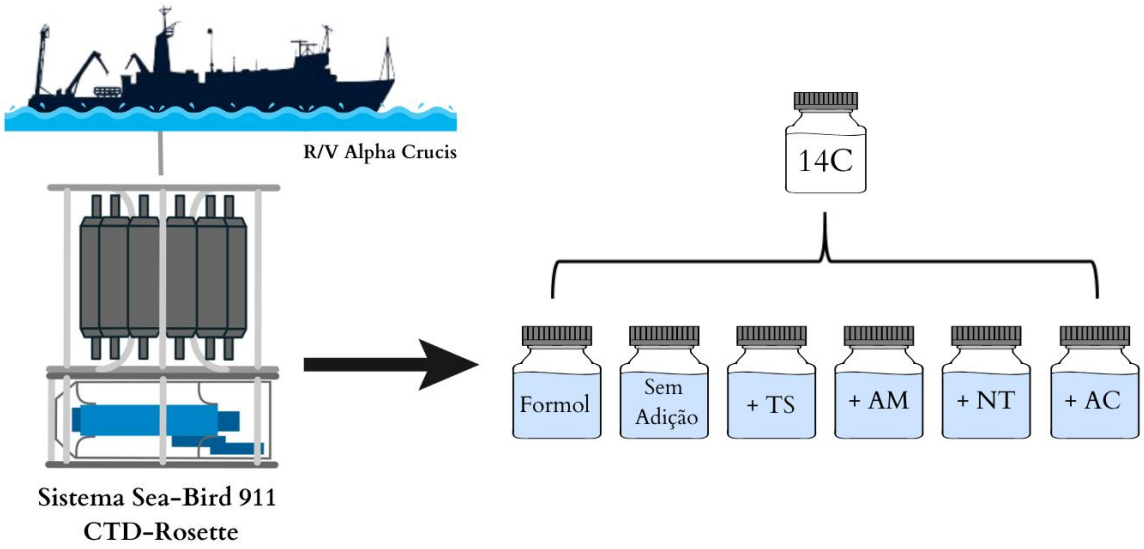


Figura 6 – Esquema metodológico do experimento piloto em microcosmos realizado no BIOIL 2. 14C: ^{14}C-bicarbonato ($NaH^{14}CO_3$), Formol: controle fixado com formaldeído 2%, Sem adição: apenas com ^{14}C-bicarbonato, TS: tiossulfato de sódio, AM: cloreto de amônio, NT: nitrito de sódio, AC: acetato de sódio.

3.7. Análises Estatísticas

Para comparar as médias de diferentes conjuntos amostrais foram utilizados o teste-t Student ou a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey HSD. A normalidade dos resíduos foi verificada por Shapiro-Wilk e, quando não obtidos a normalidade, os dados foram transformados logaritmicamente. A homogeneidade de variâncias foi testada por meio do teste de Levene, usando o pacote "car3.0-1.0" (FOX & WEISBERG, 2019). Foi obtida o coeficiente de correlação de Pearson entre as taxas de produção estimadas e as variáveis ambientais, e a análise de componentes principais (PCA) foi utilizada como análise exploratória para diminuir a dimensionalidade dos dados e proporcionar uma ordenação das amostras. Para validar essa ordenação, foi realizado uma análise multivariada de permutação (PERMANOVA), usando o pacote "vegan 2.5-7" (OKSANEN et al., 2020). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo *software* R (versão 4.2.1; R core team, 2022) e os dados foram visualizados pelo *software* R e pelo Ocean Data View 5.6.3 (SCHLITZER, 2021).

4. RESULTADOS

Este estudo está incluído no Projeto BIOIL da Shell Brasil para caracterização de áreas de exsudações frias, ou *cold seeps*, na Bacia de Santos. Entretanto, não foi possível encontrar *cold seeps* devido a problemas com os equipamentos a bordo, mas foi possível apresentar dados de PPQ e PMH da zona pelágica e bentônica usual.

4.1. Variáveis ambientais

Em ambos os embarques, a temperatura e salinidade diminuíram de acordo com a profundidade da coluna d'água, variando de 4,6 à 24,7 °C e 34,3 à 37,2 psu, respectivamente, para o BIOIL 1 (Figura 7, Apêndice C); e variando de 6,1 à 23,0 °C e 34,4 à 36,7 psu, respectivamente, para o BIOIL 2 (Figura 7, Apêndice D); havendo a presença da AT, ACAS (a partir da densidade de σ = 25,7) e o início da AIA (a partir de σ = 27,1) em alguns pontos; valores de densidade de acordo com Miranda (1982) e Stramma e England (1999). O oxigênio dissolvido, medido no segundo embarque, aumentou com a profundidade, variando de 4,9 à 6,9 mL.L^{-1} (Apêndice D).

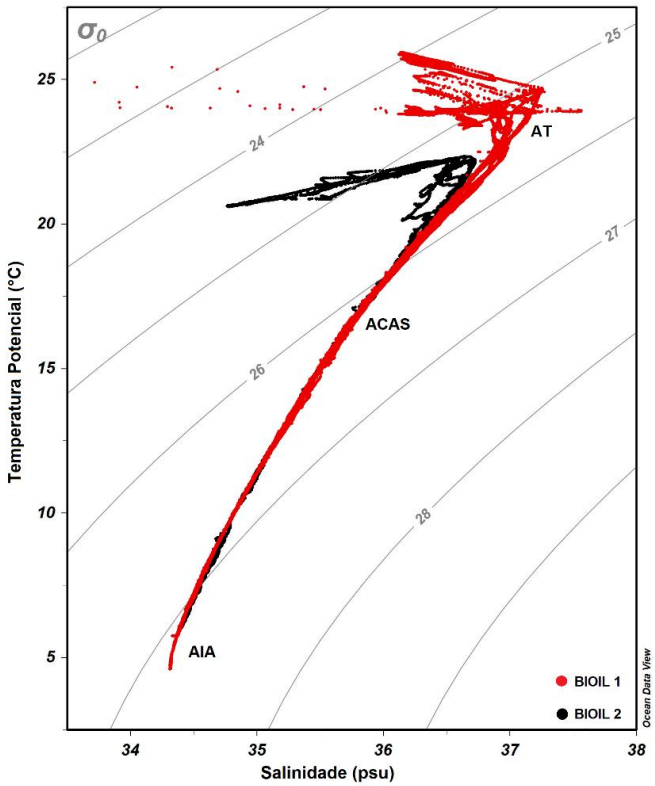


Figura 7 – Diagrama temperatura-salinidade espalhado para o talude da Bacia de Santos durante o BIOIL 1 (esquerda) durante novembro, 2019; e o BIOIL 2 (direita) durante julho, 2022.

As concentrações de fosfato, silicato e nitrato aumentaram com a profundidade, variando de 0,05 a 1,92 µmol.L^{-1}, 0,64 a 20,25 µmol.L^{-1} e 0,33 à 27,51 µmol.L^{-1}, respectivamente (Figura 8, Apêndice C). As concentrações de nitrito e amônio apresentaram seu máximo no meio da coluna d'água, com valores entre 0,01 a 0,05 µmol.L^{-1} e 0,02 a 0,42 µmol.L^{-1} (Figura 8, Apêndice C), respectivamente.

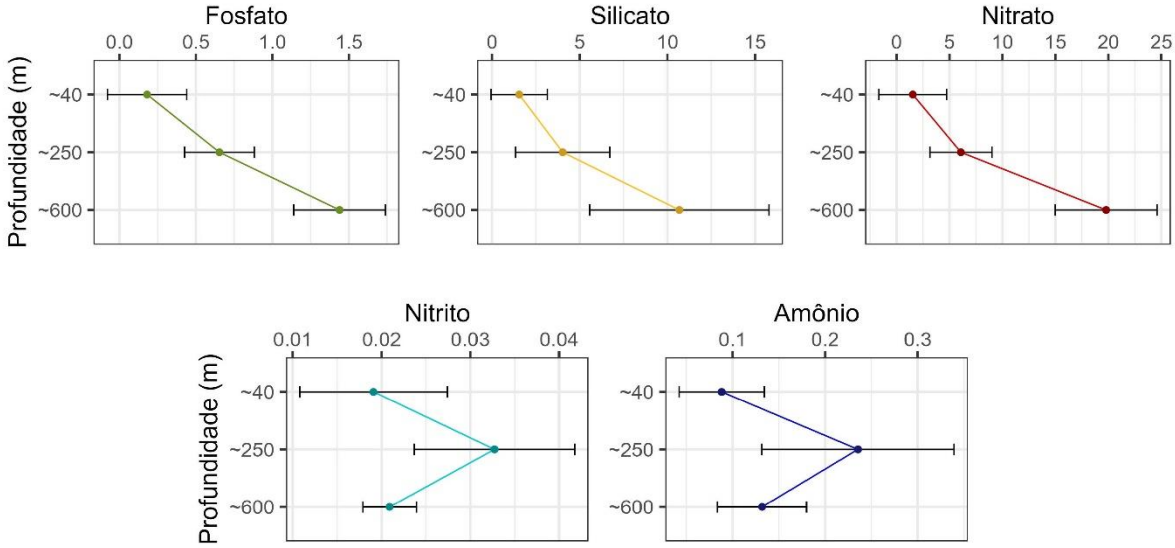


Figure 8 – Concentrações dos nutrientes: fosfato, silicato, nitrato, nitrito e amônio representadas em µmol.L^{-1} por profundidade aproximada (m) da coluna d'água. Concentrações representadas como média ± desvio padrão.

A maioria do sedimento foi caracterizado como lama arenosa, sendo que a área 1 apresentou menores porcentagens de areia (Apêndice E). O COT e NT diminuíram de acordo com os estratos sedimentares, variando desde 0,05 a 1,74 % e 0,01 a 0,17 %, respectivamente (Figura 9, Apêndice E). O conteúdo de carbonato de cálcio e δ_{13}C se manteve homogêneo ao longo dos estratos, com valores entre 3,38 a 13,78 % e -22,35 a -20,64 ‰, respectivamente (Figura 9, Apêndice E). Adicionalmente, observou-se que o conteúdo de carbonato de cálcio foi maior nas áreas 1 e 2.

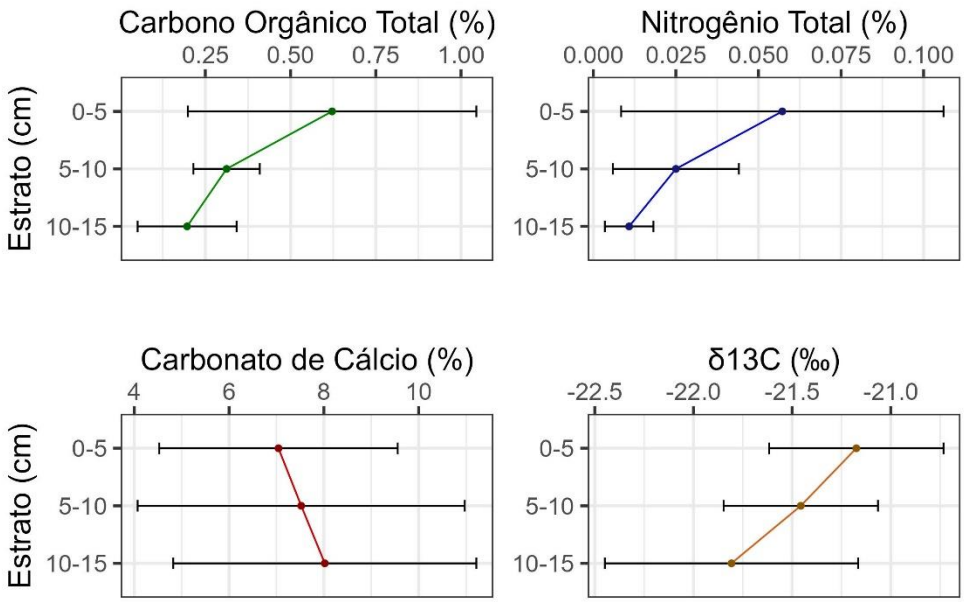


Figure 9 – Carbono orgânico total, nitrogênio total, conteúdo de Carbonato de Cálcio (%) e $\delta_{13}C$ (‰) por estrato de sedimento, representados como média ± desvio padrão.

4.2. Processos Microbianos

Para os dados do primeiro embarque, as taxas de PPQ variaram de 1,51 x 10^1 a 3,24 x 10^2 µgC.m^{-3}.h^{-1} na coluna d'água; sendo que, não foi observado uma diferença significativa ($p > 0,05$) em relação às zonas pelágicas (Figura 10A) ou áreas (Figura 10B). A PPQ foi 1 ordem de magnitude inferior do que à PMH, que variou de 1,26 x 10^2 a 1,48 x 10^4 µgC.m^{-3}.h^{-1} e de mesma forma, não apresentou padrões espaciais significativos ($p > 0,05$) (Figura 10C e 10D).

