

REBECA GRACIELA MATHEUS LIZÁRRAGA

**Diversidade e distribuição de procariotos na zona mesopelágica da
Bacia de Santos - Brasil**

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

São Paulo

2022

REBECA GRACIELA MATHEUS LIZÁRRAGA

**Diversidade e distribuição de procariotos na zona mesopelágica
da Bacia de Santos - Brasil**

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

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Vivian Helena Pellizari

Versão original

São Paulo

2022

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Lizárraga, Rebeca Graciela Matheus
Diversidade e distribuição de procariotos na zona
mesopelágica da Bacia de Santos - Brasil / Rebeca
Graciela Matheus Lizárraga; orientadora Vivian
Helena Pellizari. -- São Paulo, 2022.
86 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. zona mesopelágica. 2. bacterioplâncton. 3.
ciclos biogeoquímicos . 4. bomba de carbono. 5.
oceano atlântico sudoeste. I. Pellizari, Vivian
Helena , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rebeca Graciela Matheus Lizárraga.

Título da Dissertação/Tese: Diversidade e distribuição de procariotos na zona mesopelágica da Bacia de Santos – Brasil.

Orientadora: Vivian Helena Pellizari.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **1080/2020** referente ao projeto intitulado: "**Diversidade de micro-organismos pelágicos da bacia de Santos**", sob a responsabilidade do(a) aluno(a) **Rebeca Graciela Matheus Lizárraga** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Vivian Helena Pellizari**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 26 de fevereiro de 2020.

Prof.a. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Prof.a. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Mônica e Richard e meus irmãos Ritch e Mél, que me criaram para ser sonhadora e acreditar no impossível, por se orgulharem e celebrarem todos os meus passos. Obrigada por me passarem ferramentas muito importantes para superar todos os obstáculos da vida: alma leve e riso fácil.

Ao meu par Luiz Fiscina, que me dá todo o suporte para que eu siga meus sonhos e me carrega nos momentos que minha mente não consegue mais andar. Sua existência melhora minha vida e meu amor por você dá a volta no planeta.

À minha vó Lú, que no auge dos seus 91 anos é puro amor em forma de humana e me inspira a ser melhor todos os dias. Por ouvir atenta quando eu falo sobre meu trabalho e por contar para suas amigas: “Minha neta é cientista de bactérias do mar e quer salvar o mundo”. Quem salva meu mundo é ela.

As minhas grandes amigas Carolina Lima, Gleice Fagundes, Ana Karolina, Thaís Goetz e ao meu tovarish Vinícius Gonzaga, por serem o melhor abrigo em todas as tempestades e a maior alegria em todas as celebrações, não importa quantas décadas passem. Vocês sabem o papel especial que cada um de vocês teve nessa etapa.

À minha prima Sônia por abrir as portas da sua casa e do seu coração e me dar todo o apoio para, como ela, seguir a carreira acadêmica.

À minha orientadora, Dra. Vivian Pellizari, pela oportunidade, por acreditar em mim, por toda a paciência e incentivo. Pela inspiração que passa com seu amor pela ciência.

A todos os integrantes do LECOM por tanto apoio nos mais diversos momentos. Em especial à Dra. Natascha Bergo, Ana Butarelli e Lucas Salomão por pegarem na minha mão e me ensinarem tudo que precisei com muita paciência, e à Dra. Amanda Bendia, Francielli Peres, Renato Gamba, Augusto Amendola e Rosa Gamba por me incentivarem o tempo todo e deixarem meus dias mais leves.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e à PETROBRÁS pela possibilidade de coleta e análise do material e ao apoio da ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Brasil. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer pra mim dividir um planeta e uma época com cada um de vocês.”

(Adaptado de Carl Sagan)

Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!
(Mário Quintana)

RESUMO

LIZARRAGA, R. G. M. DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE PROCARIOTOS NA ZONA MESOPELÁGICA DA BACIA DE SANTOS – BRASIL, 2022. X f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A zona mesopelágica se estende de 200 m até 1000 m de profundidade na coluna d'água e é um dos ambientes menos conhecidos do planeta. Sabe-se que os microrganismos quimiossintetizantes e heterotróficos presentes nessa região são os principais responsáveis por processos de importância global como o fluxo de matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes e a bomba de carbono. A Bacia de Santos está localizada na região Sudeste do Brasil e tem papel importante na produção de óleo e gás no país. Esse trabalho foi realizado no âmbito do Projeto Santos "Projeto Santos – Caracterização Ambiental da Bacia de Santos", uma cooperação entre o IO-USP e a PETROBRAS/CENPES, e tem como objetivo caracterizar a diversidade e a distribuição dos procariotos presentes na zona mesopelágica da Bacia de Santos, que está sob a influência da Água Central do Atlântico Sul e Água Intermediária Antártica. As amostras de água foram coletadas em 2019, nas profundidades de 250 m e 900 m em 29 estações oceanográficas ao longo da bacia. As regiões V4 e V5 do gene 16S rRNA foram sequenciadas usando a plataforma Illumina e um total de 9002 ASVs de Bacteria e Archaea foram distribuídas em 48 amostras. Não foram encontradas diferenças significativas na riqueza e diversidade de espécies ao longo da latitude e da longitude utilizando os índices Chao1 e Shannon, mas a análise vertical mostrou maior diversidade de Shannon em 250 m. As comunidades foram agrupadas principalmente por profundidade, de acordo com a métrica de Bray-Curtis. As amostras foram dominadas por microrganismos quimiossintetizantes da ordem Nitrosopumilales (Nitrososphaeria), seguida pelos heterotróficos Pelagibacterales (Alphaproteobacteria) e Alteromonadales (Gammaproteobacteria). As duas profundidades compartilharam um total de 1019 ASVs, enquanto 3261 ASVs foram encontradas apenas a 250 m de profundidade e 3184 apenas a 900 m. Foram encontradas 40 famílias significativamente abundantes em pelo menos uma das profundidades. Os resultados indicam estratificação vertical das comunidades, com maior

diversidade em 250 m, provavelmente devido a menor dominância dos grupos nessa região. A maioria das ASVs foram exclusivas de cada profundidade e muitas famílias foram encontradas em ambas as profundidades, mas representadas por diferentes membros. Esse resultado sugere que diferentes metabolismos do mesmo grupo estão adaptados às condições de profundidade de cada massa d'água encontrada na zona mesopelágica. As ordens mais abundantes encontradas nessa região mostram contribuição relevante para os ciclos do carbono e nitrogênio através principalmente da fixação de CO₂ e N₂, além de terem membros consumidores de DMSP e participarem da quimiossíntese na Bacia de Santos, Oceano Atlântico Sudoeste.

Palavras-chave: Zona mesopelágica. Oceano Atlântico Sudoeste. Bacterioplâncton. Bomba de carbono. Ciclos biogeoquímicos.

ABSTRACT

LIZARRAGA, R. G. M. DIVERSITY AND DISTRIBUTION OF PROKARYOTES IN THE MESOPELAGIC ZONE OF THE SANTOS BASIN - BRAZIL, 2022. X p. Master Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The twilight zone extends between 200 m and 1000 m depth of the ocean water column, and it is one of the least known environments in the planet. Evidence shows that microbial chemosynthesis and heterotrophy significantly contributes to global processes namely the vertical flux of organic matter, nutrient cycling, and the carbon pump. The Santos Basin is located in the Southeast-South region of Brazil and has a major role in oil and natural gas production. As part of the Santos Project – “Santos Basin Environmental Characterization”, a cooperation between the IO-USP and PETROBRAS/CENPES, we characterized the diversity of prokaryotes found at the mesopelagic zone of the Santos Basin, which is under the influence of the South Atlantic Central Water and Atlantic Intermediate Water. Water samples were collected in 2019, at 250 m and 900 m of depth from 29 oceanographic stations across the basin. The regions V4 and V5 of 16S rRNA gene were sequenced using the Illumina platform and a total of 9002 different ASVs of bacteria and archaea were distributed in 48 samples. No differences in species richness and alpha diversity using Chao1 and Shannon indexes were found along latitude or longitude, however, vertical analysis showed higher Shannon diversity at 250 m of depth. The microbial communities were mainly grouped by depth, according to Bray-Curtis metric. All samples were dominated by members of chemosynthetic Nitrosopumilales (Nitrososphaeria), followed by heterotrophic Pelagibacterales (Alphaproteobacteria) and Alteromonadales (Gammaproteobacteria). Both depths shared 1019 ASVs, while 3261 ASVs were found only at 250 m and 3184 only in 900 m. We found 40 families significantly abundant in at least one of the depths. Results indicate vertical stratification of communities and higher diversity at 250 m, probably due to less dominance of groups in that region. Most ASVs were exclusive of each depth and many families were found in both depths but represented by different members in each one. This result shows that different metabolisms from the same group are adapted to the depth conditions of each water mass found in the mesopelagic zone. The

most abundant orders found here highly contribute for nitrogen and carbon cycles mainly through N_2 and CO_2 fixation and their members are known for consuming DMSP and participating in the chemosynthesis of the Santos Basin, South Atlantic Ocean.

Keywords: Mesopelagic realm. South Atlantic Ocean. Bacterioplankton. Biological pump. Carbon cycle. Biogeochemical cycles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado dos eventos microbiológicos relacionados ao carbono na zona mesopelágica.....	23
Figura 2. Representação das principais bacias sedimentares formadas durante separação das placas sul-americana e africana.	32
Figura 3. Mapa de localização da Bacia de Santos.....	33
Figura 4. Mapa geomorfológico da Bacia de Santos..	34
Figura 5. Mapa das estações oceanográficas utilizadas para amostragem da região mesopelágica da Bacia de Santos..	36
Figura 6. Mapa das estações oceanográficas na região mesopelágica da Bacia de Santos com as amostras utilizadas para comparação entre profundidades.	41
Figura 7. Valores de mediana dos parâmetros físicos e químicos por profundidade..	46
Figura 8. Valores de mediana de Chao1 por Estação (a) e por Transecto (b)..	46
Figura 9. Índice de Shannon-Wiener por estação (a) e por transecto (b).....	47
Figura 10. Diagrama de Shepard para o escalonamento multidimensional não-métrico.	48
Figura 11. Escalonamento multidimensional não-métrico utilizando a métrica de Bray-Curtis..	48
Figura 12. Escalonamento multidimensional não-métrico com fatores ambientais.....	50
Figura 13. Abundância relativa de Ordens dominantes (>1%) por estação.....	51
Figura 14. Abundância relativa de Ordens dominantes (>1%) por estação nos estratos de 250 m e 900 m, separadamente.....	52
Figura 15. Abundância relativa de Famílias dominantes (>1%) por estação nos estratos de 250 m e 900 m, separadamente.....	53
Figura 16. Abundância relativa dos grupos funcionais preditos para as comunidades de presentes em cada estação..	55
Figura 17. Abundância relativa dos grupos funcionais preditos para as comunidades de presentes em cada profundidade.....	55
Figura 18. Índice de Chao1 por profundidade.	56
Figura 19. Índice de Shannon-Wiener por profundidade.	57
Figura 20. Diagrama de Venn por profundidade.....	57
Figura 21. Abundância diferencial de ASVs por família entre amostras de 250 e 900 metros. Cada círculo representa uma ASV..	59
Figura 22. Esquema simplificado do ciclo do nitrogênio.....	68

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Subdivisões da região pelágica do oceano.....	42
Tabela 1. Especificação por amostra do número sequências antes e após o tratamento de qualidade.....	43
Tabela 2. Número de ASVs por resolução máxima de classificação obtida.....	54
Tabela 3. Número de ASVs para cada grupo funcional a partir da predição funcional baseada no banco de dados curado do FAPROTAX.....	60
Tabela 4. Abundância relativa de famílias com abundância diferencial em 250 m ou 900 m.....	60
Tabela 5. Abundância relativa de famílias com abundância diferencial em ambas as profundidades.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Água Costeira
ACAS	Água Central do Atlântico Sul
ACF	Alto de Cabo Frio
AF	Alto de Florianópolis
AIA	Água Intermediária Antártica
AOA	Arqueias Oxidadoras de Amônia
APAN	Água Profunda do Atlântico Norte
ASV	<i>Amplicon Sequence Variant</i>
AT	Água Tropical
BC	Bacia de Campos
BOA	Bactérias Oxidadoras de Amônia
BP	Bacia de Campos
CCI	Corrente de Contorno Intermediária
CCP	Corrente de Contorno Profunda
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
COP	Carbono Orgânico Particulado
CTD	<i>Conductivity, Temperature and Depth</i>
DADA2	<i>Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2</i>
DMS	Dimetil Sulfeto
DMSP	Dimetil Sulfônio Propionato
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FAPROTAX	<i>Functional Annotation of Prokaryotic Taxa</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
nMDS	<i>Non-Metric Multidimensional Scale</i>
OD	Oxigênio Dissolvido
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
QIIME2	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNAr	<i>Ribosomal RNA</i>

LISTA DE SIMBOLOS

CO₂	Dióxido de Carbono
N₂	Nitrogênio
NH₃⁺	Amônia
NO₂⁻	Nitrito
NO₃⁻	Nitrato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1	A Zona mesopelágica.....	19
3.2	Atividade de procariotos e importância da zona mesopelágica.....	21
3.3	Diversidade de procariotos na zona mesopelágica	25
3.3.1	<i>Domínio Bacteria</i>	25
3.3.2	<i>Domínio Archaea</i>	26
3.4	Os métodos independentes de cultivo para o estudo da biodiversidade taxonômica.....	27
3.4.1	<i>Sequenciamento do gene 16s rRNA</i>	27
3.4.2	<i>Bioinformática</i>	30
3.5	Área de estudo	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	Extração e Sequenciamento de DNA ambiental mesopelágico da Bacia de Santos	37
4.2	Dados ambientais da Bacia de Santos.....	38
4.3	Diversidade microbiana e influência dos fatores ambientais na Bacia de Santos	39
4.4	Composição taxonômica da comunidade microbiana mesopelágica da Bacia de Santos	40
4.5	Importância ecológica da comunidade presente na zona mesopelágica	40
4.6	Distribuição da comunidade por profundidade	40
5	RESULTADOS	43
5.1	Qualidade do sequenciamento do gene 16s RNAr	43
5.2	Dados ambientais da Bacia de Santos.....	45
5.3	Diversidade microbiana e influência dos fatores ambientais na Bacia de Santos	46
5.4	Composição taxonômica da comunidade microbiana mesopelágica da Bacia de Santos	50
5.5	Importância ecológica da comunidade presente na zona mesopelágica	53
5.6	Distribuição da comunidade por profundidade	56
6	DISCUSSÃO	61

7 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS*	71

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que os oceanos abriguem cerca de $3,6 \times 10^{29}$ células microbianas, que representam em torno de 70% da biomassa total do ambiente marinho e são responsáveis por 98% da sua produção primária, aproximadamente (BAR-ON; PHILLIPS; MILO, 2018; WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998). Os microrganismos estão distribuídos ao longo de toda a coluna d'água, mas sua riqueza maior de espécies é na zona mesopelágica (200 m – 1000 m de profundidade) (QUERO et al., 2020; WILSON et al., 2017).

Na zona mesopelágica, a ausência de luz em nível suficiente para a fotossíntese leva os microrganismos a sustentar suas demandas metabólicas através da heterotrofia, quimiossíntese, quimioautotrofia e metabolismos mixotróficos, alterando a disponibilidade dos diversos tipos de nutrientes utilizados (MESTRE et al., 2018). Logo, os grupos presentes na zona mesopelágica têm papel fundamental na regulação da quantidade de nutrientes que chega até o oceano profundo e sustenta diversos níveis tróficos, através de produção, consumo e reciclagem de matéria orgânica (NAYAK; TWARDOWSKI, 2020; WEINBAUER et al., 2013). As reações de óxido-redução necessárias ao metabolismo dos microrganismos marinhos dessa região também são responsáveis por etapas nos ciclos biogeoquímicos de nutrientes como do hidrogênio, carbono, nitrogênio e enxofre, que são alguns dos constituintes mais importantes das macromoléculas essenciais à vida (FALKOWSKI; FENCHEL; DELONG, 2008).

A região mesopelágica tem sido alvo de diversos estudos, já que sua comunidade procariótica intercepta cerca de 90% do carbono orgânico produzido na zona epipelágica antes que ele chegue a zonas mais profundas (PROUD; COX; BRIERLEY, 2017; ROBINSON et al., 2010, 2010). Essa região também tem participação significativa na produção de CO_2 resultante da respiração e de carbono orgânico através de partículas fecais (ROBINSON et al., 2010).

A comunidade microbiana nessa zona é influenciada por fatores físico-químicos e pode ser sensível a intervenções antropogênicas e alterações climáticas (ABIRAMI et al., 2021; CHAFFRON et al., 2021; FERREIRA et al., 2022). Por essa razão, o conhecimento de sua diversidade e atividade mostra-se indispensável para a futura elaboração de modelos ecológicos e a previsão de sua resposta à essas alterações (AZAM, 1998; RUCKELSHAUS et al., 2013). A extração de hidrocarbonetos e a

previsão de mineração do mar profundo estão entre os muitos fatores que têm chamado a atenção para o oceano recentemente, mas na falta do conhecimento necessário sobre a biodiversidade dos locais a serem explorados, eles vão de encontro com a conservação e a exploração sustentável de recursos marinhos (GLOVER et al., 2018).

Apesar do aumento no interesse do conhecimento nos oceanos nas últimas décadas, o difícil acesso às zonas mais profundas do oceano tende a limitar a maioria dos estudos à zona fótica ou à grupos taxonômicos específicos (HIDALGO; BROWMAN, 2019). A necessidade do estudo específico da zona mesopelágica é reafirmada por trabalhos que mostram a estratificação das comunidades microbianas planctônicas por profundidade no oceano, sendo os dados da zona fótica incapazes de refletir as características das regiões mais profundas (AGOGUÉ et al., 2011; RIGONATO et al., 2021).

Estudos de larga escala como os realizados nas expedições “Tara Oceans” e “Malaspina 2010 Circumnavigation Expedition” utilizaram protocolos sistemáticos que possibilitaram a exploração global em diferentes profundidades e possibilitaram o avanço no conhecimento das características da zona mesopelágica, incluindo a diversidade microbiana (ACINAS et al., 2021; PIERELLA KARLUSICH et al., 2021; RIGONATO et al., 2021). Porém, mesmo nesses estudos, a amostragem no Oceano Atlântico Sudoeste foi limitada, sendo a pesquisa aqui apresentada o primeiro trabalho sobre diversidade microbiana realizado em larga escala nessa região.

A caracterização da diversidade e a distribuição espacial dos procariotos presentes na zona mesopelágica da Bacia de Santos realizada nesse estudo visa investigar taxonomia, diversidade, riqueza, distribuição espacial e a estrutura da comunidade microbiana encontradas na região e sua relação com as condições ambientais e processos oceanográficos a que são expostas. Espera-se com esse estudo auxiliar no levantamento da diversidade microbiana no Atlântico Sudoeste, na exploração de suas funções e respostas a alterações ambientais e demais atividades, como monitoramento a ser realizado na Bacia de Santos, que é de grande interesse para o desenvolvimento econômico do Brasil.

Esse trabalho foi realizado no âmbito do Projeto Santos “Projeto Santos – Caracterização Ambiental da Bacia de Santos”, coordenado pela Petróleo Brasileiro S.A. (PETROBRAS) e pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP) e faz parte do subprojeto 8: “Abundância, distribuição e caracterização funcional

da comunidade microbiana do sistema pelágico da Bacia de Santos”, coordenado pela Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é descrever a diversidade e a distribuição das bactérias e arqueias planctônicas autotróficas e heterotróficas presentes na região mesopelágica da Bacia de Santos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a abundância relativa e a riqueza dos domínios Bacteria e Archaea, assim como a sua diversidade taxonômica e a estrutura da comunidade na região mesopelágica;
- Identificar as condições oceanográficas e os parâmetros ambientais que influenciam a distribuição das comunidades de procariotos em diferentes profundidades da região mesopelágica estudada;
- Inferir a importância ecológica dos grupos dominantes presentes na região mesopelágica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A Zona mesopelágica

Cerca de 70% da superfície do planeta é ocupada pelos oceanos, que abrigam em torno de 97% da água da biosfera (ORCUTT et al., 2011). A zona pelágica do oceano corresponde à coluna d'água e pode ser dividida em diversas regiões de acordo com a profundidade (Quadro 1).

Quadro 1. Subdivisões da região pelágica do oceano.

Profundidade	Ambiente	Zona
Até ~200 m	Fótico	Epipelágica
~200 m – ~1000 m	Penumbra	Mesopelágica
~1000 m – ~4000 m	Afótico	Batipelágica
-		Abissopelágica
-		Hadopelágica

Fonte: Elaborado pelo autor.

A área fótica é designada zona epipelágica e se estende da superfície até cerca de 200 m de profundidade. Nessa região, ocorre o processo de fotossíntese, que utiliza nitrato e produz oxigênio. A penetração de luz nessa zona depende da densidade do sedimento e da quantidade de plâncton presente no local (COSTELLO; BREYER, 2017).

A área intermediária é designada de mesopelágica, e se estende de 200 m até cerca de 1000 m de profundidade. Nela, há irradiação, mas insuficiente para a fotossíntese. A alta de nutrientes tem como consequência elevadas taxas de alimentação e respiração, resultando em baixos níveis de oxigênio (COSTELLO; BREYER, 2017; ROBINSON et al., 2010).

Abaixo da zona mesopelágica estão a zona batipelágica, em média entre 1000 m e 4000 m de profundidade, e as zonas abissopelágica e hadopelágica, cuja profundidade varia geograficamente, chegando até cerca de 10.000 m. Todas elas são afóticas, e, devido à menor concentração de nutrientes, abrigam baixas taxas de atividade e de respiração, consumindo menos oxigênio (COSTELLO; BREYER, 2017).

Apesar de extensa, a zona mesopelágica também é um dos ambientes menos conhecidos do planeta. Entre as dificuldades para sua exploração estão as barreiras tecnológicas, o alto custo na amostragem devido às grandes profundidades, e a impossibilidade de seu monitoramento por satélite (PROUD; COX; BRIERLEY, 2017). Além disso, a frequente descoberta de novos clados de organismos ainda não classificados desafia os métodos tradicionais de análise (ROBISON, 2009; WEBB; VANDEN BERGHE; O'DOR, 2010).

Essa zona é heterogênea em diversos aspectos. Seu topo pode ser definido como a base da zona eufótica, onde há interface com os gradientes da zona epipelágica e a presença de luz, apesar de insuficiente para fotossíntese. Já sua base tem irradiação insuficiente inclusive para a visibilidade de presas por seus predadores, influenciando a atividade de macro e microrganismos (COSTELLO; BREYER, 2017; ROBISON, 2009). O metabolismo dos organismos dessa região e sua migração vertical são importantes para ciclos biogeoquímicos e de fluxo de matéria, processos relevantes para várias áreas da ciência (BUESSELER et al., 2007).

A distribuição da micro e macrofauna na zona mesopelágica é muito influenciada pelas correntes e pelas condições ambientais. Essas condições diferem principalmente entre massas d'água, que variam geograficamente e também com a profundidade (RIGONATO et al., 2021).

Por não abrigar o processo de fotossíntese, as demandas energéticas dos seres vivos da região mesopelágica são supridas pela quimioautotrofia, e também por diversos metabolismos que utilizam uma fração da matéria orgânica produzida na superfície, como heterotrofia e mixotrofia (MESTRE et al., 2018). A diversidade de organismos e metabolismos encontrada nessa zona ainda é pouco explorada, considerando os importantes processos que ela abriga (ARÍSTEGUI et al., 2020; CAVAN et al., 2019; MANNA et al., 2020).

A limitação do conhecimento desse ecossistema diminuí a precisão dos modelos preditivos sobre a influência dos diversos impactos decorrentes das atividades antropogênicas. As mudanças climáticas e a acidificação dos oceanos, por exemplo, podem ter efeitos significativos no papel de diversos grupos de microrganismos. Além disso, a previsão das atividades de mineração e a pesca têm crescido globalmente, podendo resultar em ameaças ainda desconhecidas para o equilíbrio ambiental que depende das atividades da zona mesopelágica (RIGONATO et al., 2021; SINGH et al., 2010; SUTTON et al., 2017).

3.2 Atividade de procariotos e importância da zona mesopelágica

Os microrganismos compõem grande parte do plâncton marinho, formando redes complexas de interações através dos oceanos (LIMA-MENDEZ et al., 2015). Sua distribuição varia ao longo da coluna d'água, com o domínio Bacteria sendo dominante nas zonas superficiais e o domínio Archaea em maiores profundidades (ALVES

JUNIOR et al., 2015; KARNER; DELONG; KARL, 2001). A zona mesopelágica tem uma riqueza maior de espécies de procariotos quando comparada tanto com a zona epipelágica quanto com a zona batipelágica (QUERO et al., 2020; WILSON et al., 2017).

A comunidade microbiana da zona mesopelágica conecta a produção primária da superfície com os consumidores dos oceanos profundos e é responsável por quase toda a respiração nos oceanos, além da reciclagem de nutrientes (MORAN, 2015). Ao longo da coluna d'água, bactérias e arqueias utilizam carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre para sintetizar componentes orgânicos necessários ao seu metabolismo, o que altera sua disponibilidade no ambiente (SONG et al., 2019). A atividade microbiana no ambiente marinho tem efeito na regulação dos gases estufa, alterando o clima da Terra e auxiliando na redução dos efeitos das mudanças climáticas (SINGH et al., 2010).

Entre os diversos processos de grande relevância para a vida na Terra que ocorrem no oceano, está o armazenamento de carbono. Esse processo tem início quando o fitoplâncton fixa o carbono inorgânico na superfície, através da fotossíntese. Na zona mesopelágica, o fitoplâncton pode ser consumido pelo zooplâncton, krill e outros organismos, e suas células podem ser lisadas por vírus, ambos resultando no fluxo de matéria orgânica pela teia trófica (TURNER, 2015). A maior parte desse carbono será remineralizada em dióxido de carbono pela respiração dos organismos. Porém, até 3% do total será exportado para maiores profundidades e armazenado por centenas a milhares de anos no oceano profundo. Esse processo é chamado de sequestro de carbono (BRIGGS; DALL'OLMO; CLAUSTRE, 2020; ROCHA; PASSOW, 2007) e auxilia na manutenção do clima por tira-lo da atmosfera (DANOVARO et al., 2011).