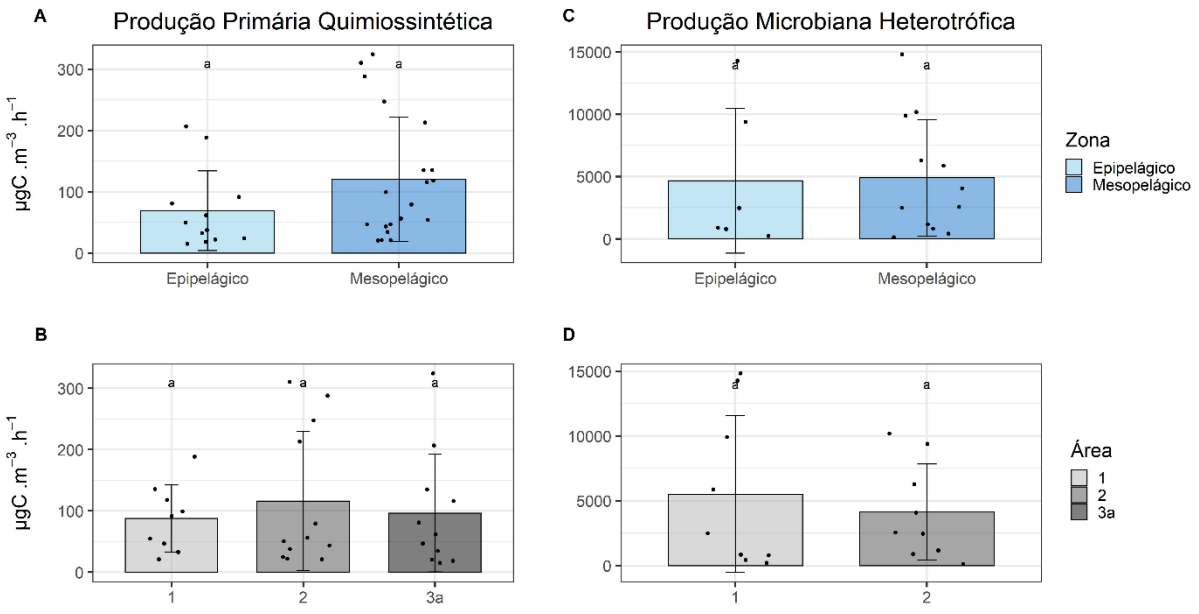


Figura 10 – Produção Primária Quimiossintética média ± desvio padrão (µgC.m^{-3}.h^{-1}) da coluna d'água do BIOIL 1, por zona pelágica (A) e área (B). Produção Microbiana Heterotrófica média ± desvio padrão (µgC.m^{-3}.h^{-1}) da coluna d'água do BIOIL 1, por profundidade (C) e área (D). Pontos representam observações independentes.

No sedimento, a PPQ variou 1,15 x 10^4 a 1,83 x 10^5 µgC.m^{-3}.h^{-1} e os dados não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação aos estratos (Figura 11A), mas se observou que a área 2 teve taxas de PPQ significativamente maiores ($p = 0,036$) que a área 3a, entretanto a área 1 não se mostrou significativamente diferente das demais áreas (Figura 11B). A PPQ, em sedimento, foi 2 ordens de magnitude superior do que à PMH, que variou de 3,22 x 10^1 à 1,56 x 10^3 µgC.m^{-3}.h^{-1}, este valor máximo representa um *outlier* observado no estrato de 0-5 cm da estação 685, que foi mantido nas análises estatísticas. Adicionalmente, não foram observados padrões espaciais significativos ($p > 0,05$) (Figura 11C e 11D).

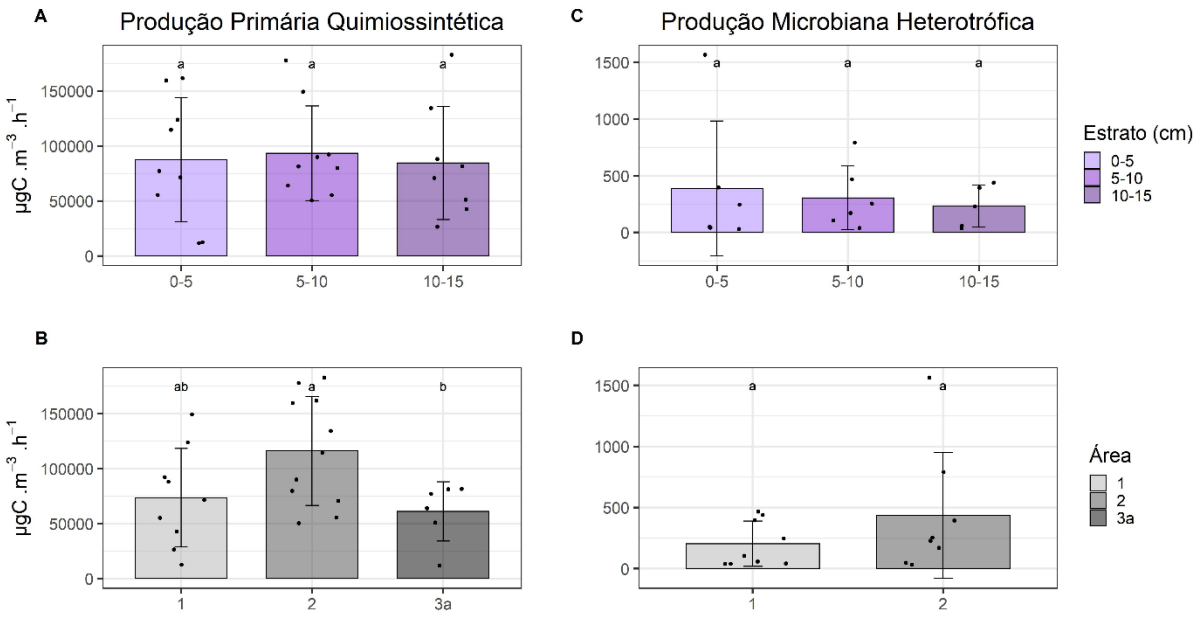


Figura 11 – Produção Primária Quimiossintética média ± desvio padrão (µgC.m^{-3}.h^{-1}) do sedimento do BIOIL 1, por zona pelágica (A) e área (B). Produção Microbiana Heterotrófica média ± desvio padrão (µgC.m^{-3}.h^{-1}) do sedimento do BIOIL 1, por profundidade (C) e área (D). Pontos representam observações independentes.

No BIOIL 1, comparou-se os processos microbianos em água e sedimento, a PPQ apresentou taxas muito superiores no sedimento, com uma diferença de 2 ordens de magnitude; a PMH apresentou um padrão inverso, com taxas de 1 ordem de magnitude maiores na coluna d'água.

No segundo embarque, as taxas de PPQ variaram de 5,22 x 10^{0} a 9,18 x10^{1} µgC.m^{-3}.h^{-1} (excluindo o *outlier* observado no mesopelágico da estação 824, igual a 139,53 µgC.m^{-3}.h^{-1}, que foi retirado nas análises estatísticas). Apesar de uma aparente tendência de maior PPQ no epipelágico, não se observou uma diferença significativa ($p > 0,05$) em relação às zonas pelágicas (Figura 12), entretanto, houve uma diferença significativa ($p = 0,002$) entre as demais áreas, em que a área 3b apresentou taxas inferiores às áreas do primeiro embarque (Figura 13).

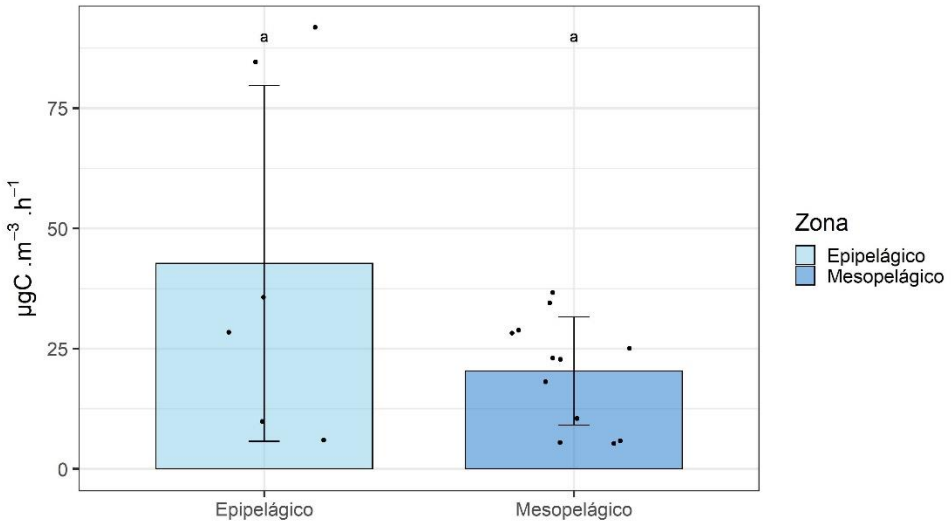


Figura 12 – Produção Primária Quimiossintética média ± desvio padrão (µgC.m^{-3}.h^{-1}) da coluna d'água do BIOIL 1. Pontos representam observações independentes.

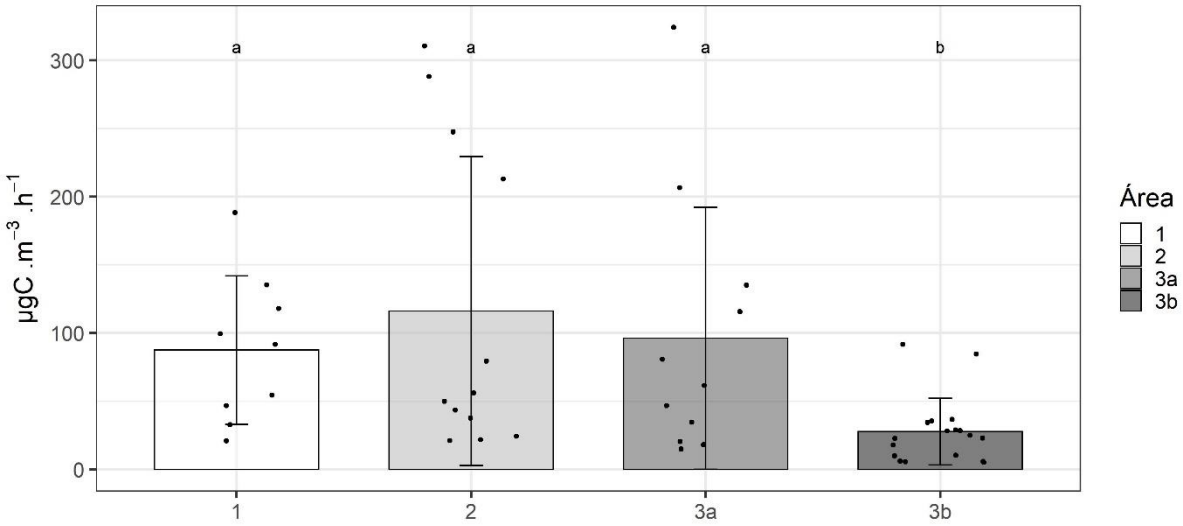


Figura 13 – Produção Primária Quimiossintética média ± desvio padrão (µgC.m^{-3}.h^{-1}) da coluna d'água do BIOIL 1 e 2. Pontos representam observações independentes.

4.3. Análises Multivariadas

O coeficiente de correlação de Pearson foi determinado para avaliar a relação entre as taxas estimadas e as variáveis ambientais. Na coluna d'água de ambos o BIOIL 1 e 2, a PPQ e PMH não se correlacionaram significativamente com as variáveis ambientais (Apêndice F e G). Além disso, não houve correlação significativa entre as próprias taxas (r = -0,069, p = 0,79) do BIOIL 1 (Figura 14). Apesar disso, optou-se por continuar com a PCA, que foi realizada apenas para os dados do BIOIL 1.

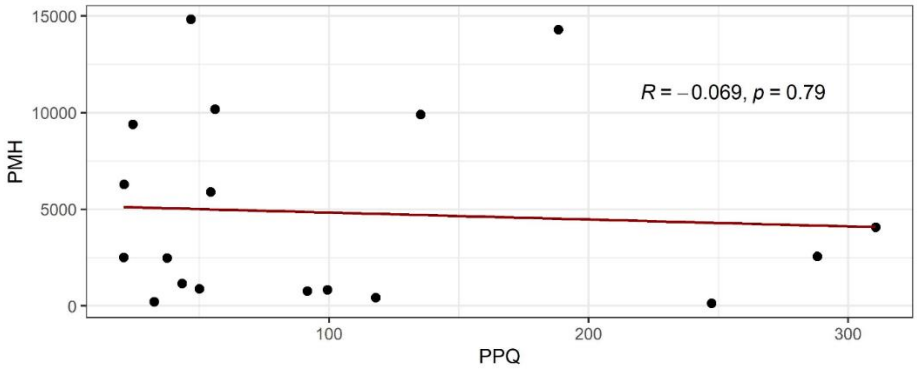


Figura 14 – Gráfico da correlação entre a produção primária quimiossintética (PPQ) e produção microbiana heterotrófica (PMH) na coluna d'água.

Na coluna d'água, a PCA revelou que duas componentes principais explicaram 74,18% da variabilidade amostral. A primeira componente (PC1) explicou 55,64% da variação e foi positivamente correlacionada, principalmente, com profundidade, fosfato, nitrato e silicato; temperatura e salinidade se correlacionaram negativamente com a PC1. A segunda componente (PC2) explicou 18,54% da variação total, se correlacionado positivamente com nitrito e amônio. As taxas de DCF e HMP não foram relevantes para a variabilidade amostral representada pela PCA, visto que não estavam fortemente associadas às PCs. A PC1 está associada às variáveis dependentes da profundidade, desta forma é possível observar uma aparente separação entes as zonas pelágicas no eixo dessa componente (Figura 15). No entanto, a ordenação observada na Figura 13 não foi confirmada pela PERMANOVA (R^2 = 0,002, p = 0,86). Adicionalmente, nenhuma ordenação foi observada referente às áreas (Figura 12, PERMANOVA, R^2 = 0,02, p = 0,56).