O sucesso desse armazenamento e a quantidade de carbono armazenada dependem diretamente da eficiência de seu transporte ao longo de toda a zona mesopelágica. A interação de diversos eventos biológicos com esse transporte é conhecida como bomba biológica (CAVAN et al., 2019; VOLK; HOFFERT, 1985) (Figura 1).

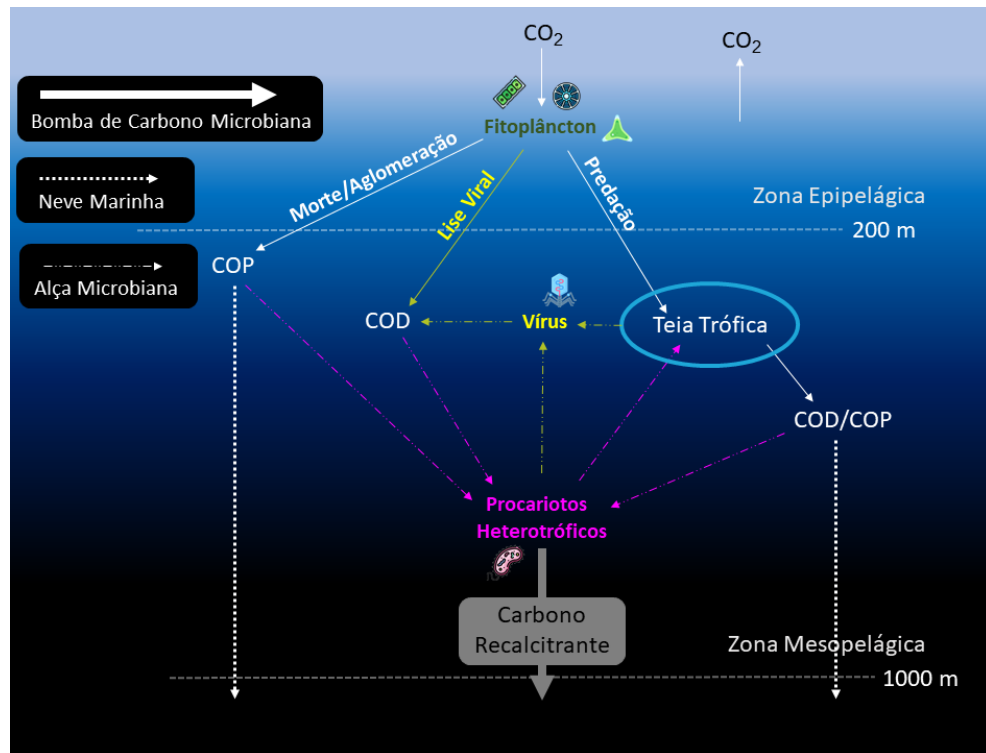


Figura 1. Esquema simplificado dos eventos microbiológicos relacionados ao carbono na zona mesopelágica. As linhas pontilhadas indicam a neve marinha. As linhas tracejadas indicam o fluxo da alça microbiana. A linha de maior espessura indica a produção de carbono recalcitrante pelos procaríotos heterotróficos. COD = Carbono Orgânico Dissolvido. COP = Carbono Orgânico Particulado. Fonte: Elaborado pelo autor.

Um desses eventos consiste na aglomeração de detritos orgânicos, minerais, microrganismos e biopolímeros secretados por microrganismos através de processos químicos, físicos e biológicos. Esses agregados macroscópicos tendem a afundar, processo conhecido como neve marinha. A neve marinha funciona como um transporte passivo de matéria orgânica e nutrientes para áreas mais profundas do oceano, e é a principal fonte de substrato que sustenta as teias alimentares dos heterotróficos nas regiões mais profundas (QUIGG et al., 2021).

O volume desses aglomerados tende a diminuir com a profundidade e estima-se que apenas 1% alcance o sedimento marinho, já que são consumidos ao longo da coluna d'água (CAVAN et al., 2019; DURKIN; ESTAPA; BUESSELER, 2015; QUIGG et al., 2021). Principalmente por conter microrganismos, a neve marinha também está associada à produção, decomposição e reciclagem de nutrientes ao longo da coluna d'água (CAVAN et al., 2019; FALKOWSKI; FENCHEL; DELONG, 2008).

Além da neve marinha, a alça microbiana também faz parte da bomba biológica. Nesse processo, organismos heterotróficos como bactérias, vírus e ciliados se

alimentam de partículas ou outros organismos presentes na coluna d'água e, por consequência, transformam a matéria orgânica particulada em matéria orgânica dissolvida, que pode ser facilmente consumida por outros organismos (ANDERSON; TANG, 2010). Diversos grupos de microrganismos também consomem matéria orgânica dissolvida, permitindo que o carbono orgânico volte para a cadeia alimentar e esteja disponível para níveis tróficos superiores. Esse processo é essencial para a reciclagem de nutrientes nos oceanos, pois garante a sobrevivência de diversos organismos (MANNA et al., 2020).

Apesar da maioria dos microrganismos da coluna d'água ser de vida livre, cerca de 15% deles se ligam às partículas da neve marinha para consumo de nutrientes. Nesses casos, foram identificados mecanismos de *quórum sensing*, mostrando a produção simultânea de exoenzimas pela comunidade de bactérias agregada às partículas (GRAM et al., 2002; HERNDL; REINTHALER, 2013; MISLAN et al., 2014). Essas bactérias são as principais responsáveis pela bomba de carbono microbiana, ou seja, produzem carbono recalcitrante, forma que é mais facilmente armazenada no oceano profundo por ser muito mais resistente à degradação.

Diferentes grupos de bactérias utilizam carbono orgânico para gerar energia, porém, sabe-se que cerca de apenas 10% desse consumo é de fato convertido em açúcar, sendo o restante transformado em carbono recalcitrante (BUCHAN et al., 2014). Esse tipo de carbono pode ser liberado diretamente pelas bactérias ou durante a sua lise, que ocorre principalmente por ataques de vírus.

Os vírus são os seres mais abundantes nos oceanos, e neles exercem diversas funções ecológicas, como o *viral shunt* (em tradução livre, desvio viral). Nesse caso, a infecção do hospedeiro pelo vírion causa a liberação não só de novas partículas virais, mas também de matéria orgânica particulada e elementos como o carbono recalcitrante para o meio (LARA et al., 2017).

Os processos descritos até aqui são definidos pela comunidade presente no ambiente e pelo funcionamento de seu metabolismo (SUN; DEBELJAK; OBERNOSTERER, 2021), sendo que ambos podem variar não só com a latitude e longitude, mas também de acordo com fatores físicos e químicos como salinidade, temperatura, luminosidade e disponibilidade de nutrientes (FERREIRA et al., 2022). Considerando esses fatores, estudos apontam que tanto as zonas pelágicas como as massas d'água são limites bem definidos ao longo da coluna d'água nos oceanos (ABIRAMI et al., 2021; CHAFFRON et al., 2021; FERREIRA et al., 2022).

3.3 Diversidade de procariotos na zona mesopelágica

3.3.1 Domínio Bacteria

Diversos trabalhos na região mesopelágica descrevem a principal formação de sua comunidade por bactérias do filo Proteobacteria. Dentro desse grupo, a classe Gammaproteobacteria e Alphaproteobacteria mostram predominância nos oceanos Pacífico Norte e Sul (KONG et al., 2021; RIGONATO et al., 2021; SANZ-SÁEZ et al., 2020), Atlântico Norte e Sul (AGOGUÉ et al., 2011; FERREIRA et al., 2022; RIGONATO et al., 2021), Índico (DJURHUUS et al., 2017; SANZ-SÁEZ et al., 2020) e Austral (YU et al., 2015). Dentre as ordens mais encontradas, inclusive com mais representantes cultiváveis, estão Pelagibacterales, Sphingomonadales, Caulobacterales, Hyphomicrobiales e Rhodobacterales, pertencentes à Alphaproteobacteria e Alteromonadales, Oceanospirillales, Enterobacterales, Pseudomonadales e Cellvibrionales, pertencentes à Gammaproteobacteria (AGOGUÉ et al., 2011; KONG et al., 2021; SANZ-SÁEZ et al., 2020).

A ordem Pelagibacterales, anteriormente referida como SAR11, é o grupo mais abundante em todo o oceano, provavelmente por sua capacidade de oligotrofia e absorção de aminoácidos livres no meio. O metabolismo variado de seus membros resulta na utilização de várias formas de carbono para geração de energia, e por isso têm participação importante no ciclo do carbono (MORRIS et al., 2002; SUN et al., 2011; SUNAGAWA et al., 2015; TRIPP, 2013).

Alteromonadales e Oceanospirillales são grupos que mostram mais abundância em águas mais profundas, como na zona inferior da região mesopelágica e na região batipelágica (AGOGUÉ et al., 2011). A potencial contribuição de Alteromonadales, Enterobacterales e Rhodobacterales na reciclagem de matéria orgânica dissolvida tem sido amplamente estudada. Sabe-se que alguns de seus representantes possuem grandes quantidades de hidrolases e proteases, capazes de quebrar matéria orgânica particulada em uma vasta variedade de substratos, que podem ser usados como fonte de carbono por outros grupos (KONG et al., 2021; PEDLER; ALUWIHARE; AZAM, 2014). Oceanospirillales é capaz de manter suas funções em baixas temperaturas e concentração de nutrientes e altas pressões. Alguns de seus representantes, como *Alcanivorax*, mostram interações positivas com membros de Alteromonadales, além

de serem capazes de utilizar hidrocarbonetos em seu metabolismo (AGOGUÉ et al., 2011; CAO et al., 2019).

Outras classes frequentemente descritas na região são Flavobacteria (filo Bacteroidetes) e Actinobacteria (filo Actinobacteriota) (SANZ-SÁEZ et al., 2020). Ambas são comumente encontradas acopladas a partículas, e participam da remineralização dos nutrientes aglomerados através da degradação de polissacarídeos. Os dois grupos são importantes nos processos de remineralização em *blooms* de fitoplâncton e vazamentos de óleo, porém Flavobacteria tende a se conectar com partículas em suspensão, enquanto Actinobacteria é mais frequentemente encontrada associada a aglomerados que afundam na coluna d'água (BUCHAN et al., 2014; DURET; LAMPITT; LAM, 2019).

3.3.2 Domínio Archaea

Os estudos acerca do domínio Archaea ainda são preliminares quando comparado ao domínio Bacteria e, considerando a zona mesopelágica, as dificuldades de amostragem tornam a exploração desse domínio ainda mais limitada. Por essa razão, a quantidade de grupos ainda não classificados também é maior para esse domínio (HU et al., 2015; INGALLS et al., 2006; SEYLER et al., 2018; SWAN et al., 2014).

As arqueias tendem a ser mais abundantes em maiores profundidades, e representam uma porcentagem maior da comunidade quando comparado às bactérias na região mesopelágica (CALLEJA et al., 2018; SEYLER et al., 2018).

O filo de arqueias mais encontrado na região mesopelágica dos Oceanos Atlântico Norte e Sul (FERREIRA et al., 2022; SEYLER et al., 2018; SUNAGAWA et al., 2015; SWAN et al., 2014), Pacífico Norte e Sul (KARNER; DELONG; KARL, 2001; SUNAGAWA et al., 2015; SWAN et al., 2014) e Índico (CALLEJA et al., 2018; DJURHUUS et al., 2017; SEYLER et al., 2018) é o Crenarchaeota, representado principalmente pela classe Nitrososphaeria. A família mais descrita dentro dessa classe é a Nitrosopumilaceae, e o gênero mais encontrado na região é *Nitrosopumilus* (CALLEJA et al., 2018; DJURHUUS et al., 2017; SEYLER et al., 2018; SWAN et al., 2014). Em seguida, são reportados representantes dos grupos II e III de Euryarchaeota, em quantidades significativamente menores (DELONG et al., 2006; FERREIRA et al., 2022; KARNER; DELONG; KARL, 2001).

A classe Nitrososphaeria é composta de organismos de vida livre e tem sido estudada por seu potencial de fixação do carbono utilizando uma modificação na via do 3-hidroxipropionato/ 4-hidroxibutirato, que gera mais energia. Além disso, a oxidação aeróbia de amônia a nitrito, faz desse grupo importante para o ciclo do nitrogênio e para a quimioautotrofia nos oceanos (SWAN et al., 2014; WUCHTER et al., 2006).

3.4 Os métodos independentes de cultivo para o estudo da biodiversidade taxonômica

Os métodos tradicionais de cultivo de microrganismos de amostras ambientais possibilitam análises fisiológicas e morfológicas (SANZ-SÁEZ et al., 2020). Porém, estima-se que cerca de 99% dos microrganismos marinhos não tenham representantes cultivados em laboratório, devido às limitações para replicar suas condições de crescimento (JIAO et al., 2018; JUNG et al., 2022).

O avanço de técnicas independentes de cultivo, que se baseiam na análise de DNA extraído diretamente das amostras ambientais, permitem o estudo desses grupos e têm revolucionado a taxonomia microbiana (SPANG; CACERES; ETTEMA, 2017). A introdução de ferramentas moleculares possibilitou a evolução do estudo da estrutura de sua comunidade, seu metabolismo e sua relação com o ambiente, disponibilizando uma quantidade massiva de dados que descrevem a taxonomia das comunidades e possibilitam o descobrimento de novas espécies (AGOGUÉ et al., 2011). Essas informações também permitem estimar a riqueza e diversidade das populações, contribuindo para a compreensão da dinâmica e biogeografia desses microrganismos (GALAND et al., 2009).

3.4.1 Sequenciamento do gene 16s rRNA

Bactérias e arqueias possuem três tipos de RNA ribossomal: RNAr 16S, RNAr 23S e RNAr 5S. Devido às baixas taxas de mutação do gene codificador do RNAr 16s, seu sequenciamento tem sido amplamente empregado na maioria dos métodos moleculares para o estudo da ecologia microbiana, sendo o marcador taxonômico mais utilizado para análises de microbiologia ambiental (CAPORASO et al., 2011; KARNER; DELONG; KARL, 2001; SPANG; CACERES; ETTEMA, 2017).

Esse gene possui 9 regiões hipervariáveis distintas (V1 – V9), que são sequenciadas separadamente ou em conjuntos, dependendo do objetivo da análise. *Primers* diferentes são utilizados para cada região escolhida, com o intuito de otimizar a cobertura e a resolução filogenética, obter um produto de baixo custo e alta qualidade e possibilitar a comparação dos resultados com outros estudos e laboratórios (PARADA; NEEDHAM; FUHRMAN, 2016).

O sequenciamento de regiões do DNA recebeu grande incentivo desde seu surgimento, e ao longo dos anos tem se tornado mais comumente utilizado em diversas áreas da ciência. Isso se deve à redução de custo; ao aumento de modelos de organismos disponíveis, que permitem a utilização de *reads* menores para o mapeamento através de comparação com uma referência; ao aumento na variedade de métodos moleculares que possibilitam o acesso à diversos fenômenos biológicos e à praticidade crescente nas estratégias para o esse sequenciamento, consequência do progresso em diversas áreas como a microscopia, engenharias, bioquímica e outras (SHENDURE; JI, 2008).

Diferentes técnicas são utilizadas para determinar a sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA, através de processos bioquímicos. Uma dessas técnicas foi desenvolvida por Sanger e Coulson, e se destacou pela facilidade na interpretação dos dados gerados e diminuição do uso de produtos tóxicos durante o processo (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). O método Sanger, como foi nomeado, se tornou o método padrão de sequenciamento e consiste em uma técnica semiautomática que prepara o DNA pelo método *shotgun*, baseada em capilaridade.

Nesse método, são gerados fragmentos aleatórios de DNA, que posteriormente são clonados dentro de plasmídeos de *Escherichia coli* e, para cada reação, são isolados os plasmídeos de apenas uma colônia de bactéria escolhida (SHENDURE; JI, 2008). A reação é cíclica e nela são adicionadas concentrações controladas de nucleotídeos marcados e não marcados. A extensão dos *primers* é interrompida pela incorporação de dideoxynucleotídeos marcados com fluorescência (ddNTPs). De acordo com a incorporação dos nucleotídeos terminadores, as diferentes fitas de DNA são interrompidas em diferentes pontos (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Para a obtenção da sequência final, os fragmentos de fita simples são separados por eletroforese baseada em capilaridade. A excitação a laser das marcações fluorescentes no final do capilar permite a leitura das bases de acordo com a emissão de quatro cores, que geram um gráfico representando as diferentes bases

do DNA. Esses gráficos são facilmente traduzidos através de um software (SHENDURE; JI, 2008). Apesar de popular, esse método tem desvantagens como alto custo e baixa capacidade de geração de dados.

Nas décadas seguintes, avanços no tempo de sequenciamento, diminuição do custo do processo e a otimização dos equipamentos trouxeram uma nova geração de sequenciadores, denominados “NGS” (*Next Generation Sequencing*) e, entre eles, surgiu a tecnologia Illumina (CHAISSON; PEVZNER; TANG, 2004). Novos equipamentos para diferentes objetivos também vêm sendo regularmente desenvolvidos e lançados no mercado com diferentes capacidades de leitura e tempo de análise, como *NextSeq* e *NovaSeq* da Illumina (MODI et al., 2021; PAIJMANS et al., 2017).

A tecnologia Illumina utiliza a enzima DNA polimerase, que incorpora os nucleotídeos marcados com fluoróforos durante o sequenciamento e permite que os fragmentos sejam amplificados na superfície de clonagem, dispensando a necessidade do uso da PCR (ANDERSON; TANG, 2010). Quando comparada ao Sanger, a cobertura do sequenciamento Illumina chega a ser 30 vezes melhor e o processo é menos oneroso financeiramente. Porém, o comprimento das sequências geradas é menor (cerca de 200 pb, enquanto Sanger gera fragmentos de até 750pb) (CHAISSON; PEVZNER; TANG, 2004). A empresa Illumina lançou então a plataforma *MiSeq*, com o objetivo de gerar informações mais confiáveis, utilizando *reads* pareados de 250 pb a 300 pb. Essa inovação auxiliou o estudo das comunidades microbianas, contornando a limitação imposta pelo pequeno tamanho dos *reads* (JEON et al., 2015).

Na plataforma *MiSeq*, primeiramente o DNA fragmentado aleatoriamente é ligado a adaptadores em ambas as extremidades. Oligonucleotídeos complementares a esses adaptadores estão fixados ao suporte sólido (*flowcell*), que então recebe as moléculas de DNA fita simples de acordo com a complementariedade entre os adaptadores. Nucleotídeos não marcados se conectam a fita simples que estão presas na placa, complementando a fita molde no primeiro ciclo. Em seguida, é formada uma estrutura em ponte a enzima polimerase incorpora os nucleotídeos complementares, formando fita dupla. Inicia-se então o processo de desnaturação para que as fitas sejam separadas e linearizadas. A etapa de amplificação sólida em ponte é reiniciada em seguida, para a geração de novas fitas de DNA complementares (JEON et al., 2015; SHENDURE; JI, 2008).

Após a geração de milhares de clusters de fragmentos de DNA fita simples em cada linha da *flowcell*, são fornecidos nucleotídeos terminadores marcados para o sequenciamento dentro de cada cluster. A alta densidade de clusters de sequências emite sinal de fluorescência a cada nucleotídeo terminador que é incorporado, fornecendo a detecção exata. Após a leitura do sinal, os reagentes excedentes são removidos através de uma lavagem, e as imagens de cada ciclo são utilizadas para a leitura das bases (JEON et al., 2015; SHENDURE; JI, 2008).

Para a análise de altos números de sequências pareadas geradas pela plataforma *MiSeq*, foi necessário o desenvolvimento de diferentes ferramentas de bioinformática, que contam com estratégias para avaliar a qualidade das sequências, corrigir erros no sequenciamento, remover quimeras e outros procedimentos que garantem a confiabilidade no resultado (CAPORASO et al., 2011).

3.4.2 Bioinformática

O papel do DNA como codificador da informação genética foi validado em 1952 por Hershey e Chase e, em 1953, sua estrutura de dupla hélice foi descoberta por Watson, Crick e Franklin (AVERY; MACLEOD; MCCARTY, 1944; WATSON; CRICK, 1953). Apenas em 1962, foi desenvolvido o primeiro programa computacional designado para determinar a estrutura primária de proteínas, o COMPROTEIN. Margaret Dayhoff, chamada de “mãe e pai da bioinformática”, foi a pioneira na aplicação de métodos computacionais para o campo da bioquímica, e entre 1958 e 1962, trabalhou com David J. Lipman no desenvolvimento do COMPROTEIN (DAYHOFF; LEDLEY, 1962; MOODY, 2004).

As décadas seguintes contaram com a evolução desse campo, mas apenas entre os anos de 2000 e 2010, com o surgimento dos sequenciamentos de nova geração, houve a popularização da bioinformática (GAUTHIER et al., 2019). Com o objetivo de organizar os dados e permitir sua visualização integrada, avanços nessa área oferecem ferramentas para a interpretação de resultados e análise de microbiomas (YADEV; CHAUHAN; KUSHWAHA, 2019).

Atualmente, a escolha da ferramenta ideal chega a ser desafiadora, dado a quantidade de opções disponíveis. Além disso, há um aumento frequente no oferecimento de ferramentas intuitivas, que possibilitam sua utilização para usuários

não familiarizados com o campo da programação computacional (AFGAN et al., 2016; GAUTHIER et al., 2019).

Para os dados de sequenciamento do gene RNAr 16S, o programa QIIME (1 e 2) e a ferramenta *Phyloseq* estão entre os mais utilizados (BOLYEN et al., 2019; CAPORASO et al., 2010; SANTOS et al., 2020). Para trabalhar com as sequências, é inicialmente realizada a etapa de *demultiplex* para a remoção de *barcodes*, além do controle de qualidade. Em seguida, são geradas Sequências Variantes de *Amplicon* (ASVs). ASVs possibilitam que as sequências sejam assinaladas à sua taxonomia correspondente com alta precisão, dado que é possível identificar a variação na sequência por uma única mudança de nucleotídeo. A partir da atribuição taxonômica das ASVs, são feitas as análises ecológicas (HAO; PEI; BROWN, 2017; SANTOS et al., 2020).

3.5 Área de estudo

O Oceano Atlântico Sul teve origem a partir do rompimento do supercontinente Gondwana, durante a era Mesozoica. Essa abertura traz formações ao longo de toda a costa leste da América do Sul, originando as diferentes bacias que conhecemos hoje na costa leste do Brasil, entre elas, a Bacia de Santos (Figura 2). Durante o período Cenozoico, a plataforma continental e o talude foram bem definidos, contribuindo para a formação de depósitos sedimentares (CAINELLI; MOHRIAK, 1999; MOHRIAK, 2003).

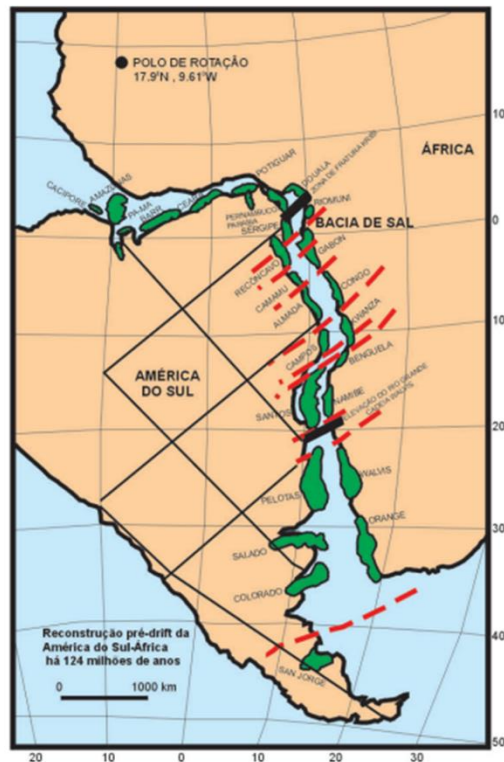


Figura 2. Representação das principais bacias sedimentares formadas durante separação das placas sul-americana e africana. Fonte: MOHRIAK (2003).

A Bacia de Santos é uma bacia essencialmente marítima que se estende por aproximadamente 800 quilômetros paralelamente à costa, passando pelos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, e abrangendo a plataforma continental, talude e platô de São Paulo (PEREIRA et al., 1986). Sua área total engloba mais de 350.000 km², dos quais cerca de 200.000 km² são ocupados por lâminas d'água de até 400 m de profundidade, sendo os outros 150.000 km² ocupados por profundidades que iniciam em 400 m e superam 3500 m (MOREIRA et al., 2007) (Figura 3).



Figura 3. Mapa de localização da Bacia de Santos. BP = Bacia de Pelotas. AF = Alto de Florianópolis. ACF = Alto de Cabo Frio BC = Bacia de Campos. Fonte: adaptado de GAMBOA (2008).

Definida geologicamente como uma depressão, essa bacia está localizada entre as coordenadas geográficas $28^{\circ}40'S$ e $26^{\circ}00'S$ na costa leste brasileira, sendo limitada ao norte pelo Alto de Cabo Frio, separando-a da Bacia de Campos, e ao sul pelo Lineamento de Florianópolis, com feições que a separam da Bacia de Pelotas (GAMBOA et al., 2008). A leste, se estende até o limite exterior do platô de São Paulo e a oeste pela Serra do Mar (MOREIRA et al., 2007).

A largura da plataforma continental dessa bacia varia entre 100 km e 230 km, sendo sua porção mais larga localizada em frente a cidade de Santos, em São Paulo, com ~230 km. Nas extremidades estão suas porções mais estreitas, com ~50 km em Cabo Frio e ~70 km no Cabo de Santa Marta (CASTRO et al., 2006). Sua morfologia de fundo exhibe irregularidades como montiformas e depressões erosivas, sendo dominada por processos costeiros (DIAS, 2016; FILHO; MENDES, 1997). A quebra da plataforma marca sua passagem para o talude. Essa quebra ocorre próxima a isóbata de 200 m e é originada por um processo erosivo causado pela Corrente do Brasil, que forma canais e escarpas (DIAS, 2016).