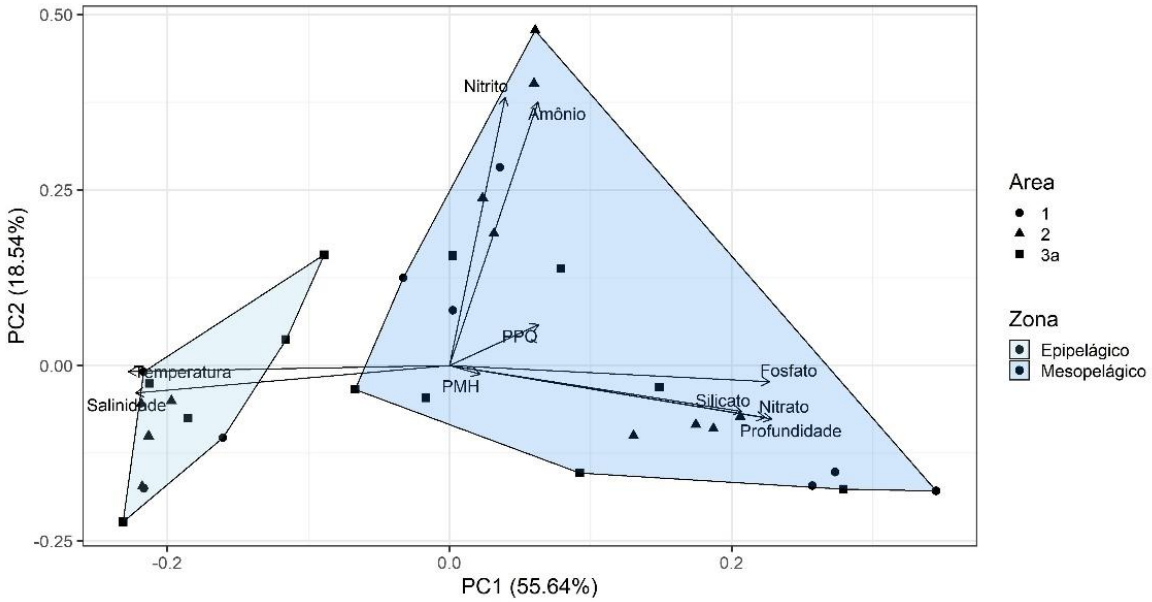


Figura 15 – Análise de componentes principais para a coluna d'água da Bacia de Santos durante o BIOIL 1 com vetores de produção primária quimiossintética (PPQ), produção microbiana heterotrófica (PMH), profundidade, salinidade, fosfato, silicato, nitrato, nitrito e amônio.

Nos sedimentos, houve uma correlação significativa entre PPQ e COT (r = 0,41, p = 0,05), PMH e COT (r = 0,75, p = 0,0007) e NT (r = 0,71, p = 0,0023) (Figura 16, Apêndice H); essas correlações ocorreram em função do *outlier* do estrato 0-5 cm da estação 685. Foram realizados testes de correção desconsiderando o *outlier*, o que resultou em uma correlação não significativa entre as variáveis (resultados não mostrados neste trabalho), entretanto, foi optado por prosseguir com o uso dos dados com o *outlier* nas análises estatísticas. Adicionalmente, a correlação observada entre PPQ e PMH não foi significativa (r = 0,36, p = 0,15) (Figura 17).

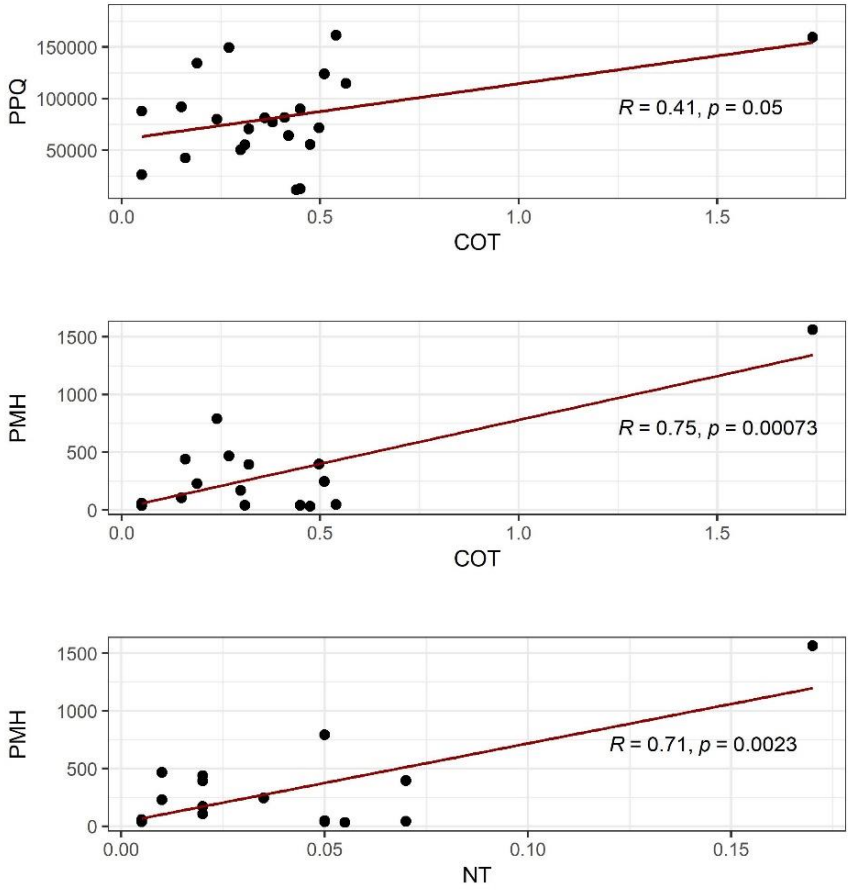


Figura 16 – Gráfico da correlação entre a produção primária quimiossintética (PPQ) e carbono orgânico total (COT), produção microbiana heterotrófica (PMH) e COT e nitrogênio total (NT) em sedimento.

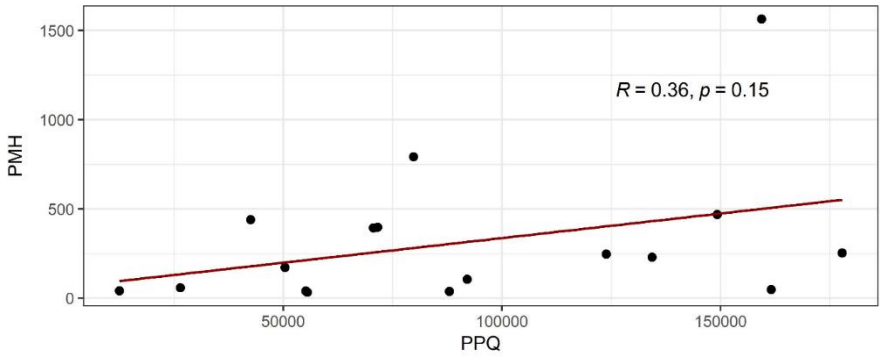


Figura 17 – Gráfico da correlação entre a produção primária quimiossintética (PPQ) e produção microbiana heterotrófica (PMH) no sedimento.

A PCA nos sedimentos revelou que duas PCs explicaram 64,89% da variabilidade amostral, com a PC1 explicando 36,92% da variação total e sendo positivamente correlacionada com COT, NT, PMH e, em menor intensidade $\delta_{13}C$ e PPQ. A PC2 explicou 27,96% da variação, sendo positivamente correlacionada com areia e negativamente com lama e $CaCO_3$. A PC1 está associada com variáveis relacionadas com a matéria orgânica, principalmente COT e NT. Além disso, houve uma aparente separação de A1 das outras áreas ao longo do eixo da PC2 (Figura 18), que é ditada principalmente pela granulometria e conteúdo de carbonato de cálcio. Essa ordenação entre áreas mostrou-se significativa (PERMANOVA, p = 0,04), representando 25,17 % (R^2 = 0,25) da variação. Adicionalmente, não foi observada nenhuma ordenação entre os estratos do sedimento (Figura 15, PERMANOVA, R^2 = 0,006, p = 0,94).

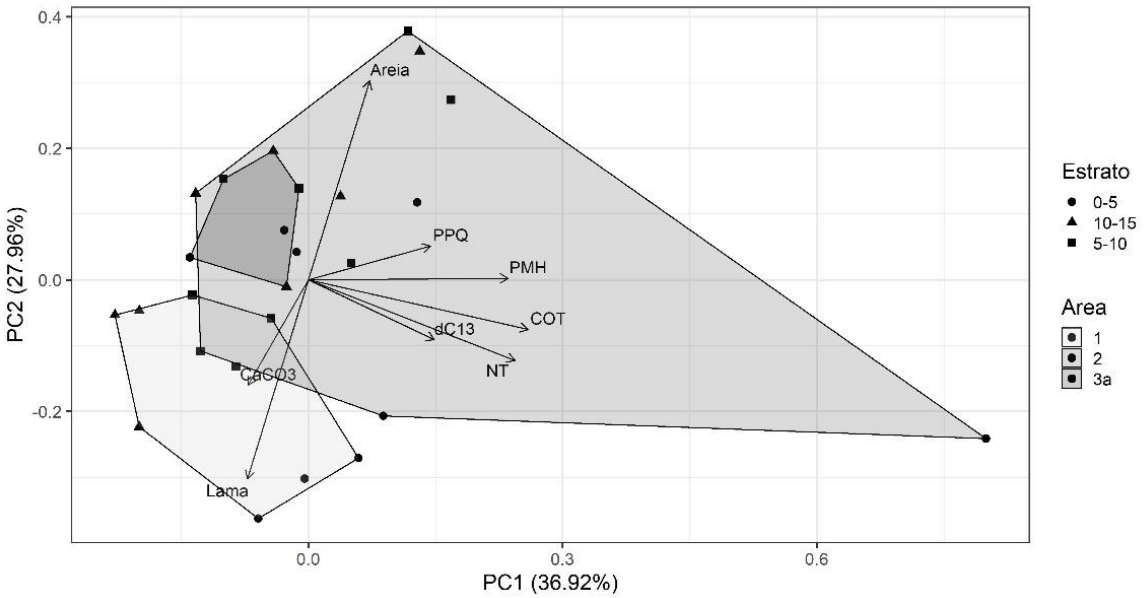


Figura 18 – Análise de componentes principais para o sedimento da Bacia de Santos durante o BIOIL 1 com vetores de produção primária quimiossintética (PPQ), produção microbiana heterotrófica (PMH), conteúde de areia, lama e carbonato de cálcio ($CaCO_3$), $\delta_{13}C$, carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT).

4.4. Experimento Piloto em Microcosmos

Para a determinar o efeito de cada tratamento nas taxas de PPQ (Figura 19), calculou-se a razão entre a taxa encontrada em cada tratamento (detalhada no Apêndice I) com o controle da quimiossíntese (sem adição). O experimento resultou em uma grande variação em respostas.

Em superfície, a PPQ nas estações 819, 821 e 823 não foi estimulada por nenhum tratamento, em comparação as estações 822 e 824 obtiveram uma resposta significativa a quase todos os nutrientes. Em destaque está a resposta ao acetato na 822, que foi 3 vezes maior que o controle, e na resposta a adição de tiossulfato e amônio para a estação 824, que foram 4 vezes maiores que o controle.

Em águas de fundo, as estações 819, 821 e 822 obtiveram resultados positivos para, principalmente, a adição de amônio. Além dessa resposta, a 821 também teve a produção estimulada pela adição de acetato, com uma diferença que quase 3 vezes o valor do controle. Não houve um aumento nas taxas de PPQ na estação 823, para nenhum dos tratamentos; e para a estação 824, só foi observada uma resposta ao tratamento com tiossulfato, este 3 vezes o controle.

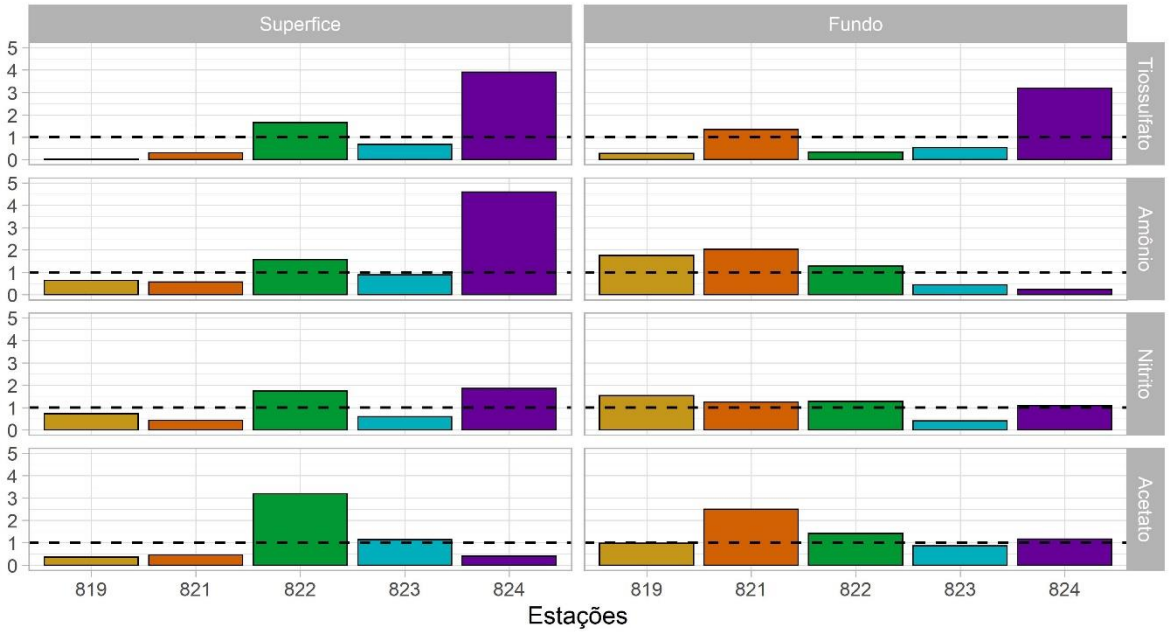


Figura 19 – Razão das taxas de produção primária quimiossintética (PPQ) obtidas nos diferentes tratamentos dividida pelo controle da PPQ. Valores acima da linha y = 1 representam uma resposta ao tratamento com o específico nutriente.