A região do talude, dominada por processos oceânicos, tem inclinação suave na sua parte superior (até ~1000 m), que é acentuada com a profundidade até a sua base, localizada entre 1800 m e 2200 m (DIAS, 2016; FILHO; MENDES, 1997). Essa região mostra feições distribuídas de acordo com a profundidade, sendo *pockmarks* ativos e inativos encontrados em profundidades menores e canais de depósitos contoníticos em profundidades maiores. Esses canais tendem a serem formados pela incidência da Corrente de Contorno Intermediária (CCI) e Corrente de Contorno Profunda (CCP) (DIAS, 2016) (Figura 4).

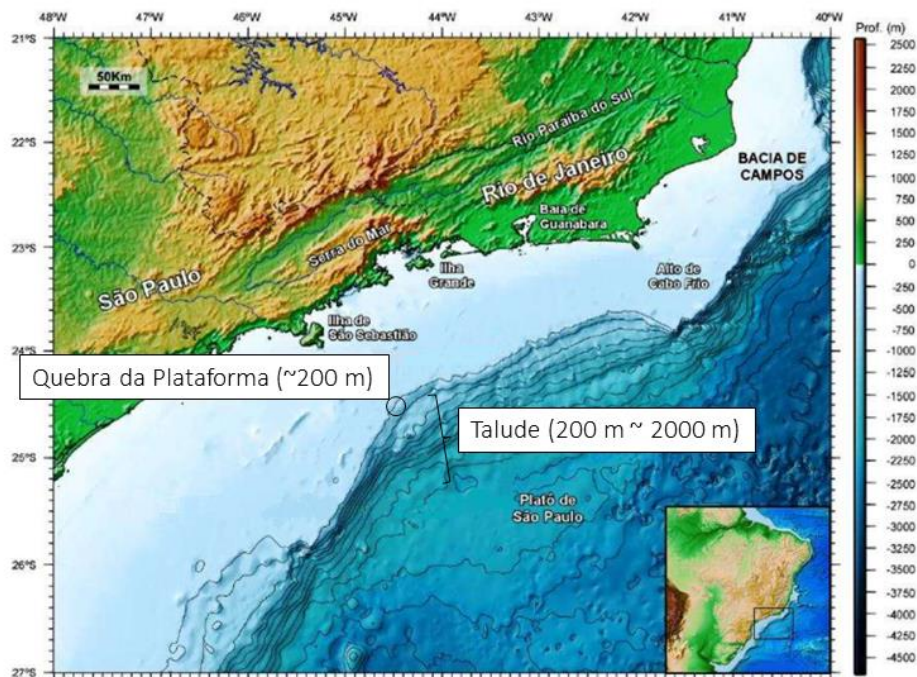


Figura 4. Mapa geomorfológico da Bacia de Santos. Mapa com ênfase na quebra da plataforma continental e região do talude continental. Fonte: adaptado de AMORIM (2013).

As massas de água presentes nessa região são a Água Costeira (AC), Água Tropical (AT), Água Central do Atlântico Sul (ACAS), Água Intermediária Antártica (AIA) e Água Profunda do Atlântico Norte (APAN) (VIANA et al., 1998).

A AC é uma mistura de águas continentais e marinhas, e tem salinidade <34,0. Ela é restrita à desembocadura de rios e a região de plataforma interna (STRAMMA; ENGLAND, 1999).

A AT é formada em baixas latitudes, sua temperatura é >20°C e sua salinidade >36,4. Localizada na superfície, ela é transportada pela Corrente do Brasil (CB) para o Sul (Castro e Miranta 1998).

Com temperatura $<18^{\circ}\text{C}$ e salinidade $<36,4$, a ACAS tem seu núcleo no talude, abaixo da AT, entre 100 m e 500 m de profundidade. Ela é formada na Convergência Subtropical pela mistura de águas subtropicais (oligotróficas) e águas subantárticas (ricas em nutrientes) e participa do giro subtropical. Após fluir em sentido leste, volta à margem brasileira pela Corrente Sul-Equatorial (SILVEIRA et al., 2000; STRAMMA; ENGLAND, 1999).

A circulação profunda é localizada abaixo da ACAS (600 m – 3.500 m de profundidade). Ela é formada pela AIA, que tem temperaturas baixas (entre 2°C e 6°C) e salinidade mínima de 34,2 e a APAN, também com temperaturas baixas (entre 3°C e 4°C) e salinidade entre 34,6 e 35. Essas duas massas d'água fluem em sentido contrário, sendo AIA direcionada para o norte e APAN para o sul (SILVEIRA et al., 2000).

A Bacia de Santos tem sido visada para exploração petrolífera desde o início das pesquisas utilizando refração sísmica na região, em 1960. Em 2016, passou a ser a bacia com a maior área a ser explorada no pré-sal brasileiro, gerando a expectativa de se tornar a maior bacia produtora de hidrocarbonetos do Brasil (SOUZA; SGARBI, 2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas de acordo com o cronograma do Projeto Santos-PETROBRAS “Caracterização química, física, biológica e geológica no sistema pelágico da Bacia de Santos”. Foram realizadas 6 expedições oceanográficas (SANAGU) consecutivas para a coleta de amostras em 29 estações oceanográficas distribuídas em 8 transectos perpendiculares a linha da costa. As amostras da região mesopelágica foram coletadas no talude (profundidade local de 200 m a 1000 m) e área oceânica contígua (profundidade local de 1000 m a 2400 m) entre 03 de agosto e 28 de outubro de 2019, a bordo do navio oceanográfico “Ocean Stalwart”, contratado pela Petrobrás.

Os transectos foram nomeados de sul para norte com as letras entre A e H (Figura 5). As estações foram posicionadas nos transectos aproximadamente a cada 20 milhas náuticas na plataforma continental e a cada 30 milhas náuticas no talude. Foram coletadas 28 amostras a 250 m de profundidade (estações A5-A7, B6-B8, C6-C8, D6-D8, E4-E8, F4-F8, G4-G5, G7, H4-H6) e 20 amostras a 900 m de profundidade

(estações A6, A7, B7, B8, C7, C8, D7, D8, E5-E8, F5, F7, F8, G5-G7, H5-H6) (Figura 5). Todas as suas coordenadas geográficas constam no apêndice A.

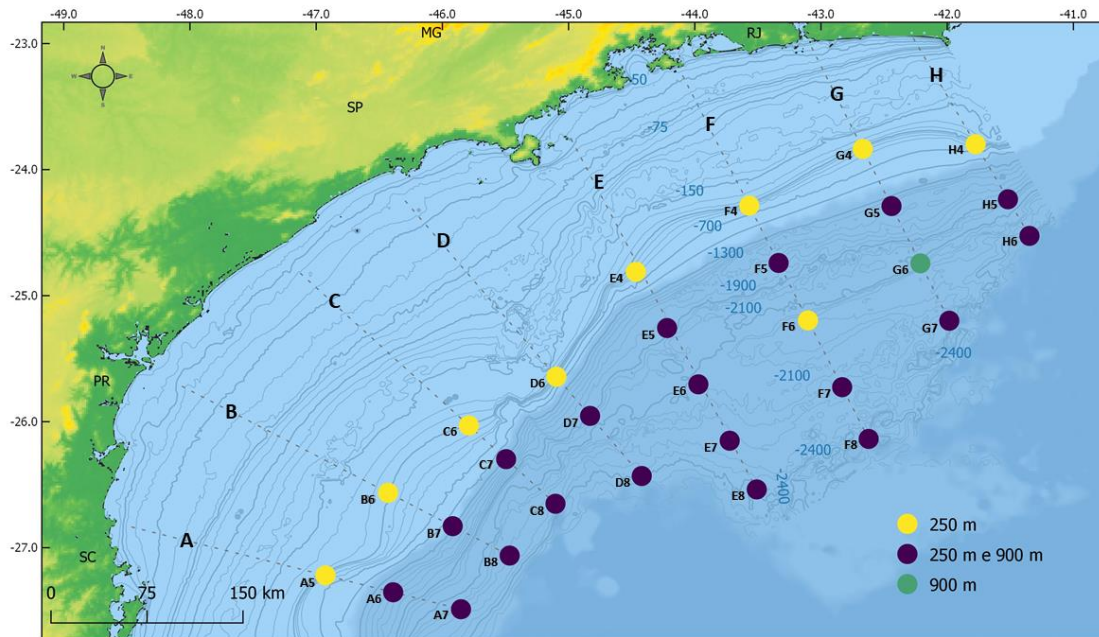


Figura 5. Mapa das estações oceanográficas utilizadas para amostragem da região mesopelágica da Baía de Santos. As cores indicam a(s) profundidade(s) coletadas em cada estação; as letras indicam os transectos. Fonte: Elaborado pelo autor.

As medições de temperatura foram realizadas diretamente pelo CTD (*conductivity, temperature and depth*), enquanto os dados de salinidade e profundidade foram obtidos a partir das medições de condutividade e pressão, respectivamente, também realizadas pelo CTD. Para a análise de oxigênio dissolvido (OD), foram coletados 60 mL de água diretamente de cada garrafa Niskin em frascos DBO de vidro. A amostragem e fixação das amostras foram realizadas utilizando os reagentes da técnica de Winkler e os procedimentos de Grasshoff (2009). A concentração de OD foi determinada a bordo da embarcação com uma bureta digital, logo após a fixação. Foi realizada a medição de pH a partir de alíquotas de 50 mL retiradas das mesmas garrafas Niskin.

Para a determinação das concentrações de nitrato, nitrito e fosfato, um sistema de seringa e um suporte para filtro de 25 mm de diâmetro foram utilizados para a obtenção das amostras diretamente das garrafas Niskin do sistema Roseta-CTD. Foram filtradas alíquotas de 10 mL em triplicata com os filtros Whatman GF/F para cada profundidade amostrada, seguindo a sequência de profundidade da superfície para o

fundo e com troca de filtro entre estações. As alíquotas foram separadas em tubos falcon esterilizados.

A filtração do DNA ambiental da zona mesopelágica foi realizada a bordo, utilizando uma bomba peristáltica de seis canais, sendo cada canal acoplado a uma mangueira exclusiva para cada profundidade, evitando a contaminação das amostras. Foram utilizadas membranas filtrantes estéreis *Sterivex-GP Pressure Filter Unit* (Sigma-Aldrich; Missouri, EUA), com porosidade nominal de 0,22 μm para a retenção do DNA ambiental de cada amostra. Foi adicionado *RNAlater* (Thermo Fisher Scientific Inc.; Massachusetts, EUA) aos filtros contendo o material filtrado. Todo o sistema da bomba peristáltica foi esterilizado com álcool 70% e água miliQ filtrada ao término de cada filtração. Todos os filtros foram armazenados em *ultra-freezer* para serem conservados à -80°C até seu processamento no Laboratório de Ecologia Microbiana (LECOM) da Universidade de São Paulo.

4.1 Extração e Sequenciamento de DNA ambiental mesopelágico da Bacia de Santos

Para a extração de DNA das amostras foi utilizado o kit de extração *DNeasy PowerWater Kit* (QIAGEN®, Hilden, Alemanha) e o protocolo fornecido pelo fabricante. Foi realizada uma adaptação nesse protocolo devido a necessidade da utilização do *RNAlater* para conservação do material: após a centrifugação do material aquoso, o precipitado foi ressuspensão em tampão fornecido pelo próprio kit. Esse tampão foi adicionado ao tubo contendo as *beads* e o filtro, na primeira etapa do protocolo.

A integridade do DNA genômico foi determinada após eletroforese em gel de agarose 0,8% TRIS-EDTA, marcado com *Sybr Green* (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil). A quantificação do DNA foi realizada com o uso do kit Qubit dsDNA HS assay (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil), e o protocolo do fabricante.

Alíquotas de DNA genômico foram enviadas para sequenciamento na empresa NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, São Paulo, Brasil), para o sequenciamento de larga escala do gene 16S RNAr. As regiões V4 e V5 do gene 16S RNAr de Bacteria e Archaea foram amplificadas utilizando os primers 515f/926r (PARADA; NEEDHAM;

FUHRMAN, 2016). O sequenciamento dessas regiões foi realizado na plataforma Illumina *MiSeq*, no modo paired-end 300pb.

Entre as diversas regiões hipervariáveis do 16S RNAr, o sequenciamento da região V4/V5 do gene 16s RNAr tem mostrado melhores resultados quando utilizando o sequenciamento *MiSeq* com sequências pareadas entre 250 pb e 300 pb (JEON et al., 2015). O par de primers 515f/926r engloba as regiões hipervariáveis V4 e V5, e gera um produto com uma extensão apropriada para a obtenção de informações filogenéticas (PARADA; NEEDHAM; FUHRMAN, 2016).

As *reads* obtidas a partir do sequenciamento foram pré-processadas com o software QIIME2 versão 2019.10 (BOLYEN et al., 2019). Após a importação das *reads* para o ambiente do QIIME2, foram removidos os barcodes com o *plugin demux*, e visualizada sua qualidade com o *demux summarize*. Para a trimagem, filtração e agrupamento das *reads* em ASVs (*Amplicon Sequence Variants*) foi utilizado o plugin DADA2 (CALLAHAN et al., 2016) com a mesma versão do QIIME2.

As amostras foram combinadas com a aplicação do *feature-table-merge*, e a partir dessa etapa, foi obtida uma tabela de ASVs com a frequência para cada amostra (*feature-table*). O *feature-table merge-seqs* foi utilizado para a geração das sequências.