5. DISCUSSÃO

5.1. Distribuição Espacial

Embora nenhuma separação ente as zonas pelágicas tenha sido observada na PCA (Figura 13), a variação dos dados ocorreu, principalmente, no eixo associado com distribuição vertical das variáveis ambientais, como é o caso da temperatura, salinidade e nutrientes. Como esperado, os valores de temperatura e salinidade em superfície estão de acordo com as médias para os meses de julho e novembro, 22,5 e 24 °C, respectivamente (KAMPEL et al., 2015); e a distribuição vertical está de acordo com o empilhamento de massas d'água típico do Atlântico Sudoeste (CIRANO et al., 2006). Em geral, as concentrações de nutrientes foram típicas do Oceano Atlântico Sudoeste oligotrófico, sendo similares as observadas por Suzuki et al. (2015). A distribuição vertical típica de nutrientes por parte do fosfato, silicato e nitrato é explicada pela alta produção primária fotossintética na camada eufótica, que resulta em um maior consumo de nutrientes, mas também na produção de grandes quantidades de matéria orgânica (SUZUKI et al., 2015; BRISTOW et al., 2017). A distribuição do nitrito também segue um padrão relatado por outros estudos (DORE & KARL, 1996; SUZUKI et al., 2015), ocorrendo devido a redução do nitrato durante a assimilação pelo fitoplâncton ou pela nitrificação realizada por bactérias nitrificantes.

Como esperado, a variação da PPQ e PMH não foram explicadas por meio da PCA, visto que essas taxas não foram influenciadas pelas variáveis ambientais na coluna d'água, o que também foi observado por outros estudos no Atlântico Norte (REINTHALER et al., 2010) e no Pacífico Noroeste (ZHOU et al. 2017). Apesar disso, a quimioautotrofia depende, principalmente, de compostos nitrogenados (MIDDELBURG, 2011; PACHIADAKI et al., 2017), mas podendo utilizar outras fontes de energia que não foram estimadas neste estudo, como hidrogênio molecular, óxido nitroso (REINTHALER et al., 2010), compostos de enxofre reduzido e metano (SWAN et al., 2011).

No sedimento, a separação entre a área 1 das demais na PCA, foi estabelecida devido à uma granulometria distinta e, como esperado, as áreas compostas por *pockmarks* e montes carbonáticos (MALY et al., 2019) revelaram um maior teor de carbonato de cálcio. Parte da variação das amostras vista na PCA dos sedimentos também está relacionada à matéria orgânica; e devido aos microrganismos heterotróficos utilizarem-na como fonte de energia (AZAM et al., 1983; FUKAMI et al., 1983), a relação observada entre PMH, COT e NT já era esperada. A

distribuição de COT nos sedimentos marinhos é atribuída à produção fotossintética na camada eufótica (SEITER et al., 2004), que chega ao fundo após ser remineralizada na coluna d'água MIDDELBURG, 1989; DEL GIORGIO & DUARTE, 2002). Além disso, valores de $\delta_{13}C$ também estão relacionados com a matéria orgânica, visto que diferentes fontes de carbono possuem valores únicos de ^{13}C (MEYERS, 1994). Os valores entre -22 e -20‰, como os deste estudo, estão relacionados à matéria orgânica de origem marinha.

Uma das estações se destacou das demais, a 685 (área 2), particularmente o estrato 0-5 cm com valores significativamente superiores de COT, NT e PMH, que foram considerados *outliers*, com uma significativa influência nas correlações ente si. Eles foram mantidos nas análises estatísticas, pois concluiu-se que se tratavam de *outliers* naturais e não de um erro nas análises, devido à localização da estação e de ser um *outlier* simultâneo para os três fatores. A estação 685 está localizada na seção leste do Monte Carbonático Alpha Crucis (ACCR), próximo ao Monte Besnard, o pico mais alto desse sistema de montes (340 m acima do fundo do mar) (MALY et al. 2019, BENDIA et al., 2021). O ACCR é fortemente influenciado pelo intenso fluxo da CCI, que, combinada com a CB, é o mecanismo dominante de transporte sedimentar ao longo do fundo oceânico do Sudeste do Brasil (MALY et al., 2019). Além dos sedimentos, as correntes oceânicas transportam nutrientes e matéria orgânica (MORIARTY et al., 1995; HANSELL et al., 2002; SCHATTNER et al., 2020) e, visto que a estação 685 está localizada em uma seção com maior influência da CCI dentro do ACCR, isso poderia refletir nos valores encontrados de COT e NT e, consequentemente nas taxas de PMH.

Uma correlação significativa entre PPQ e PMH poderia indicar que a matéria orgânica lábil produzida pela quimioautotrofia está sendo consumida pelos heterotróficos ou também poderia representar a fixação heterotrófica de carbono inorgânico. Entretanto como essa relação entre as taxas não foi observada, infere-se que o COT que é consumido pelos heterótrofos no sedimento seria majoritariamente originado da produção fitoplanctônica da camada eufótica e que talvez essa fixação de CO_2 via heterotrofia não estaria ocorrendo durante a amostragem. Ainda existem muitas incertezas da relevância das reações anapleróticas, apesar disso, estudos observam essa via metabólica em colunas d'água oligotróficas (GONZÁLEZ et al., 2008; ALONSO-SÁEZ et al., 2010) e em sedimento de mar profundo (BRAUN et al., 2021); sendo que essas reações estão relacionadas ao eventual aumento no *input* de matéria orgânica (BALTAR et al., 2016). No entanto, os dados obtidos neste estudo ainda não nos permitem concluir sobre a ocorrência dessas reações, uma vez que o COT ou produção fotossintética na

coluna d'água não foram medidos e o método utilizado neste estudo não diferencia as vias metabólicas utilizadas.

No oceano, há uma grande variação nas taxas de processos microbianos; acredita-se que a quimioautotrofia ocorra, principalmente, nos grandes giros oceânicos (MIDDELBURG, 2011). Entretanto, as taxas encontradas para a camada d'água acima do talude da Bacia de Santos mostraram-se ser similares às do Pacífico Noroeste (ZHOU et al. 2017) e foram até quatro ordens de magnitude superiores às taxas encontradas no Atlântico Tropical e Norte (REINTHALER et al., 2010; BERGUAUER et al. 2013; BALTAR et al., 2016; LA CONO et al., 2018). As concentrações de nutrientes para o Atlântico Tropical e Norte são relativamente constantes para o nitrito, de 0,005 µmol L^{-1} para ambas as regiões; e para o amônio são de, aproximadamente, 0,02 µmol L^{-1} e 0,08 µmol L^{-1}, respectivamente (CLARK et al., 2008). Observamos concentrações mais altas para a Bacia de Santos, principalmente para o nitrito, o que poderia explicar as taxas superiores de PPQ na região, considerando que as bactérias oxidantes de nitrito contribuem consideravelmente para a quimiossíntese, entre 15-43% da PPQ total da coluna d'água (PACHIADAKI et al., 2017).

Considerando que o BIOIL 1 e 2 compartilham a mesma área 3, ainda não está claro a razão dos valores de PPQ coletados em julho de 2022 terem sido cerca de uma ordem de magnitude inferiores aos de novembro de 2019. Como não foram encontrados estudos pretéritos na região, nem estudos relacionando a quimiossíntese com variações sazonais no oceano, a hipótese levantada seria por uma maior disponibilidade de nutrientes no período de inverno devido a uma quebra da termoclina e intensificação dos processos de mistura vertical. Entretanto, a diferença entre taxas foi observada tanto no epipelágico, quanto no mesopelágico, com ambas as coletas apresentando uma estratificação similar no perfil da temperatura (Apêndice J). Em um cenário oceanográfico, é complicado compara ambos os embarques sem os dados de concentração de nutrientes para o BIOIL 2, mas foi possível comparar os valores observados no BIOIL 1 com as concentrações relatadas por Suzuki et al. (2015) na Bacia de Campos. Os autores relataram concentrações de fosfato, nitrato e silicato variando entre valores não detectados a 1,9 µmol.L^{-1}, 5 a 27 µmol.L^{-1} e 1,3 a 22 µmol.L^{-1}, respectivamente. As concentrações de nitrito não foram divulgadas pelos autores, mas o amônio permaneceu constantemente indetectável. E, embora o objetivo deste trabalho não seja uma discussão sobre variações temporais, a falta de estudos sobre a variação sazonal da quimiossíntese no oceano e as diferenças na PPQ no inverno e primavera neste trabalho demonstra a necessidade de

aumentar o esforço de pesquisa sobre a variação da quimiossíntese, não só espacialmente, como sazonalmente.

Na comparação da PPQ em sedimento com outros estudos, foi necessário integrar as taxas para toda a camada sedimentar (0-15 cm), o que resultou em valores de 5,5 x 10^3 a 19,4 x 10^4 µgC.m^{-2}.h^{-1}. Esses valores foram de três a quatro ordens de magnitude superiores que no sedimento profundo do Atlântico Nordeste (PIMENOV et al., 2000). A quimioautotrofia em sedimento - sem influência de compostos reduzidos provenientes de *cold seeps* e *vents* hidrotermais, depende da oxidação de metabólitos reduzidos produzidos durante a degradação anaeróbica da matéria orgânica (JØRGENSEN, 1982; MIDDELBURG, 2011), o que pode explicar a correlação observada entre PPQ e COT. Os continentes são uma das principais fontes de carbono orgânico para o oceano (SUZUKI et al., 2015; DEININGER & FRIGSTAD, 2019) e, desta forma, essas regiões tem a tendência de contar com taxas quimiossintéticas superiores (MIDDELBURG, 2011). Contudo, os estudos sobre esses processos microbianos em sedimento marinho ainda são escassos para realizar uma comparação adequada com outras regiões oceânicas.

A área 2, engloba o ACCR, primeiramente descrito por Maly et al. (2019) e, embora nenhum *cold seep* tenha sido encontrado na Bacia de Santos, os autores sugerem que a origem desse monte carbonático está associada a um escape recente de gás, o que criaria um ambiente enriquecido de compostos reduzidos, promovendo um aumento das taxas de PPQ (LEVIN et al., 2016). Mesmo no ambiente bentônico habitual, a PPQ é intensificada devido à ocorrência natural de compostos reduzidos (WHITICAR, 1990; ORCUTT et al., 2011), o que justificaria as taxas superiores em sedimento.

A PMH na coluna d'água desse estudo foi de uma a duas ordens de magnitude maior do que no Pacífico Noroeste (ZHOU et al., 2017) e de uma a seis ordens de magnitude superior ao Atlântico Norte e Subtropical (ARÍSTEGUI et al., 2005; REINTHALER et al., 2010; BALTAR et al., 2016; LA CONO et al., 2018). Para a comparação da PMH em sedimentos globalmente, as taxas foram integradas em todos os estratos (0-15 cm), resultando em valores de 2,2 x 10^1 a 9,1 x 10^1 µgC m^{-2} h^{-1}. Esses valores foram similares às de mar profundo no Pacífico Sudoeste (ALONGI et al., 1990), mas duas ordens de magnitude inferior aos sedimentos costeiros do Atlântico Nordeste (VAN DUYL & KOP, 1994), devido a respectiva proximidade dessas regiões ao continente.

Adicionalmente, a forte associação de microrganismos heterotróficos com a matéria orgânica (AZAM et al., 1983) também está relacionada com o padrão de maiores taxas de PMH na coluna d'água do que nos sedimentos. Devido ao relativamente baixo aporte continental de matéria orgânica na Bacia de Santos (DE MAHIQUES et al., 2004), a PMH seria primeiramente influenciada pela produção fotossintética na zona eufótica. Como apenas uma quantidade limitada de matéria orgânica alcança o mar profundo e os sedimentos devido a sua remineralização na camada d'água (DEL GIORGIO & DUARTE, 2002), tanto o COT quanto a PMH diminuiriam com a profundidade.

5.2. Experimento em Microcosmos

Houve uma grande variação nas respostas obtidas nesse experimento, sendo que, em várias estações, a PPQ não foi estimulada dela adição de nutrientes. Possivelmente, o tempo de incubação de 12h pode ter influenciado nesse resultado, baseando-se no experimento similar em mesocosmos realizado por Baltar et al. (2016), em que os autores relataram um resultado mais satisfatório após 4 a 5 dias de incubação.

O efeito do tiossulfato nas taxas foi observado, principalmente, na estação mais profunda, a 824; este resultado foi surpreendente, pois a utilização de enxofre reduzido não é usual na coluna d'água (SWAN et al., 2011). Um estudo similar no Atlântico Tropical (BALTAR et al., 2016) relatou que durante o tratamento com tiossulfato, houve um aumento na proporção dos genes de oxidação de enxofre, indicando que o bacterioplâncton possuiria um potencial para a utilização desse metabolismo. Apesar disso, Baltar et al. (2016) não observou uma resposta das taxas de PPQ ao tiossulfato, como foi apresentado neste trabalho.

Foram observadas respostas positivas nos tratamentos com compostos nitrogenados, sendo que o efeito do amônio foi relativamente mais intenso do que do nitrito. Apesar das diferenças na dimensão e tempo de incubação entre os experimentos neste trabalho e de Baltar et al. (2016), a magnitude do efeito do amônio foi similar. Esses resultados indicaram a amônia como uma importante fonte de energia para a quimioautotrofia, entretanto, a principal via metabólica ainda não está clara devido a diminuição na proporção dos genes da via CBB e 3HP/4HB durante a incubação com amônio (BALTAR et al., 2016).

Junior et al. (2015), Bendia et al. (2021) e Coutinho et al. (2021) investigaram a comunidade microbiana na coluna de água do Oceano Atlântico Sudoeste e descobriram que Cyanobacteria, Alpha- e Gammaproteobacteria dominaram em águas superficiais, enquanto

Gammaproteobacteria predominaram em águas profundas. Na zona mesopelágica, embora em baixa abundância, houve a presença de SAR324 e Nitrospinota, ambas capazes de fixar carbono via quimiossíntese (BENDIA et al., 2021; COUTINHO et al., 2021). Várias linhagens de Proteobacteria de mar profundo, como SAR324, podem fixar carbono através da oxidação de compostos reduzidos de enxofre, monóxido de carbono, metano e por meio da metilotrofia (SWAN et al., 2011; COUTINHO et al., 2021). Além disso, alguns isolados do filo Nitrospinota são bactérias oxidantes de nitrito e contribuem significativamente para a quimioautotrofia global, atingindo 15 a 43% da fixação de carbono inorgânico da zona mesopelágica (PACHIADAKI et al., 2017). Em relação à comunidade de arqueias, Junior et al. (2015), Bendia et al. (2021) e Coutinho et al. (2021) descobriram que a Thaumarchaeota (agora classe Nitrososphaeria dentro de Crenarchaeota) dominou as águas profundas, sugerindo que esse domínio está relacionado ao seu metabolismo quimiossintético, já que vários membros desses filos são arqueias oxidantes de amônia e são capazes de fixar carbono no escuro (BEMAN et al. 2008; BERG et al., 2014; DEKAS et al., 2019).

Baltar et al. (2016) observou que, em todos os tratamentos com nutrientes, houve um aumento de organismos “raros”, ou seja, de baixa abundância no ambiente. Embora, neste trabalho, não se tem dados de comunidade microbiana do microcosmos, supõem-se que as taxas de PPQ em resposta ao tiossulfato e amônio tenham sido promovidas pelo SAR324 e Nitrososphaeria (Crenarchaeota), pelo menos em águas profundas, visto que foram já foram relatados como pertencentes a microbiota do Atlântico Sudoeste profundo (JUNIOR et al., 2015; BENDIA et al. 2021; COUTINHO et al., 2021).

Embora haja indícios que a assimilação de acetato seja relevante no oceano oxigenado (HO et al., 2002, GÓMEZ-CONSARNAU et al., 2012, BALTAR et al., 2016) ela ainda se mostra como um dos principais doadores de elétrons em interfaces óxicas-anóxicas (HO et al., 2002). Portanto, na realização de experimentos na coluna d’água, a escolha apenas do acetato como fonte de carbono orgânico pode não ter sido o ideal para a comparação desse experimento com o ambiente *in situ*. Ademais, mudanças no *input* de matéria orgânica, como o uso de fontes de carbono específicas, podem causar a dominância de certos grupos da comunidade microbiana (GÓMEZ-CONSARNAU et al., 2012), portanto o ideal para a coluna d’água seria a utilização um conjunto de variados compostos orgânicos. Em águas oxigenadas do oceano oligotrófico, a PPQ promovida pela adição de matéria orgânica está, geralmente, relacionada com as reações anapleróticas do ciclo TCA (BALTAR et al., 2016; ALONSO-SÁEZ et al., 2010). A intensidade da resposta ao tratamento com matéria orgânica descrita por Baltar et al.

(2016) foi de 5 à 15 vezes o controle, valores muito superiores ao do presente estudo. O uso de um conjunto de compostos orgânicos (piruvato + acetato, BALTAR et al., 2016) poderia, dentro da realidade de um experimento laboratorial, ser uma representação mais fiel ao ambiente.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1. Conclusão

Não foram identificados *cold seeps* na Bacia de Santos, mas foram apresentados dados inéditos para a camada d'água e sedimento do Oceano Atlântico Sudeste. A zona pelágica da Bacia de Santos apresentou, em geral, taxas de produção quimiossintética maiores do que as demais bacias oceânicas comparadas neste trabalho. No talude, a PPQ seguiu o padrão de maior relevância para o ambiente bentônico devido à uma presença mais abundante de compostos reduzidos (WHITICAR, 1990; ORCUTT et al., 2011). Num padrão inverso, a PMH teve maior relevância na zona pelágica, devido a sua estreita relação com a matéria orgânica produzida pela fotossíntese na camada eufótica (AZAM et al., 1983). As variáveis ambientais estimados por estre trabalho não foram o suficiente para explicar as taxas de PPQ e PMH, visto a falta de uma relação significativa entre as variáveis.

Embora ainda não se conheça em detalhes a via quimioautotrófica preferencial no pelagial da Bacia de Santos, os experimentos realizados neste trabalho indicam a amônia, como importante fonte de energia para a PPQ, mas também com o grande potencial do uso de compostos de enxofre reduzidos ao longo da coluna d'água. Entretanto, essas observações permanecem especulativas visto se tratar de um experimento piloto.

O Oceano Atlântico Sudeste é uma bacia oceânica ainda pouco estudada, desta forma, este trabalho representa novos dados para a caracterização desta área e novos *insights* sobre os processos microbianos aqui estudados. Por fim, reforça-se a necessidade da inclusão das taxas de PPQ nas estimativas do ciclo de carbono nos oceanos, porque a quimiossíntese representa um aspecto importante da produção de carbono lábil marinho.

6.2. Trabalhos Futuros

Para estudos futuros da determinação das taxas microbianas aqui estimadas, seria ideal o aumento da resolução da camada d'água e sedimento. Devido à falta de uma relação significativa entre as variáveis ambientais e as taxas, seria interessante explorar outras fontes energéticas da PPQ, como compostos de enxofre reduzido, metano (SWAN et al., 2011), hidrogênio molecular, óxido nitroso (REINTHALER et al., 2010); juntamente com a determinação da produção fotossintética ou COT na coluna d'água, dado sua influência na PMH (AZAM et al., 1983). Adicionalmente, O *outlier* natural da estação 685 no ACCR é um potencial indicativo de um ambiente diferenciado dentro sistema do monte carbonático, podendo interessar eventuais estudos futuros na área.

Em relação a trabalhos futuros, o experimento piloto deste trabalho fornece *insights* sobre o método. Idealmente, o *setup* experimental poderia ser melhorado com sua realização em triplicata, um maior tempo de incubação e a inserção das estimativas de PMH. A fonte orgânica de carbono deveria incluir substratos orgânicos complementares (como a combinação de acetato+piruvato utilizada por Baltar et al. (2016)) e, em experimentos futuros, as fontes de energia para a fixação de carbono escuro poderiam se resumir apenas a adição de amônio como fonte de nitrogênio, e tiossulfato como fonte de enxofre. Adicionalmente, para futuros experimentos, seria importante acoplar informações de diversidade taxonômica e funcional para proporcionar resultados mais conclusivos.

REFERÊNCIAS

AIDAR, E.; GAETA, S. A.; GIANESELLA-GALVÃO, S. M. F.; KUTNER, M. B. B.; TEIXEIRA, C. **Ecossistema costeiro subtropical: nutrientes dissolvidos, fitoplâncton e clorofila-a e suas relações com as condições oceanográficas na região de Ubatuba, SP.** Publção esp. Inst. oceanogr., S Paulo, n. 10, p. 9-43, 1993.

ALONGI, D. M. Bacterial growth rates, production and estimates of detrital carbon utilization in deep-sea sediments of the Solomon and Coral Seas. **Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers**, v. 37, n. 5, p. 731-746, 1990.

ALONSO-SÁEZ, L.; GALAND, P.E.; CASAMAYOR, E.O.; PEDROS-ALIO, C.; BERTILSSON, S. High bicarbonate assimilation in the dark by Arctic bacteria. **The ISME journal**, v. 4, n. 12, p. 1581-1590, 2010.

ARÍSTEGUI, J.; DUARTE, C. M.; GASOL, J. M.; ALONSO-SÁEZ, L. Active mesopelagic prokaryotes support high respiration in the subtropical northeast Atlantic Ocean. **Geophysical Research Letters**, v. 32, n. 3, 2005.

AZAM, F.; FENCHEL, T.; FIELD, J.G.; GRAY, J.S.; MEYER-REIL, L.A.; THINGSTAD, F. The ecological role of water-column microbes in the sea. **Marine ecology progress series**, p. 257-263, 1983.

BALTAR, F.; LUNDIN, D.; PALOVAARA, J.; LEKUNBERRI, I.; REINTHALER, T.; HERNDL, G. J.; PINHASSI, J. Prokaryotic responses to ammonium and organic carbono reveal alternative CO2 fixation pathways and importance of alcaline phosphatase in the mesopelagic North Atlantic. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1670, 2016.

BEMAN, J. M.; POPP, B. N.; FRANCIS, C. A. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. **The ISME journal**, v. 2, p. 429–441, 2008.

BENDIA, A. G.; SIGNORI, C. N.; NAKAMURA, F. M.; BUTARELLI, A. C. D. A.; PASSOS, J. G.; RAMOS, R. B.; SOARES, L. F.; DE MAHIQUES, M. M.; SUMIDA, P. Y. G.; PELLIZARI, V.H., Microbial perspective on the giant carbonate ridge Alpha Crucis (Southwestern Atlantic upper slope). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 97, n. 8, p.fiab110, 2021.

BERG, C.; LISTMANN, L.; VANDIEKEN, V.; VOGTS, A.; JURGENS, K. Chemoautotrophic growth of ammonia-oxidizing Thaumarchaeota enriched from a pelagic redox gradient in the Baltic Sea. **Frontiers in microbiology**, v. 5, n. 786, 2014.

BERG, I. A.; KOCKELKORN, D.; BUCKEL, W.; FUCHS, G. A 3Nhydroxypropionate/ 4Nhydroxybutyrate autotrophic carbono dioxideassimilation pathway in archaea. **Science**, v. 318, n. 5857, 1782–1786, 2007.

BERGAUER, K.; SINTES, E.; VAN BLEIJSWIJK, J.; WITTE, H.; HERNDL, G. J. Abundance and distribution of archaeal acetyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase genes indicative for putatively chemoautotrophic Archaea in the tropical Atlantic's interior. **FEMS microbiology ecology**, v. 84, n. 3, p. 461-473, 2013.

BERTINI, L.; BRAGA, E. The Contribution of Nutrients and Water Properties to the Carbonate System in Three Particular Areas of the Tropical Atlantic (NE-BRAZIL). **Journal of Geoscience and Environment Protection**, v. 10, p. 135-161, 2022.

BOEBEL, O.; SCHMID, C.; ZENK, W. Flow and recirculation of Antarctic Intermediate Water across the Rio Grande Rise. **J. Geophys. Res.**, v. 102, p. 20967–20986, 1997.

BRANDINI, P. F.; SILVA, S. A.; SILVA, T. E.; KOLM, H. Sources of nutrients and seasonal dynamics of chlorophyll in the inner shelf off Paraná State—South Brazil Bight. **Journal of Coastal Research**, p. 1131-1140, 2007.

BRAUN, A.; SPONA-FRIEDL, M.; AVRAMOV, M.; ELSNER, M.; BALTAR, F.; REINTHALER, T.; HERNDL, G.J.; GRIEBLER, C. Reviews and syntheses: Heterotrophic fixation of inorganic carbon–significant but invisible flux in environmental carbon cycling. **Biogeosciences**, v. 18, n. 12, p. 3689-3700, 2021.

BRISTOW, L. A.; MOHR, W.; AHMERKAMP, S.; KUYPERS, M. M. Nutrients that limit growth in the ocean. **Current Biology**, v. 27, n. 11, p. R474-R478, 2017.

CERAMICOLA, S.; DUPRÉ, S.; SOMOZA, L.; WOODSIDE, J. Cold seep systems. In **Submarine geomorphology**, p. 367-387. Springer, Cham, 2018.

CIRANO, M.; MATA, M. M.; CAMPOS, E. J.; DEIRÓ, N. F. A circulação oceânica de larga-escala na região oeste do Atlântico Sul com base no modelo de circulação global OCCAM. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 24, n. 2, p. 209-230, 2006.

CLARK, D. R.; REES, A. P.; JOINT, I. Ammonium regeneration and nitrification rates in the oligotrophic Atlantic Ocean: Implications for new production estimates. **Limnology and Oceanography**, v. 53, n. 1, p. 52-62, 2008.

COUTINHO, F. H.; VON MEIJENFELDT, F. A. B.; WALTER, J. M.; HARO-MORENO, J. M.; LOPÉZ-PÉREZ, M.; VAN VERK, M. C.; THOMPSON, C. C.; COSENZA, C. A. N.; APPOLINARIO, L.; PARANHOS, R.; CABRAL, A.; DUTILH, B. E.; THOMPSON, F. L., Ecogenomics and metabolic potential of the South Atlantic Ocean microbiome. **Science of the Total Environment**, v. 765, n. 142758, 2021.

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.

DAS, A.; SUJITH, P. P.; MOURYA, B. S.; BICHE, S. U.; LOKABHARATHI, P. A. Chemosynthetic activity prevails in deep-sea sediments of the Central Indian Basin. **Extremophiles**, v. 15, n. 2, p. 177-189, 2011.

DE MAHIQUES, M. M.; TESSLER, M. G.; CIOTTI, A. M.; DA SILVEIRA, I. C. A.; E SOUSA, S. H. D. M.; FIGUEIRA, R. C. L.; TASSINARI, C. C. G; FURTADO, V. V.; PASSOS, R. F. Hydrodynamically driven patterns of recent sedimentation in the shelf and upper slope off Southeast Brazil. **Continental Shelf Research**, v. 24, n. 15, p. 1685-1697, 2004.

DE MAHIQUES, M. M.; SCHATTNER, U.; LAZAR, M.; SUMIDA, P. Y. G.; DE SOUZA, L. A. P. An extensive pockmark field on the upper Atlantic margin of Southeast Brazil: spatial analysis and its relationship with salt diapirism. **Heliyon**, v. 3, n. 2, p. 209-222, 2017.

DEININGER, A.; FRIGSTAD, H. Reevaluating the role of organic matter sources for coastal eutrophication, oligotrophication, and ecosystem health. **Frontiers in Marine Science**, v. 6, n. 210, 2019.

DEKAS, A. E.; PARADA, A. E.; MAYALI, X.; FUHRMAN, J. A.; WOLLARD, J.; WEBER, P. K.; PETT-RIDGE, J. Characterizing chemoautotrophy and heterotrophy in marine archaea

and bacteria with single-cell multi-isotope NanoSIP. **Frontiers in microbiology**, v. 10, n. 2682, 2019.

DEL GIORGIO, P. A.; DUARTE, C. M. Respiration in the open ocean. **Nature**, v. 420, n. 6914, p. 379-384. 2002.

DELLA GIUSTINA, I. D. **Sedimentação carbonática de algas vermelhas coralináceas da plataforma continental da Bacia de Campos:** Um modelo carbonático análogo para o Terciário. 2006. 134 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2006.

DORE, J.E.; KARL, D.M. Nitrite distributions and dynamics at Station ALOHA. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 43, n. 2-3, p. 385-402, 1996.