A classificação taxonômica foi realizada utilizando um classificador *Naive Bayes* pré-treinado do banco de dados Silva v. 138, atualizado em novembro de 2019 (QUAST et al., 2013), aplicando o *feature-classifier* com o método *classify-sklearn* (BOKULICH et al., 2018).

4.2 Dados ambientais da Bacia de Santos

A análise dos dados ambientais utilizados nesse trabalho foi realizada pelo laboratório LABMAR (Laboratório de Biogeoquímica Marinha), localizado no Instituto Oceanográfico da USP – São Paulo.

As concentrações de OD e de pH foram determinadas a bordo da embarcação. O OD foi analisado com uma bureta digital logo após a fixação e o pH a partir de alíquotas de 50 mL retiradas das mesmas garrafas Niskin, utilizando um pHmetro de bancada calibrado diariamente. As concentrações de nitrato, nitrito e fosfato foram determinadas com o analisador automático AA3-Seal, utilizando o protocolo fornecido

pelo fabricante do equipamento, baseado em métodos colorimétricos (GRASSHOFF, 2009).

De acordo com os padrões de temperatura e salinidade estimados pelo CTD, foi determinada a presença da ACAS entre 100 m e 600 m de profundidade, (salinidade entre 35 e 36 e temperatura entre 10°C e 18°C). Logo abaixo, detectou-se a AIA, com temperaturas entre 5°C e 6°C e salinidade em entre 34 e 35.

4.3 Diversidade microbiana e influência dos fatores ambientais na Bacia de Santos

O pacote *Phyloseq* (MCMURDIE; HOLMES, 2013) do software *Bioconductor* (versão 3.16) foi utilizado com a linguagem de programação R para os cálculos das métricas de diversidade alfa e beta. A normalização das amostras pelo esforço amostral foi realizada através da curva de rarefação. Três amostras foram excluídas nessa etapa, sendo todas equalizadas a 15098 sequências por amostra e totalizando 679410 sequências. As amostras retiradas foram todas da profundidade de 250 m, coletadas nas estações A6, F5 e D7.

A riqueza das amostras foi estimada por Chao1, e a equitatividade da diversidade alfa foi explorada utilizando o índice de Shannon-Wiener. Ambos foram visualizados por gráfico tipo *boxplot* utilizando o pacote *ggplot2* (WICKHAM, 2009), e baseando-se nas abundâncias absolutas de ASVs. Para ambas as análises estatísticas, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, que avalia a normalidade da distribuição da amostra. A fim de determinar se a diferença estatística dos índices tanto entre as estações como entre transectos foi significativa, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis (KIM et al., 2017).

A diversidade beta foi visualizada via nMDS, utilizando a ordenação pela distância de Bray-Curtis (PALIY; SHANKAR, 2016), através do pacote *Phyloseq* (versão 3.6.3) (WHITTAKER, 1972). A análise da influência dos fatores ambientais na estrutura da comunidade foi realizada de forma indireta, ajustando os vetores das variáveis ambientais aos eixos do nMDS também usando a distância Bray-Curtis. Para isso, foi utilizada a função “*envfit*” do pacote *Vegan*. As variáveis que mostraram valores de correlação com os eixos não significativas ($p \geq 0.05$) a partir da PERMANOVA foram excluídas (OKSANEN et al., 2020).

4.4 Composição taxonômica da comunidade microbiana mesopelágica da Bacia de Santos

A composição da comunidade foi visualizada através de gráficos de barra a utilizando o pacote *Phyloseq* (versão 3.6.3) para determinar a abundância relativa das ordens predominantes (>1%). Para o eixo X, foram utilizadas as estações de coleta. Para essa etapa, foram utilizados dados não rarefeitos, portanto foram consideradas as amostras de 250 m das estações A6, F5 e D7 removidas anteriormente.

4.5 Importância ecológica da comunidade presente na zona mesopelágica

A predição do potencial metabólico dos grupos identificados foi obtida pelo banco de dados FAPROTAX, seguindo o protocolo dos desenvolvedores (LOUCA; PARFREY; DOEBELI, 2016). Através da extrapolação das funções de procariotos cultivados, esse banco de dados prevê a função para os procariotos identificados nível de gênero ou espécie. Foi utilizado um script em *Phyton* para a conversão da tabela de ASVs em uma tabela de funções metabólicas baseadas nas anotações funcionais do banco de dados FAPROTAX.

4.6 Distribuição da comunidade por profundidade

Foi realizada a comparação entre as duas profundidades coletadas na zona mesopelágica (250 m e 900 m). Para essa análise, foram utilizadas apenas as

estações que contam com amostras de ambas as profundidades a serem comparadas na mesma estação, totalizando 38 amostras coletadas em 19 estações (Figura 6).

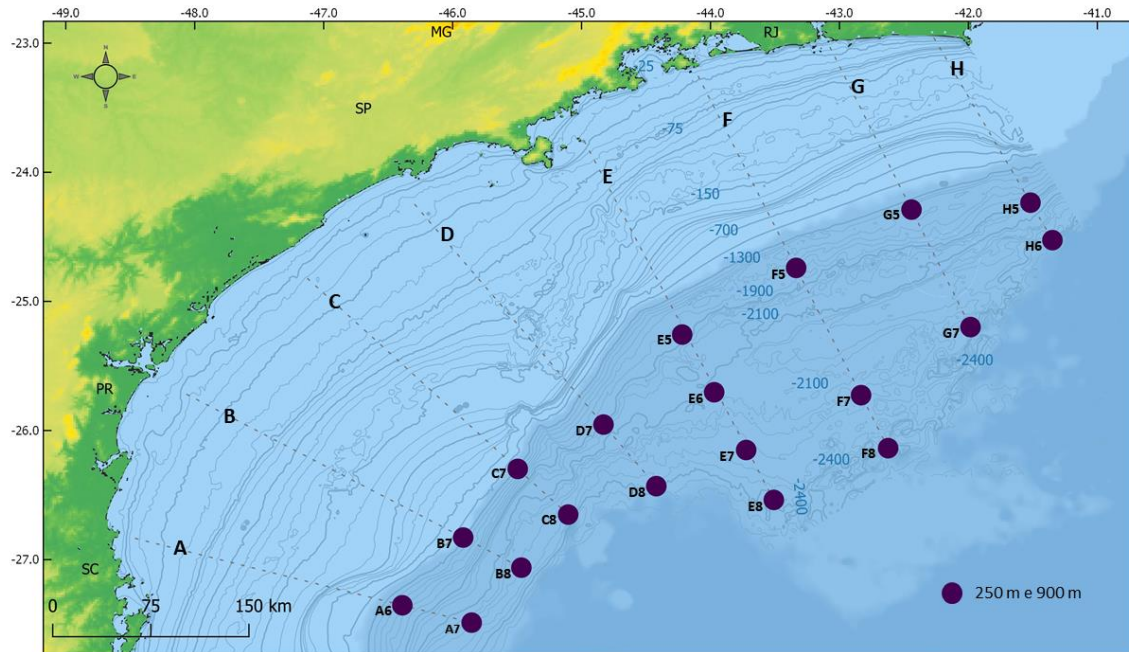


Figura 6. Mapa das estações oceanográficas na região mesopelágica da Baía de Santos com as amostras utilizadas para comparação entre profundidades. Amostras de ambas as profundidades das estações marcadas em azul foram utilizadas nessa análise. Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram utilizados os mesmos métodos da seção anterior, com a particularidade de serem aplicados individualmente para cada profundidade. Na etapa de rarefação dos dados, foram excluídas as mesmas amostras da análise anterior, em conjunto com suas correspondentes nas profundidades de 900 m, ou seja, as estações A6, F5 e D7 foram removidas por completo dessa análise.

Além disso, foi construído um diagrama de Venn para a visualização dos números de ASVs compartilhados e não compartilhados entre as profundidades, utilizando o pacote *Phyloseq* (versão 3.6.3). Para avaliar a sua significância estatística, foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Com o objetivo de caracterizar as diferentes comunidades encontradas em cada profundidade, foi realizada a análise de abundância diferencial entre as amostras de 250 m e 900 m. Essa análise foi realizada a nível de ASVs, sendo essas agrupadas por famílias. Foram utilizados os pacotes *Phyloseq* (versão 3.6.3) e *DESeq2* (versão

1.37.0) do software *Bioconductor* (versão 3.16), com um limite de significância estatística de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Qualidade do sequenciamento do gene 16s RNAr

Após o sequenciamento, foram geradas 3.522.986 sequências distribuídas entre as 48 amostras utilizadas nesse trabalho, sendo 73.395 sequências em média por amostra. Após os procedimentos de filtração por qualidade, *denoise* e retirada das quimeras, a média final de sequências por amostra foi 47.569, conservando cerca de 65% do input inicial. O número de sequências inicial e final de cada amostra pode ser visualizado na tabela 1.

Tabela 1. Especificação por amostra do número sequências antes e após o tratamento de qualidade. A primeira coluna mostra o número original de sequências gerado pelo sequenciamento do gene RNAr 16S. A segunda e terceira colunas mostram o número e porcentagem de sequências conservados após os tratamentos de qualidade, respectivamente.

Identificação	Número de sequências inicial	Número de sequências final	Porcentagem conservada
SANAGU5_F4_250M	68573	44811	65%
SANAGU6_G7_250M	41604	24561	59%
SANAGU2_B8_900M	73086	44754	61%
SANAGU6_H5_900M	62239	42235	68%
SANAGU2_B7_250M	55646	36080	65%
SANAGU4_E7_250M	63627	43440	68%
SANAGU4_E7_900M	89826	58783	65%
SANAGU3_C8_900M	65055	41043	63%
SANAGU3_C8_250M	31558	18476	59%
SANAGU6_H5_250M	60876	37686	62%
SANAGU5_F5_900M	62362	43494	70%
SANAGU1_A7_250M	70345	44487	63%
SANAGU2_B7_900M	60431	42310	70%
SANAGU5_F7_250M	45790	28386	62%
SANAGU3_C6_250M	55348	32822	59%
SANAGU1_A7_900M	54629	39248	72%
SANAGU6_G4_250M	31634	22060	70%
SANAGU4_D6_250M	74288	48466	65%
SANAGU6_H4_250M	69280	50044	72%
SANAGU6_F8_900M	67799	43722	64%
SANAGU6_H6_250M	74329	48301	65%
SANAGU4_E8_900M	53246	36928	69%
SANAGU6_F8_250M	62768	38932	62%
SANAGU4_E6_250M	53505	35409	66%

SANAGU6_G6_900M	25374	15187	60%
SANAGU4_D8_900M	32813	25660	78%
SANAGU4_E6_900M	61631	43099	70%
SANAGU4_E5_250M	71242	45985	65%
SANAGU1_A5_250M	63029	38811	62%
SANAGU4_D7_900M	61701	41126	67%
SANAGU6_G7_900M	57779	40003	69%
SANAGU6_H6_900M	80680	53630	66%
SANAGU2_B6_250M	61820	46914	76%
SANAGU4_E5_900M	100055	69547	70%
SANAGU3_C7_900M	121301	73350	60%
SANAGU4_E8_250M	95561	57208	60%
SANAGU1_A6_250M	15738	10724	68%
SANAGU3_C7_250M	217757	121666	56%
SANAGU5_F7_900M	214787	133191	62%
SANAGU5_F5_250M	16812	7718	46%
SANAGU4_D8_250M	179673	105987	59%
SANAGU4_E4_250M	131922	91772	70%
SANAGU5_F6_250M	92775	60727	65%
SANAGU6_G5_900M	97895	66050	67%
SANAGU2_B8_250M	144247	93292	65%
SANAGU1_A6_900M	43349	30672	71%
SANAGU4_D7_250M	12699	7437	59%
SANAGU6_G5_250M	48284	33982	70%
Média por amostra	72849.33333	47087.83333	65%
Total	3496768	2260216	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise da classificação taxonômica das amostras mostrou que das 9002 ASVs obtidas a partir do agrupamento das sequencias, 3663 tiveram a resolução da identificação a nível de espécie, representando cerca de 41% do total de ASVs. A porcentagem de identificação em outros níveis taxonômicos consta na tabela 2.

Tabela 2. Número de ASVs por resolução máxima de classificação obtida. Especificação do número e porcentagem de ASVs atribuídas aos diferentes níveis taxonômicos de acordo com a resolução máxima obtida. O número total de ASVs obtidas foi 9002.

Nível de resolução da identificação	Número de ASVs identificadas	Porcentagem de ASVs identificadas
Domínio	9002	100%
Filo	8778	97%
Classe	8671	96%

Ordem	8434	94%
Família	8087	90%
Gênero	7733	86%
Espécie	3663	41%

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Dados ambientais da Bacia de Santos

Para a análise da variação dos fatores físicos e químicos entre as massas d'água foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, que mostrou que nenhuma das variáveis está distribuída de acordo com o padrão de normalidade estatística ($p < 0.05$). O teste de Mann-Whitney demonstrou que a diferença do valor da mediana das variáveis é significativamente maior ($p < 0.05$) para temperatura ($p = 1.2 \cdot 10^{-13}$) e salinidade ($p = 1.3 \cdot 10^{-13}$) em 250 m, e que a densidade ($p = 1.3 \cdot 10^{-10}$), o oxigênio dissolvido ($p = 1.5 \cdot 10^{-4}$), o fosfato ($p = 2.5 \cdot 10^{-7}$) e o nitrato ($p = 1.1 \cdot 10^{-10}$), ao contrário, têm maiores valores em 900 m (Figura 7).