DYKSMA, S.; BISCHOF, K.; FUCHS, B. M.; HOFFMANN, K.; MEIER, D.; MEYERDIERKS, A.; PJEVAC, P.; PROBANDT, D.; RICHTER, M.; STEPANAUSKAS, R.; MUßMANN, M. Ubiquitous Gammaproteobacteria dominate dark carbon fixation in coastal sediments. **The ISME journal**, v. 10, n. 8, p. 1939-1953. 2016.

EMILSON, I. The shelf and coastal waters off Southem Brazil. **Bolm Inst. oceanogr.,** v. 17, n. 2, p. 101-112, 1961.

ENRICH-PRAST, A.; BASTVIKEN, D.; CRILL, P.; SANTORO, A.L.; SIGNORI, C.N.; SANSEVERINO, A.M. Chemosynthesis. In: **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**. Elsevier. 2014.

FOX, J.; WEISBERG, S. **An R Companion to Applied Regression**, 3rd Edition. Thousand Oaks CA: Sage. 2019.

FRAZÃO, L.R.; PENNINCK, S.B.; MICHELAZZO, L.S.; MORENO, G.; GUIMARÃES, C.; LOPES, R.M.; SIGNORI, C.N. Microbial ecology of the South Atlantic Subtropical Gyre: a state-of-the-art review of an understudied ocean region. **Ocean and Coastal Research**, v. 69, 2021.

FUKAMI, K.; SIMIDU, U.; TAGA, N. Distribution of heterotrophic bacteria in relation to the concentration of particulate organic matter in seawater. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 570-575. 1983.

GIONGO, A.; HAAG, T.; SIMÃO, T.L.L.; MEDINA-SILVA, R.; UTZ, L.R.; BOGO, M.R.; BONATTO, S.L.; ZAMBERLAN, P.M.; AUGUSTIN, A.H.; LOUREGA, R.V.; RODRIGUES, L.F. Discovery of a chemosynthesis-based community in the western South Atlantic Ocean. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 112, p. 45-56, 2016.

GÓMEZ-CONSARNAU, L.; LINDH, M.V.; GASOL, J.M.; PINHASSI, J. Structuring of bacterioplankton communities by specific dissolved organic carbon compounds. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 2361-2378, 2012.

GONZÁLEZ, J. M.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, B.; FERNÀNDEZ-GUERRA, A.; GÓMEZ-CONSARNAU, L.; SÁNCHEZ, O.; COLL-LLADÓ, M.; DEL CAMPO, J.; ESCUDERO, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, R.; ALONSO-SÁEZ, L.; LATASA, M.; PAULSEN, I.; NEDASHKOVSKAYA, O.; LEKUNBERRI, I.; PINHASSI, J.; PEDRÓS-ALIÓ, C. Genome analysis of the proteorhodopsin-containing marine bacterium Polaribacter sp. MED152 (Flavobacteria). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 25, p. 8724-8729, 2008.

GRASSHOFF, K.; KREMLING, K.; EHRHARDT, M. **Methods of seawater analysis.** John Wiley & Sons, 2009.

HALLAM, S.J.; MINCER, T.J.; SCHLEPER, C.; PRESTON, C.M.; ROBERTS, K.; RICHARDSON, P.M.; DELONG, E.F. Pathways of carbono assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. **PLoS Biology**, v. 4, n. 4, p. 520–536, 2006.

HANSELL, D. A.; CARLSON, C. A.; SUZUKI, Y. Dissolved organic carbon export with North Pacific Intermediate Water formation. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 16, n. 1, p. 7-1, 2002.

HERNDL, G. J.; REINTHALER, T. Microbial control of the dark end of the biological pump. **Nature Geoscience**, v. 6, p. 718–724. 2013.

HERRING, P. **The biology of the deep ocean**. Oxford: Oxford University Press, 2002.

HO, T.Y.; SCRANTON, M.I.; TAYLOR, G.T.; VARELA, R.; THUNELL, R.C.; MULLER-KARGER, F. Acetate cycling in the water column of the Cariaco Basin: seasonal and vertical

variability and implication for carbon cycling. **Limnology and oceanography**, v. 47, n. 4, p. 1119-1128, 2002.

HÜGLER, M.; SIEVERT, S.M. Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. **Annual review of marine science**, v. 3, p. 261-289, 2011.

ISO13320. Particle size analysis. Laser diffraction methods. Dansk standard, DS/ISO13320-2009, 2009.

JØRGENSEN, B. B. Mineralization of organic matter in the sea bed - The role of sulfate reduction. **Nature**, v. 296, p. 643–645, 1982.

JUNIOR, N. A.; MEIRELLES, P. M.; DE OLIVEIRA SANTOS, E.; DUTILH, B.; SILVA, G. G.; PARANHOS, R.; CABRAL, A. S.; REZENDE, C.; IIDA, T.; DE MOURA, R. L.; KRUGER, R. H.; PEREIRA, R. C.; VALLE, R.; SAWABE, T.; THOMPSON, C.; THOMPSON, F. Microbial community diversity and physical - chemical features of the Southwestern Atlantic Ocean. **Archives of microbiology**, v. 197, p. 165-179, 2015.

KAMPEL, M.; DE FREITAS, L.B.; DELCOURT, F.T.; CORTIVO, F.D.; VALERIO, L.; ZOFFOLI, M.L.; DE MORAES RUDORFF, N. Caracterização e análise ambiental da Bacia de Santos com base no processamento de campos oceânicos superficiais estimados por satélites. **Anais XVII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto–SBSR**, p. 3596-3603, 2015.

KIRCHMAN, D. L.; K'NEES, E.; HODSON, R. E. Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bactéria in natural aquatic systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 599–607, 1985.

LA CONO, V.; RUGGERI, G.; AZZARO, M.; CRISAFI, F.; DECEMBRINI, F.; DENARO, R.; LA SPADA, G.; MAIMONE, G.; MONTICELLI, L. S.; SMEDILE, F.; GIULIANO, L.; YAKIMOV, M. M. Contribution of bicarbonate assimilation to carbon pool dynamics in the deep Mediterranean Sea and cultivation of actively nitrifying and CO2-fixing bathypelagic prokaryotic consortia. **Frontiers in microbiology**, v. 9, n. 3, 2018.

LE BRIS N.; ARNAUD-HAOND S.; BEAULIEU S.; CORDES E.; HILARIO A.; ROGERS A.; VAN DE GAEVER S.; WATANABE H. Hydrothermal Vents and Cold Seeps. In: (UN Ed.) **First Global Integrated Marine Assessment**, 18p., 2016.

LEGEAIS, J. F.; OLLITRAULT, M.; ARHAN, M. Lagrangian observations in the intermediate western boundary current of the South Atlantic. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 85, p.109-126, 2013.

LEVIN, L. A.; BACO, A. R.; BOWDEN, D. A.; COLACO, A.; CORDES, E. E.; CUNHA, M. R.; DEMOPOULOS, A. W.; GOBIN, J.; GRUPE, B. M.; LE, J.; METAXAS, A. Hydrothermal vents and methane seeps: rethinking the sphere of influence. **Frontiers in Marine Science**, v. 72, n. 3. 2016.

LEVIN, L. A. et al. Global observing needs in the deep ocean. **Frontiers in Marine Science**, v. 6, p. 241, 2019.

LEVIN, L.A. Ecology of cold seep sediments: interactions of fauna with flow, chemistry and microbes. In **Oceanography and Marine Biology**, p. 11-56. CRC Press. 2005.

LEVY, E. M.; LEE, K. Potential contribution of natural hydrocarbon seepage to benthic productivity and the fisheries of Atlantic Canada. **Can.J. Fish. Aquatic Sci.,** v. 35, p. 349–352, 1988.

LLODRA, E. R.; TYLER, P. A.; GERMAN, C.R. Biogeography of Deep-Water Chemosynthetic Ecosystems (Chess): Exploring the Southern Oceans. **Actas Delprimer Taller Sudamericano de Biodiversidad Marina**, v. 67, n. 2, p. 168-176, 2003.

MAHMOUDI, N.; HAGEN, S. M.; HAZEN, T. C.; STEEN, A. D. Patterns in extracellular enzyme activity and microbial diversity in deep-sea Mediterranean sediments. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, p. 103231, 2020.

MALY, M.; SCHATTNER, U.; LOBO, F. J.; DIAS, R. J. S.; RAMOS, R. B.; DE MATOS COUTO, D.; SUMIDA, P. Y. G.; DE MAHIQUES, M. M. The Alpha Crucis Carbonate Ridge (ACCR): Discovery of a giant ring-shaped carbonate complex on the SW Atlantic margin. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

MARINELLI, R. L.; JAHNKE, R. A.; CRAVEN, D. B.; NELSON, J. R.; ECKMAN, J. E. Sediment nutrient dynamics on the South Atlantic Bight continental shelf. **Limnology and Oceanography**, v. 43, n. 6, p. 1305-1320. 1998.

MCNICHOL, J.; STRYHANYUK, H.; SYLVA, S. P.; THOMAS, F.; MUSAT, N.; SEEWALD, J. S.; SIEVERT, S. M. Primary productivity below the seafloor at deep-sea hot springs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 26, p. 6756-6761, 2018.

MCNICHOL, J.; STRYHANYUK, H.; SYLVA, S. P.; THOMAS, F.; MUSAT, N.; SEEWALD, J. S.; SIEVERT, S. M. Primary productivity below the seafloor at deep-sea hot springs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 26, p. 6756-6761, 2018.

MEYERS, P.A. Preservation of elemental and isotopic source identification of sedimentary organic matter. **Chemical geology**, v. 114, n. 3-4, p. 289-302, 1994.

MIDDELBURG, J. J. Chemoautotrophy in the ocean. **Geophysical Research Letters**, v. 38, n. 24, 2011.

MIRANDA, L.B. **Análise de massas d'água da plataforma continental e região oceânica adjacente:** cabo de São Tomé (RJ) a Ilha de São Sebastião (SP). 1982, 123 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1982.

MOREIRA, J. L. P.; MADEIRA, C. V.; GIL, J. A.; MACHADO, M. A. P. Bacia de Santos. **Boletim de Geociencias da PETROBRAS**, v. 15, n. 2, p. 531-549, 2007.

MORIARTY, D. J. W.; O'DONOHUE, M. J. Organic carbon transport from the Southern Ocean and bacterial growth in the Antarctic Intermediate Water masses of the Tasman Sea. **Marine Ecology Progress Series**, p. 291-297, 1995.

OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; FRIENDLY, M.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MCGLINN, D.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; HENRY, M.; STEVENS, H.; SZOECS, E.; WAGNER, H. **Vegan:** Community Ecology Package. R package version 2.5-7. 2020.

OLU-LE ROY, K.; CAPRAIS, J. C.; FIFIS, A.; FABRI, M. C.; GALÉRON, J.; BUDZINSKY, H.; LE MÉNACH, K.; KHRIPOUNOFF, A.; ONDRÉAS, H.; SIBUET, M. Cold-seep assemblages on a giant pockmark off West Africa: spatial patterns and environmental control. **Marine Ecology**, v. 28, n. 1, p. 115-130, 2007.

ORCUTT, B. N.; SYLVAN, J. B.; KNAB, N. J.; EDWARDS, K. J. Microbial Ecology of the Dark Ocean above, at, and below the Seafloor. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 75, p. 361–422. 2011.

PACHIADAKI, M. G.; SINTES, E.; BERGAUER, K.; BROWN, J. M.; RECORD, N. R.; SWAN, B. K.; MATHYER, M. E.; HALLAM, S. J.; LOPEZ-GARCIA, P.; TAKAKI, Y.; NUNOURA, T. Major role of nitrite-oxidizing bacteria in dark ocean carbon fixation. **Science**, v. 358, n. 6366, p. 1046-1051, 2017.

PAULL, C. K.; HECKER, B.; COMMEAU, R.; FREEMAN-LYNDE, R. P.; NEUMANN, C.; CORSO, W. P.; GOLUBIC, S.; HOOK, J. E.; SIKES, E.; CURRAY, J. Biological communities at the Florida Escarpment resemble hydrothermal vent taxa. **Science**, v. 226, n. 4677, p. 965-967, 1984.

PIMENOV, N. V.; SAVVICHEV, A. S.; RUSANOV, I. I.; LEIN, A. Y.; IVANOV, M. V. Microbiological processes of the carbon and sulfur cycles at cold methane seeps of the North Atlantic. **Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 709-720, 2000.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2022. URL https://www.R-project.org/.

RAMOS, R. B.; DOS SANTOS, R. F.; SCHATTNER, U.; FIGUEIRA, R. C. L.; BÍCEGO, M. C.; LOBO, F. J.; DE MAHIQUES, M. M. Deep pockmarks as natural sediment traps: a case study from southern Santos Basin (SW Atlantic upper slope). **Geo-Marine Letters**, v. 40, p. 989-999, 2019.

REINTHALER, T.; VAN AKEN, H. M.; HERNDL, G. J. Major contribution of autotrophy to microbial carbono cycling in the deep North Atlantic's interior. **Deep Sea Research II: Topical Studies in Oceanography**, v. 57, n. 16, p. 1572-1580, 2010.

ROBINSON, C. Heterotrophic bacterial respiration. **Microbial ecology of the oceans**, p. 299-334, 2008.

SANTORO, A.L.; BASTVIKEN, D.; TRANVIK, L.; ENRICH-PRAST, A. Simultaneous measurements of dark carbon fixation and bacterial production in lake sediment. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 11, n. 6, p. 298-303, 2013.

SAVVICHEV, A. S.; KADNIKOV, V. V.; KRAVCHISHINA, M. D.; GALKIN, S. V.; NOVIGATSKII, A. N.; SIGALEVICH, P. A.; MERKEL, A. Y.; RAVIN, N. V.; PIMENOV, N. V.; FLINT, M. V. Methane as an organic matter source and the trophic basis of a laptev sea cold seep microbial community. **Geomicrobiology journal**, v. 35, n. 5, p. 411-423, 2018.

SCHATTNER, U.; LOBO, F. J.; LÓPEZ-QUIRÓS, A.; DOS PASSOS NASCIMENTO, J.L.; DE MAHIQUES, M.M. What feeds shelf-edge clinoforms over margins deprived of adjacent land sources? An example from southeastern Brazil. **Basin Research**, v. 32 (Clinoforms and Clinothems: Fundamental Elements of Basin Infill), p. 293-301. 2020.

SCHATTNER, U.; LAZAR, M.; SOUZA, L. A. P.; TEN BRINK, U.; DE MAHIQUES, M. M. Pockmark asymmetry and seafloor currents in the Santos Basin offshore Brazil. **Geo-Marine Letters**, v. 36, p. 457-464, 2016.

SCHATTNER, U.; LOBO, F. J.; GARCÍA, M.; KANARI, M.; RAMOS, R. B.; DE MAHIQUES, M. M. A detailed look at diapir piercement onto the ocean floor: new evidence from Santos Basin, offshore Brazil. **Marine Geology**, v. 406, p. 98-108, 2018.

SCHLITZER, R. **Ocean Data View**, 2021, odv.awi.de.

SEABROOK, S.; DE LEO, F. C.; BAUMBERGER, T.; RAINEAULT, N.; THURBER, A. R. Heterogeneity of methane seep biomes in the Northeast Pacific**. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 150, p. 195-209, 2018.

SEITER, K.; HENSEN, C.; SCHRÖTER, J.; ZABEL, M. Organic carbon content in surface sediments—defining regional provinces. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 51, n. 12, 2001-2026. 2004.

SIEVERT, S. M.; VETRIANI, C. Chemoautotrophy at deep-sea vents: past, present, and future. **Oceanography**, v. 25, n. 1, p. 218-233, 2012.

SILVEIRA, I. C. A.; SCHMIDT, A. C. K.; CAMPOS, E. J. D.; GODOI, S. S.; IKEDA, Y. A Corrente do Brasil ao largo da Costa Leste Brasileira. **Rev. Bras. oceanogr.**, v. 48, n. 2, p. 171–183, 2000.

SIMON, M.; AZAM, F. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. **Marine ecology progress series. Oldendorf**, v. 51, n. 3, p. 201-213, 1989.

SMITH, C. Chemosynthesis in the deep-sea: life without the sun. **Biogeosciences Discussions**, v. 9, n. 12, p. 17037-17052, 2012.

SMITH, D. C.; AZAM, F. A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using 3H-leucine. **Mar. Microb. Food Webs**, v. 6, n. 2, p. 107-114, 1992.

SORENSEN, J.; CHRISTENSEN, D.; JORGENSEN, B. B. Volatile fatty acids and hydrogen as substrates for sulfate-reducing bacteria in anaerobic marine sediment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 42, p. 5–11, 1981.

STEEMAN-NIELSEN, E. The use of radio-active carbon (C^{14}) for measuring organic production in the sea. **Journal de Conseil**, v. 18, p. 117-140, 1952.

STRAMMA, L.; ENGLAND, M. On the water masses and mean circulation of the south Atlantic Ocean. **J. Geophys. Res.**, v. 104, p. 20863–20883, 1999.

SUMIDA, P. Y .G; PELLIZARI, V. H.; LOURENÇO, R. A.; SIGNORI, C. A.; BENDIA, A. G.; CARRETTE, O.; NAKAMURA, F. M.; RAMOS, R. B.; BERGAMO, B.; SOUZA, B. H. M.; BUTARELLI, A. C. A.; PASSOS, J. G.; DIAS , R. J.; MALY, M.; BANHA, T. N. S.; GUTH, A. Z.; SOARES, L. F.; PERUGINO, P. D. N.; SANTOS, F. R.; SANTANA, F. R.; DE MAHIQUES, M. M. Seep hunting in the Santos Basin, Southwest Atlantic: sampling strategy and employed methods of the multidisciplinary cruise BIOIL 1. **Ocean and Coastal Research**, v. 70 (Suppl 2). 2022.

SUMIDA, P. Y. G.; YOSHINAGA, M. Y.; MADUREIRA, L. A. S. P.; HOVLAND, M. Seabed pockmarks associated with deepwater corals off SE Brazilian continental slope, Santos Basin. **Marine Geology**, v. 207, n. 1-4, p. 159-167, 2004.

SUZUKI, M. S.; REZENDE, C. E.; PARANHOS, R.; FALCÃO, A.P. Spatial distribution (vertical and horizontal) and partitioning of dissolved and particulate nutrients (C, N and P) in the Campos Basin, Southern Brazil. Estuarine, **Coastal and Shelf Science**, v. 166, p. 4-12, 2015.

SVENSSON, J. M.; ENRICH-PRAST, A.; LEONARDSON. L. Nitrification and denitrification in a eutrophic lake sediment bioturbated by oligochaetes. **Aquat. Microb. Ecol.**, v. 23, p. 177-186, 2001.

SVERDRUP, H. U; JOHNSON, M. W.; FLEMING, R H. **The Oceans:** their physics, chemistry and general biology. Englewood Cliffs, Prentice-Hall Inc., 1942.

SWAN, B. K.; MARTINEZ-GARCIA, M.; PRESTON, C. M.; SCZYRBA, A.; WOYKE, T.; LAMY, D.; REINTHALER, T.; POULTON, N. J.; MASLAND, E. D. P.; GOMEZ, M. L.; SIERACKI, M. E.; DELONG, E. F.; HERNDL, G. J.; STEPANAUSKAS, R. Potential for chemolithoautotrophy among ubiquitous bactéria lineages in the dark ocean. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1296–1300. 2011.

TAYLOR, G. T.; IABICHELLA, M.; HO, T. Y.; SCRANTON, M. I.; THUNELL, R. C.; MULLER-KARGER, F.; VARELA, R. Chemoautotrophy in the redox transition zone of the Cariaco Basin: a significant midwater source of organic carbon production. **Limnology and Oceanography**, v. 46, n. 1, p. 148-163, 2001.

TEIXEIRA, C. Introdução aos métodos para medir a produção primária do fitoplâncton marinho. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 22, p. 59-92, 1973.

THURBER, A. R.; KRÖGER, K.; NEIRA, C.; WIKLUND, H.; LEVIN, L. A. Stable isotope signatures and methane use by New Zealand cold seep benthos. **Marine Geology**, v. 272, n. 1-4, p. 260-269, 2010.

TUNNICLIFFE, V.; JUNIPER, S. K.; SIBUET, M. Reducing environments of the deep-sea floor. **Ecosystems of the Deep Oceans**, p. 81–110, 2003.

TURNER, J. T. Zooplankton fecal pellets, marine snow, phytodetritus and the ocean's biological pump. **Progress in Oceanography**, v. 130, p. 205-248, 2015.

VAN DUYL, F. C.; KOP, A. J. Bacterial production in North Sea sediments: clues to seasonal and spatial variations. **Marine Biology**, v. 120, n. 2, p. 323-337, 1994.

VIGNERON, A.; L'HARIDON, S.; GODFROY, A.; ROUSSEL, E. G.; CRAGG, B. A.; PARKES, R. J.; TOFFIN, L. Evidence of active methanogen communities in shallow sediments of the sonora margin cold seeps. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 81, n. 10, p. 3451-3459, 2015.

WETZEL, R.G.; LIKENS, G.E. Primary productivity of phytoplankton. In: **Limnological Analyses** (p. 207-226). Springer, New York, NY, 1991.

WHITICAR, M. J. A geochemial perspective of natural gas and atmospheric methane. **Organic**

Geochemistry, v. 16, n. 1-3, p. 531-547, 1990.

ZHOU, W.; LIAO, J.; GUO, Y.; YUAN, X.; HUANG, H.; YUAN, T.; LIU, S. High dark carbon fixation in the tropical South China Sea. **Continental Shelf Research**, v.146, p. 82-88, 2017.

APÊNDICE

Apêndice A - Localização das estações da coluna d'água do projeto BIOIL 1 (Novembro, 2019) e BIOIL 2 (Julho, 2022) a bordo do R/V Alpha Crucis. Profundidade (m), Produção Primária Quimiossintética (PPQ, $\mu gC.m^{-3}.h^{-1}$) e Produção Microbiana Heterotrófica (PMH, $\mu gC.m^{-3}.h^{-1}$). Linhas contendo (-) representam a ausência de dados.

Cruzeiro	Área	Estação	Latitude	Longitude	Zona	Prof.	PPQ	PMH
BIOIL 1	1	682	24˚ 31.286	043˚ 55.712	Epipelágico	45	91,71	772,45
					Mesopelágico	263	54,52	5888,52
					Mesopelágico	701	118,12	425,94
		683	24˚ 37.476	044˚ 00.886	Epipelágico	44	32,75	213,73
					Mesopelágico	283	99,46	829,21
					Mesopelágico	811	20,97	2506,02
		684	24˚ 40.710	044˚ 04.899	Epipelágico	40	188,47	14290,89
					Mesopelágico	280	135,32	9900,48
					Mesopelágico	804	46,81	14822,13
	2	685	24˚ 55.983	044˚ 28.452	Epipelágico	46	50,10	883,31

				Mesopelágico	282	310,58	4065,41
				Mesopelágico	551	288,21	2563,11
	686	24˚ 55.238	044˚ 35.450	Epipelágico	40	24,50	9392,63
				Mesopelágico	278	43,48	1164,48
				Mesopelágico	530	56,14	10178,66
	687	24˚ 53.975	044˚ 28.564	Epipelágico	48	37,73	2476,62
				Mesopelágico	280	21,16	6287,09
				Mesopelágico	560	247,45	125,94
	688	24˚ 53.530	044˚ 32.107	Epipelágico	45	21,94	-
				Mesopelágico	280	79,44	-
				Mesopelágico	530	213,08	-
3a	690	26˚ 11.571	045˚ 38.730	Epipelágico	41	80,87	-
				Mesopelágico	280	115,85	-
				Mesopelágico	740	46,86	-

		691	26˚ 53.222	046˚ 24.735	Epipelágico	49	15,08	-
					Mesopelágico	282	135,12	-
					Mesopelágico	513	324,34	-
		692	26˚ 53.006	046˚ 25.067	Epipelágico	45	61,58	-
					Mesopelágico	280	34,68	-
					Mesopelágico	480	20,45	-
		693	26˚ 50.894	046˚ 25.411	Epipelágico	45	206,61	-
					Epipelágico	160	18,18	-
					Mesopelágico	380	-	-
BIOIL 2	3b	819	26°53,377	046°26,301	Epipelágico	46	91,78	-
					Mesopelágico	222	5,83	-
					Mesopelágico	492	25,06	-
		821	26°52,963	046°25,209	Epipelágico	42	84,66	-
					Mesopelágico	149	22,97	-

			Mesopelágico	440	22,83	-
822	26°49,869	046°24,149	Epipelágico	45	9,93	-
			Mesopelágico	151	5,22	-
			Mesopelágico	403	5,56	-
823	26°30,623	045°55,244	Epipelágico	45	28,44	-
			Mesopelágico	252	28,24	-
			Mesopelágico	674	28,89	-
824	26°15,650	045°42,761	Epipelágico	45	6,05	-
			Mesopelágico	250	139,53	-
			Mesopelágico	722	10,57	-
825	26°14,977	045°40,929	Epipelágico	83	35,65	-
			Mesopelágico	250	18,08	-
			Mesopelágico	684	34,47	-

Apêndice B - Localização das estações do sedimento do projeto BIOIL 1 (Novembro, 2019) a bordo do R/V Alpha Crucis. Estrato (cm), profundidade total (m), Produção Primária Quimiossintética (PPQ, µgC.m^{-3}.h^{-1}) e Produção Microbiana Heterotrófica (PMH, µgC.m^{-3}.h^{-1}). Linhas contendo (-) representam a ausência de dados.

Cruzeiro	Área	Estação	Latitude	Longitude	Estrato	Prof. total	PPQ	PMH
BIOIL 1	1	681	24˚ 31.422	043˚ 55.825	0-5	744	12513,18	772,45
					5-10		55155,49	5888,52
					10-15		42545,27	425,94
		683	24˚ 37.476	044˚ 00.886	0-5	852	123850,19	213,73
					5-10		149299,58	829,21
					10-15		88013,00	2506,02
		684	24˚ 40.710	044˚ 04.899	0-5	820	71567,16	14290,89
					5-10		92072,56	9900,48
					10-15		26447,14	14822,13
	2	685	24˚ 55.983	044˚ 28.452	0-5	592	159421,80	883,31
					5-10		177792,94	4065,41

	686	24˚ 55.238	044˚ 35.450	0-5	581	55528,67	9392,63
				5-10		79815,51	1164,48
				10-15		70611,65	10178,66
	687	24˚ 53.975	044˚ 28.564	0-5	675	161595,94	2476,62
				5-10		50423,56	6287,09
				10-15		134373,78	125,94
	688	24˚ 53.530	044˚ 32.107	0-5	564	114504,27	-
				5-10		90037,74	-
				10-15		182782,95	-
3a	690	26˚ 11.571	045˚ 38.730	0-5	762	11525,98	-
				5-10		64000,97	-
				10-15		81584,75	-
	691	26˚ 53.222	046˚ 24.735	0-5	519	77083,08	-
				5-10		81320,21	-

	10-15	50947,30	-

Apêndice C - Variáveis ambientais da camada d'água do BIOIL 1, incluindo profundidade (m), temperatura (°C), salinidade (psu) e os nutrientes: fosfato, silicato, nitrato, nitrito e amônio representados em µmol.L^{-1}.