Com exceção do nitrito ($p = 0.1$), todos os parâmetros testados mostraram diferenças significativas entre suas medianas, sendo densidade, salinidade e temperatura característicos das diferentes massas d'água, e reafirmando a presença das diferentes massas d'água encontradas nas diferentes profundidades.

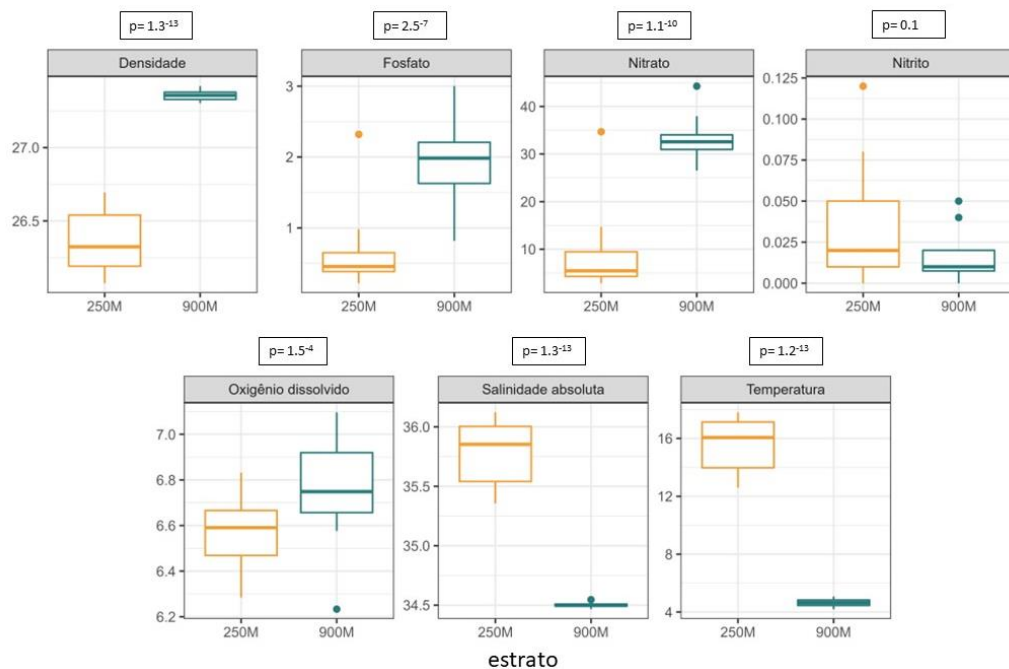


Figura 7. Valores de mediana dos parâmetros físicos e químicos por profundidade. As cores representam as diferentes profundidades (estratos); amarelo: 250 M, azul: 900 M. Valores de p foram obtidos pelo teste de significância estatística de Mann-Whitney. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Diversidade microbiana e influência dos fatores ambientais na Bacia de Santos

Utilizando o índice de Chao1 foi estimada a riqueza de espécies agrupando as amostras por estação e por transecto. O teste de Shapiro-Wilk mostrou que a distribuição não segue o padrão de normalidade estatística ($p = 0.001$). O teste de Kruskal-Wallis demonstrou que a diferença do valor da mediana da riqueza de espécies tanto entre estações ($p = 0.347$) como entre transectos ($p = 0.410$) não foram significativas (Figura 8).

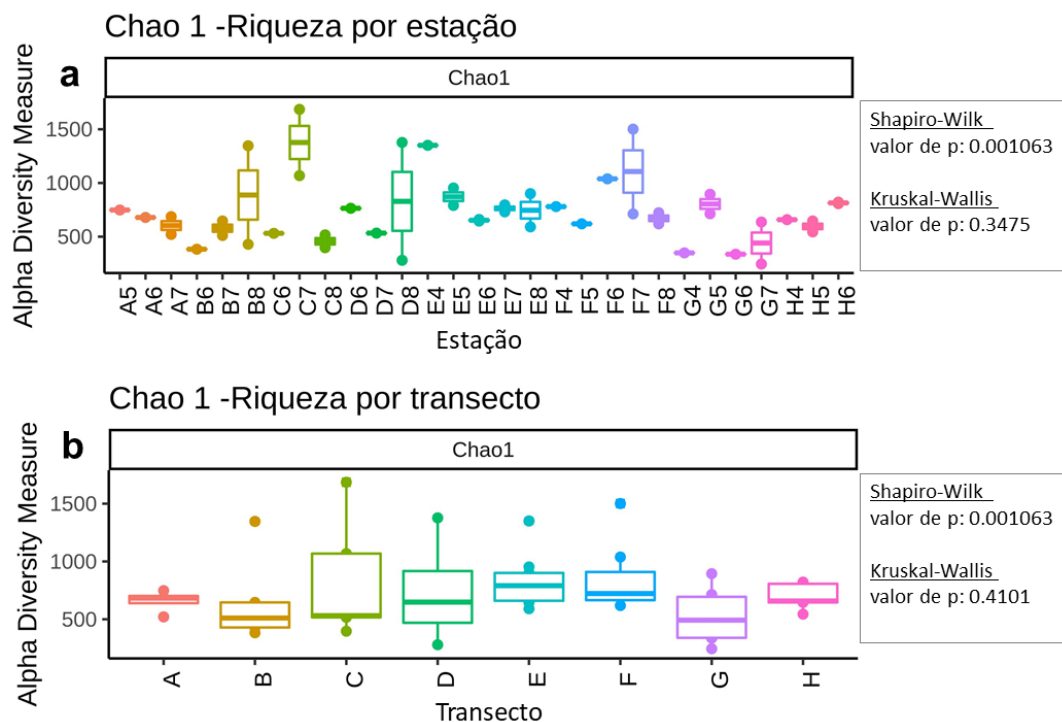


Figura 8. Valores de mediana de Chao1 por Estação (a) e por Transecto (b). As cores representam as estações na figura a e os transectos na figura b. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os mesmos testes estatísticos foram realizados para a avaliação das diferenças observadas na equitatividade da diversidade alfa das espécies pelo Índice de Shannon-Wiener. Da mesma forma, esses testes demonstraram que não há

diferenças estatisticamente significativas na diversidade tanto entre estações ($p = 0.249$) como entre transectos ($p = 0.691$) (Figura 9).

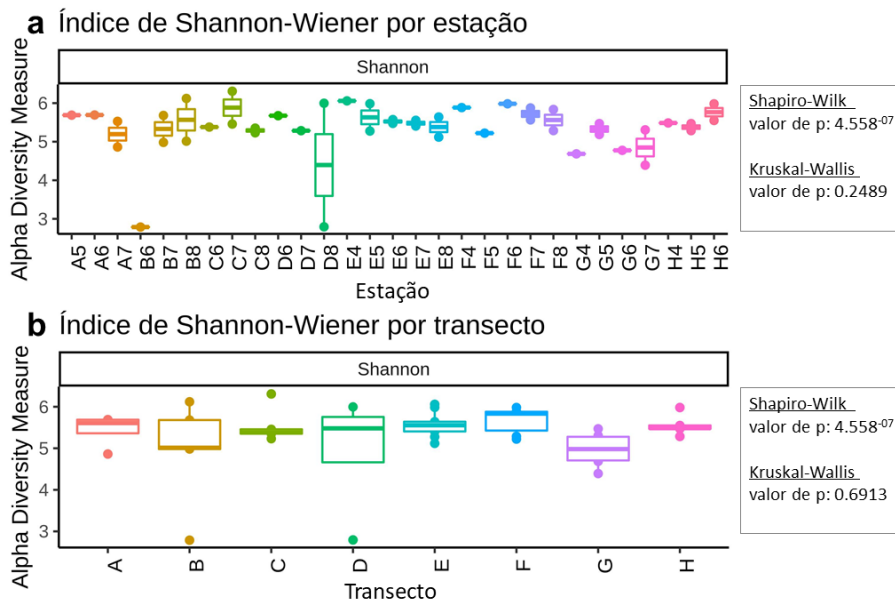


Figura 9. Índice de Shannon-Wiener por estação (a) e por transecto (b). As cores representam as estações na figura a e os transectos na figura b. Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a análise da diversidade beta, foi utilizada a métrica de Bray-Curtis, com *stress* de 0.09. Foi realizada a verificação da qualidade do *stress* da análise através de um diagrama de Shepard (LEEuw; MAIR, 2015), que mostrou que as dissimilaridades originais foram preservadas no número reduzido de dimensões (Figura 10). O resultado da diversidade beta foi plotado em escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) para visualização gráfica do agrupamento de amostras (Figura 11).

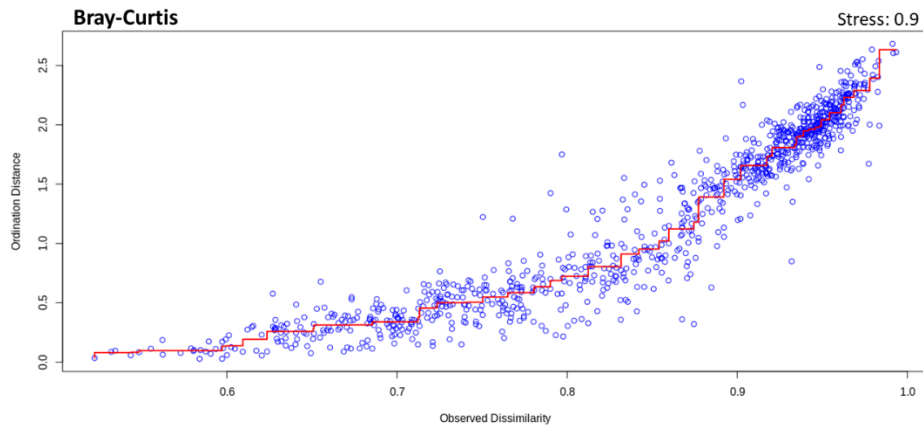


Figura 10. Diagrama de Shepard para o escalonamento multidimensional não-métrico. Relação entre a dissimilaridade real entre as amostras e a distância da ordenação do plot final. A linha tracejada em vermelho representa a dissimilaridade do dado original. A proximidade dos círculos azuis indica que as dissimilaridades foram preservadas após a transformação dos dados, mostrando ser um resultado confiável. Fonte: Elaborado pelo autor.

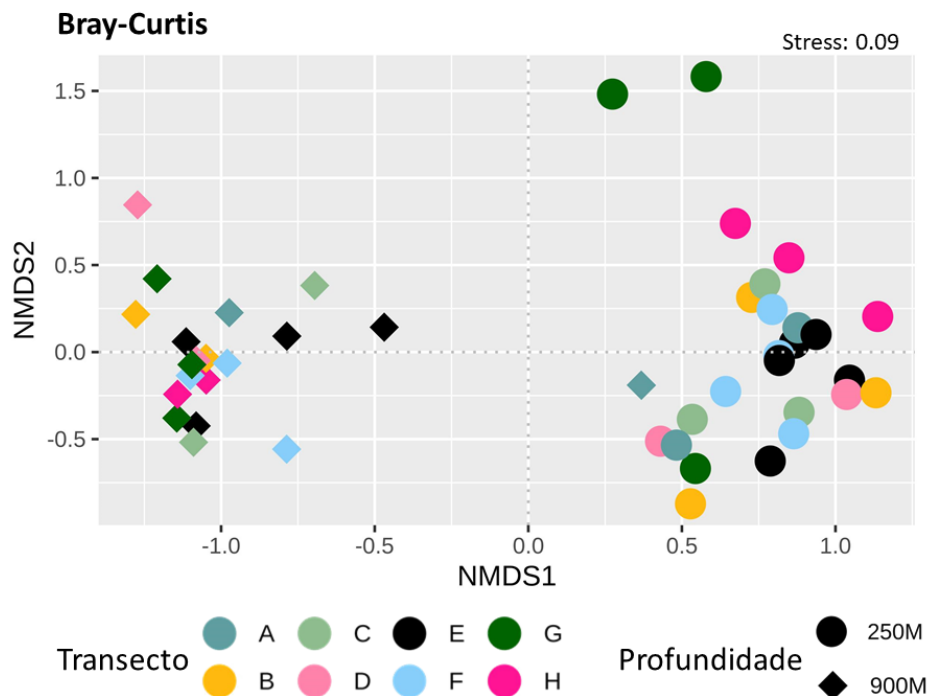


Figura 11. Escalonamento multidimensional não-métrico utilizando a métrica de Bray-Curtis. Os losangos representam as amostras de 900 m. Os círculos representam as amostras de 250 m. As cores diferenciam os transectos ao longo da costa. Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi possível identificar a agrupamento das amostras de 250 m e das amostras de 900 m de profundidade, indicando dissimilaridade entre esses grupos. (Figura 11). A significância dessa dissimilaridade foi testada através de uma PERMANOVA que teve o valor de $p = 0.001$. Os outros parâmetros ambientais foram testados quanto à sua influência na estrutura da comunidade, sendo estatisticamente significativos: temperatura ($r^2 = 34\%$, $p = 0.001$), salinidade ($r^2 = 34\%$, $p = 0.001$), densidade ($r^2 = 33\%$, $p = 0.001$), oxigênio dissolvido ($r^2 = 34\%$, $p = 0.001$), nitrato ($r^2 = 25\%$, $p = 0.001$) e fosfato ($r^2 = 18\%$, $p = 0.001$).