Estação	Zona	Prof.	Temperatura	Salinidade	Fosfato	Silicato	Nitrato	Nitrito	Amônio
682	Epipelágico	45	24,5	37,2	0,05	0,69	0,36	0,02	0,14
	Mesopelágico	263	14,6	35,4	0,61	2,83	3,66	0,03	0,21
	Mesopelágico	701	5,4	34,3	1,83	15,91	21,67	0,02	0,11
683	Epipelágico	44	23,1	36,9	0,07	1,16	0,40	0,01	0,07
	Mesopelágico	283	12,9	35,1	0,58	5,55	6,04	0,03	0,16
	Mesopelágico	811	4,7	34,3	1,36	13,77	24,68	0,02	0,11
684	Epipelágico	40	23,5	36,9	0,09	5,61	1,48	0,02	0,05
	Mesopelágico	280	12,8	35,1	0,80	3,99	7,02	0,04	0,28
	Mesopelágico	804	4,6	34,3	1,92	20,25	27,51	0,02	0,14
685	Epipelágico	46	23,9	36,9	0,11	0,64	0,52	0,01	0,07
	Mesopelágico	282	13,3	35,2	0,88	3,47	9,00	0,04	0,38
	Mesopelágico	551	7,6	34,5	1,37	8,73	19,28	0,02	0,11
686	Epipelágico	40	24,6	37,2	0,05	0,98	0,33	0,02	0,11
	Mesopelágico	278	13,6	35,3	0,65	11,34	7,06	0,05	0,42

	Mesopelágico	530	8,4	34,6	1,58	6,74	21,37	0,02	0,16
687	Epipelágico	48	23,9	36,9	0,11	0,75	0,49	0,02	0,05
	Mesopelágico	280	12,5	35,1	0,89	3,93	9,21	0,03	0,30
	Mesopelágico	560	6,7	34,4	1,41	10,87	19,51	0,02	0,14
688	Epipelágico	45	23,8	36,8	0,20	1,10	0,74	0,02	0,11
	Mesopelágico	280	13,0	35,2	0,85	3,59	8,12	0,04	0,24
	Mesopelágico	530	8,0	34,5	1,09	6,88	13,15	0,02	0,09
690	Epipelágico	41	23,9	36,8	0,95	3,70	11,11	0,04	0,16
	Mesopelágico	280	12,6	35,1	0,17	0,87	0,59	0,02	0,11
	Mesopelágico	740	5,8	34,4	1,78	16,37	24,28	0,02	0,11
691	Epipelágico	49	24,5	37,2	0,18	0,64	0,62	0,02	0,14
	Mesopelágico	282	14,2	35,3	0,71	2,72	7,76	0,03	0,24
	Mesopelágico	513	10,5	34,8	1,26	6,77	17,47	0,02	0,16
692	Epipelágico	45	24,7	37,2	0,09	0,69	0,40	0,01	0,02
	Mesopelágico	280	13,7	35,3	0,72	3,70	6,96	0,02	0,14
	Mesopelágico	480	10,7	34,9	1,15	5,90	16,90	0,02	0,07
693	Epipelágico	45	23,5	36,6	0,09	1,10	0,42	0,02	0,05

Epipelágico	160	18,3	36,0	0,33	2,37	1,43	0,03	0,11
Mesopelágico	380	11,5	35,0	1,08	5,32	11,87	0,03	0,25

Apêndice D - Variáveis ambientais da camada d'água do BIOIL 2, incluindo profundidade (m), temperatura (°C), salinidade (psu) e oxigênio dissolvido ($mL.L^{-1}$).

Estação	Zona	Prof.	Temperatura	Salinidade	Oxigênio Dissolvido
819	Epipelágico	46	22,1	36,5	4,9
	Mesopelágico	222	14,9	35,5	5,7
	Mesopelágico	492	10,4	34,8	6,3
821	Epipelágico	42	22,2	36,6	4,9
	Mesopelágico	149	17,7	35,9	5,4
	Mesopelágico	440	10,8	34,9	6,2
822	Epipelágico	45	21,6	36,4	5,0
	Mesopelágico	151	17,4	35,8	5,4
	Mesopelágico	403	11,5	34,9	6,1
823	Epipelágico	45	22,0	36,5	4,9
	Mesopelágico	252	14,9	35,5	5,7
	Mesopelágico	674	6,4	34,4	6,9
824	Epipelágico	45	22,2	36,7	4,9
	Mesopelágico	250	14,3	35,3	5,7

	Mesopelágico	722	6,1	34,4	6,9
825	Epipelágico	83	23,0	36,6	4,9
	Mesopelágico	250	14,4	35,4	5,7
	Mesopelágico	684	6,2	34,4	6,1

Apêndice E - Variáveis ambientais do sedimento do BIOIL 1, incluindo estrato (cm), porcentagem de areia e lama, carbono orgânico total (COT, %), nitrogênio total (NT, %), carbonato de cálcio ($CaCO_3$, %) e $\delta_{13}C$ (‰). Linhas contendo (-) representam a ausência de dados.

Estação	Estrato	Areia	Lama	$CaCO_3$	COT	$\delta^{13}C$	TN
681	0-5	12,967	87,033	11,390	0,450	-20,860	0,070
	5-10	19,800	80,200	8,150	0,310	-21,360	0,050
	10-15	10,400	89,600	9,070	0,160	-22,150	0,020
683	0-5	10,567	89,433	9,585	0,510	-21,070	0,035
	5-10	20,050	79,950	9,070	0,270	-21,650	0,010
	10-15	24,667	75,333	12,420	<0,01	-	<0,01
684	0-5	14,625	85,375	8,883	0,4967	-21,063	0,070
	5-10	23,750	76,250	9,230	0,1500	-21,560	0,020
	10-15	22,700	77,300	9,640	<0,01	-	<0,01
685	0-5	23,850	76,150	6,430	1,740	-20,820	0,170
	5-10	-	-	-	-	-	-
686	0-5	29,233	70,767	6,485	0,475	-21,495	0,055
	5-10	44,450	55,550	7,820	0,240	-20,970	0,050
	10-15	32,100	67,900	5,120	0,320	-20,900	0,020

687	0-5	13,750	86,250	4,990	0,540	-20,640	0,050
	5-10	25,050	74,950	13,780	0,300	-21,300	0,020
	10-15	28,433	71,567	8,270	0,190	-22,350	0,010
688	0-5	34,700	65,300	7,275	0,565	-21,235	0,055
	5-10	47,450	52,550	5,220	0,450	-21,280	0,040
	10-15	45,200	54,800	-	-	-	-
690	0-5	21,767	78,233	3,710	0,440	-22,130	<0,01
	5-10	29,850	70,150	3,530	0,420	-21,250	<0,01
	10-15	31,133	68,867	3,600	0,410	-21,830	<0,01
691	0-5	26,633	73,367	4,635	0,380	-21,260	<0,01
	5-10	26,650	73,350	3,380	0,360	-22,280	<0,01
	10-15	-	-	-	-	-	-

Apêndice F – Correlação entre Produção Primária Quimiossintética (PPQ), Produção Microbiana Heterotrófica (PMH) e as variáveis ambientais da coluna d'água do BIOIL 1. Abaixo da diagonal: coeficiente de correlação de Pearson (r); acima da diagonal: *p-value*. Correlações estatisticamente significativas em negrito ($p < 0,05$).

	Prof.	**Temp.**	**Sal.**	**PPQ**	**PMH**	**Fosfato**	**Silicato**	**Nitrato**	**Nitrito**	**Amônio**
Prof.		**0,00**	**0,00**	0,28	0,77	**0,00**	**0,00**	**0,00**	0,91	0,59
Temp.	**-0,95**		**0,00**	0,16	0,87	**0,00**	**0,00**	**0,00**	0,39	0,12
Sal.	**-0,92**	**0,99**		0,10	0,91	**0,00**	**0,00**	**0,00**	0,22	0,06
PPQ	0,19	-0,26	-0,29		0,79	0,23	0,63	0,27	0,67	0,49
PMH	0,07	-0,04	-0,03	-0,07		0,59	0,55	0,60	0,83	0,98
Fosfato	**0,95**	**-0,89**	**-0,87**	0,22	0,13		**0,00**	**0,00**	0,48	0,25
Silicato	**0,88**	**-0,78**	**-0,73**	0,09	0,15	**0,85**		**0,00**	0,78	0,59
Nitrato	**0,94**	**-0,87**	**-0,83**	0,20	0,13	**0,97**	**0,88**		0,96	0,62
Nitrito	-0,02	-0,15	-0,22	0,08	0,05	0,13	0,05	0,01		**0,00**
Amônio	0,10	-0,28	-0,33	0,13	-0,01	0,21	0,10	0,09	**0,85**	

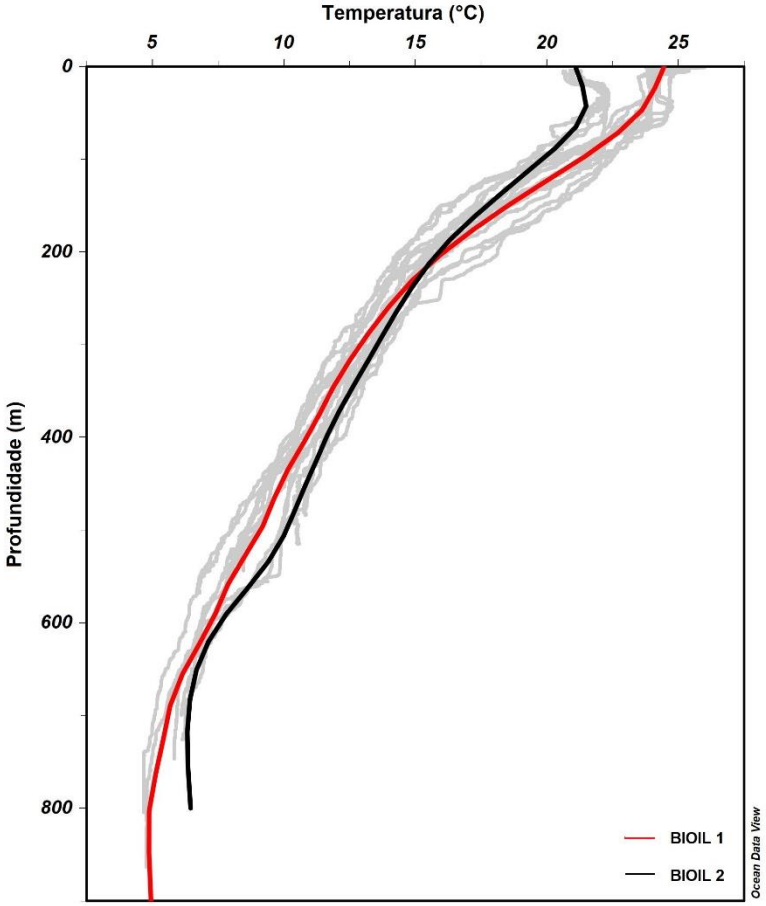
Apêndice G – Correlação entre Produção Primária Quimiossintética (PPQ), Produção Microbiana Heterotrófica (PMH) e as variáveis ambientais da camada d'água do BIOIL 2. Abaixo da diagonal: coeficiente de correlação de Pearson (r); acima da diagonal: *p-value*. Correlações estatisticamente significativas em negrito ($p < 0,05$).

	Prof.	**Temp.**	**Sal.**	**OD**	**PPQ**
Prof.		**0,00**	**0,00**	**0,00**	0,32
Temp.	**-0,94**		**0,00**	**0,00**	0,21
Sal.	**-0,96**	**0,98**		**0,00**	0,18
OD	**0,99**	**-0,97**	**-0,98**		0,24
PPQ	-0,25	-0,31	0,33	-0,29	

Apêndice H – Correlação entre Produção Primária Quimiossintética (PPQ), Produção Microbiana Heterotrófica (PMH) e as variáveis ambientais do sedimento do BIOIL 1. Abaixo da diagonal: coeficiente de correlação de Pearson (r); acima da diagonal: *p-value*. Correlações estatisticamente significativas em negrito ($p < 0,05$).

	PPQ	**PMH**	**Areia**	**Lama**	**$CaCO_3$**	**COT**	**$\delta^{13}C$**	**NT**
PPQ		0,15	0,31	0,31	0,62	**0,05**	0,38	0,14
PMH	0,36		0,35	0,35	0,23	**0,00**	0,48	**0,00**
Areia	0,22	0,25		**0,00**	0,11	0,90	1,00	0,73
Lama	-0,22	-0,25	**-1,00**		0,11	0,90	1,00	0,73
$CaCO_3$	-0,11	-0,32	-0,35	0,35		0,21	0,48	0,76
COT	**0,41**	**0,75**	-0,03	0,03	-0,27		0,06	**0,00**
$\delta^{13}C$	0,20	0,21	0,00	0,00	0,16	0,41		**0,01**
NT	0,31	**0,71**	-0,08	0,08	0,07	**0,85**	**0,57**	

Apêndice I – Taxas brutas de Produção Primária Quimiossintética (PPQ, µgC.m^{-3}.h^{-1}) para o controle da quimiossíntese (sem adição) e para os tratamentos com adição de nutrientes: tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$), cloreto de amônio (NH_4Cl), nitrito de sódio ($NaNO_2$) e acetato de sódio ($C_2H_3NaO_3$) representados em µgC.m^{-3}.h^{-1}.

Estação	Zona	Prof.	PPQ (controle)	Tiossulfato	Amônio	Nitrito	Acetato
819	Epipelágico	46	91,78	1,82	58,96	66,01	32,81
	Mesopelágico	492	25,06	6,81	44,04	38,38	24,54
821	Epipelágico	42	84,66	25,76	48,34	36,91	38,87
	Mesopelágico	440	22,83	30,63	46,49	28,39	56,84
822	Epipelágico	45	9,93	16,37	15,58	17,28	31,65
	Mesopelágico	403	5,56	1,83	7,08	7,10	7,82
823	Epipelágico	45	28,44	19,10	25,13	17,06	32,20
	Mesopelágico	674	28,89	15,46	12,59	11,55	24,78
824	Epipelágico	45	6,05	23,58	27,78	11,18	2,44
	Mesopelágico	722	10,57	33,76	2,51	11,48	12,36

Apêndice J – Perfil vertical de temperatura em novembro, 2019 (BIOIL 1) e julho, 2022 (BIOIL 2).