Os valores registrados de densidade, salinidade e temperatura diferem entre as profundidades avaliadas, que correspondem às duas diferentes massas d'água (250 m: ACAS e 900 m: AIA), esse resultado está em conformidade com o esperado. Os níveis de oxigênio dissolvido, nitrato e fosfato também foram significativamente diferentes entre as profundidades.

Utilizando o resultado do nMDS realizado com a métrica de Bray-Curtis foram adicionadas as variáveis ambientais influentes utilizando a função *envfit*. O resultado corroborou com a análise prévia da ordenação (Figura 11), sendo responsáveis pelo agrupamento das amostras as seguintes variáveis ambientais: temperatura, salinidade, densidade, oxigênio dissolvido, nitrato e fosfato (Figura 12).

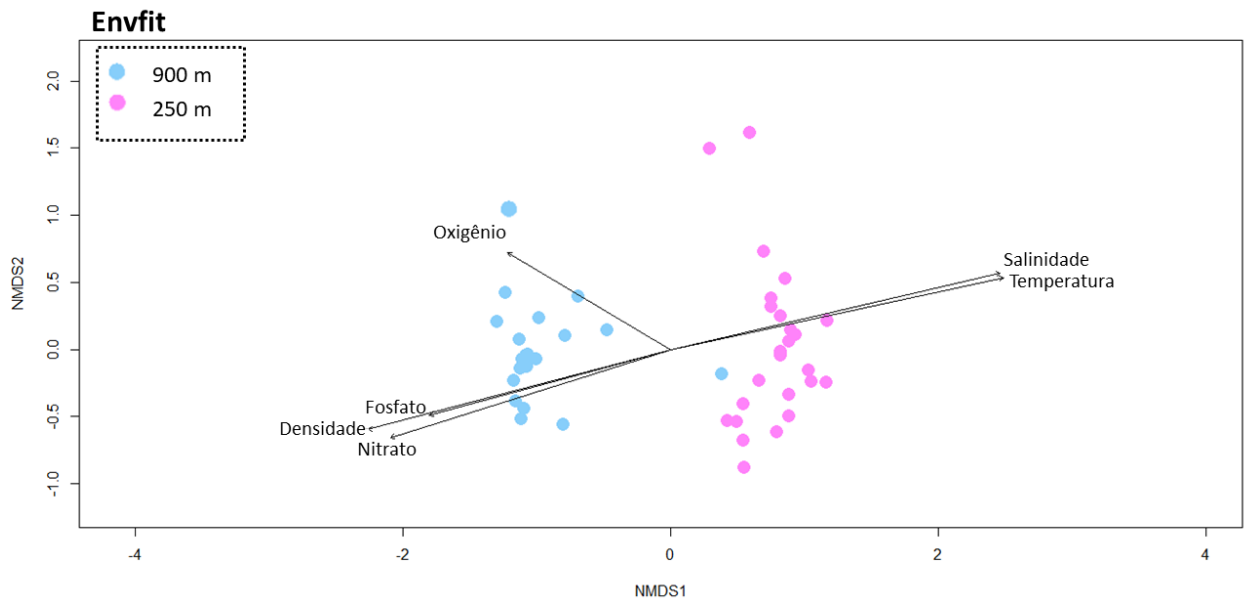


Figura 12. Escalonamento multidimensional não-métrico com fatores ambientais. O comprimento das setas representa a intensidade da influência de cada fator nas comunidades correspondentes. As diferentes cores representam as diferentes profundidades. Azul: 900 m. Rosa: 250 m. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Composição taxonômica da comunidade microbiana mesopelágica da Baía de Santos

A análise das sequências do gene 16s RNAr das amostras da zona mesopelágica da Baía de Santos mostrou que 59% de suas comunidades são representadas pelo domínio Bacteria e 41% pelo domínio Archaea.

O filo dominante de Archaea foi Crenarchaeota (38%), seguido de Thermoplasmatota (4%). As bactérias foram principalmente assinadas ao filo Proteobacteria (36%), Planctomycetota (8%), Bacteroidota (3%), Verrucomicrobiota (2%) e Chloroflexi (1%). A nível de Classe, Nitrososphaeria representou 37% do total de ASVs, seguida por Alphaproteobacteria com 20%, Gammaproteobacteria com 15%, Planctomycetes com 5%, Bacteroidia com 5%, Thermoplasmata com 4% e Verrucomicrobiae com 2%.

Para a análise a nível de ordem, foram filtradas as 20 ordens mais abundantes. Entre todas as amostras, a mais encontrada foi Nitrosopumilales (41%), seguida de Pelagibacterales, representada como SAR11 (18%), Alteromonadales (7%),

Pirellulales (4%), Flavobacteriales (3%), Planctomycetales (2%) e Thiomicrospirales (1%) (Figura 13).

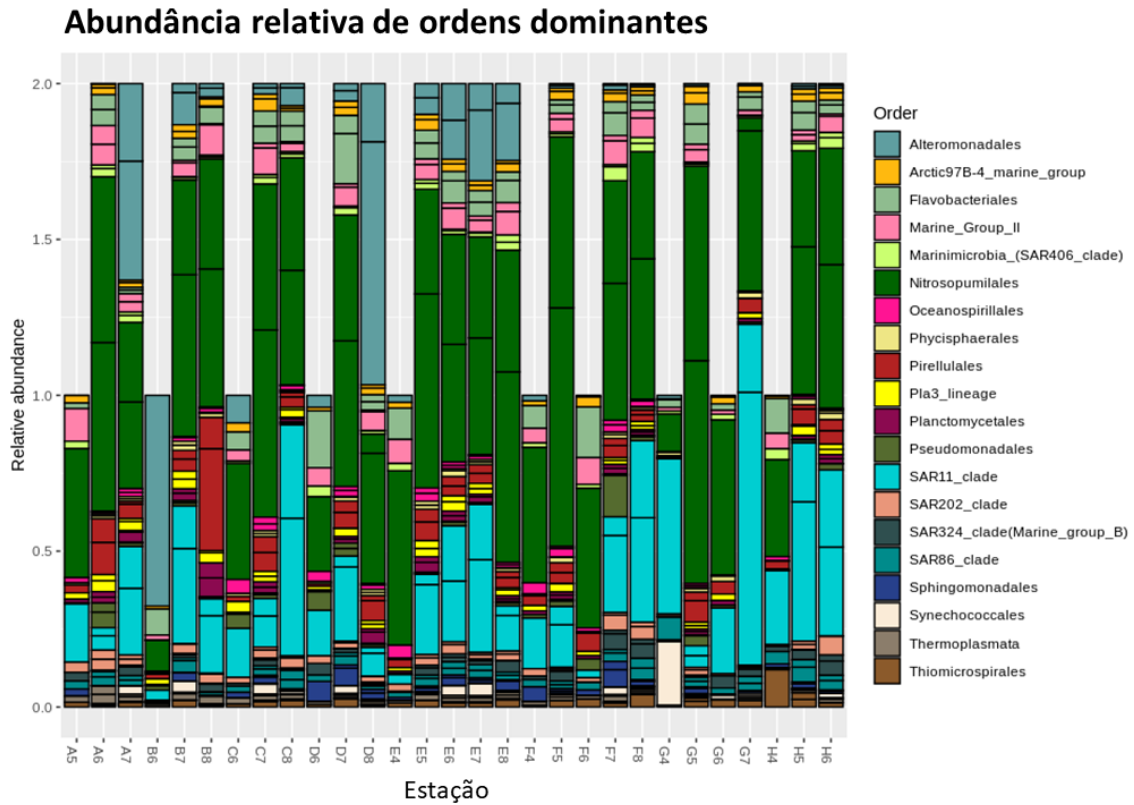


Figura 13. Abundância relativa de Ordens dominantes (>1%) por estação. As cores representam as ordens. Fonte: Elaborado pelo autor.

A ordem Nitrosopumilales representou 38% da abundância em 250 m e 43% em 900 m, sendo o grupo mais abundante em ambas as profundidades. Pelagibacteriales (SAR11) foi a segunda mais abundante, com 24% em 250 m e 16% em 900 m. Alteromonadales foi a terceira ordem mais encontrada em 250 m (7%), e 900 m (11%) (Figura 14).

A quarta ordem mais abundante na profundidade de 250 m foi Flavobacteriales (4%) seguido de Pirellulales (3%) e Planctomycetales (2%). Já em 900 m, a ordem Pirellulales é a quarta mais abundante (6%) seguida de Flavobacteriales (3%) e Thiomicrospirales (2%) (Figura 14).

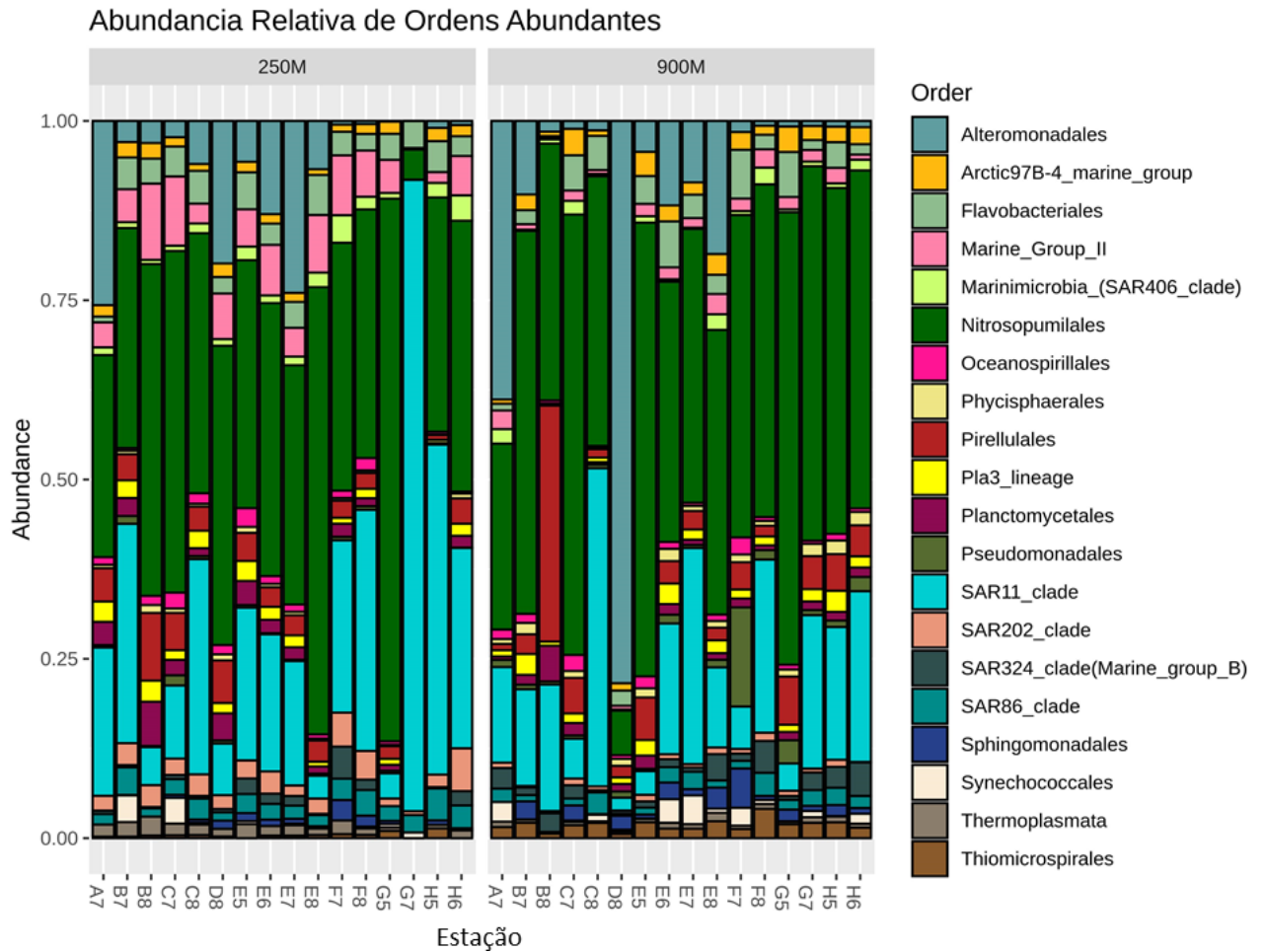


Figura 14. Abundância relativa de Ordens dominantes (>1%) por estação nos estratos de 250 m e 900 m, separadamente. As cores representam as ordens. Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise a nível de família também foi realizada com as 20 famílias mais abundantes, mostrando a dominância de Nitrosopumilales com 40% em 250 m e 46% em 900 m. O Clado I de Pelagibacterales representou 17% em 250 m e 10% em 900

m. Em seguida, Alteromonadaceae é a mais abundante em 250 m com 6%, enquanto Pseudoalteromonadaceae é mais abundante em 900 m, com 8% do total (Figura 15).

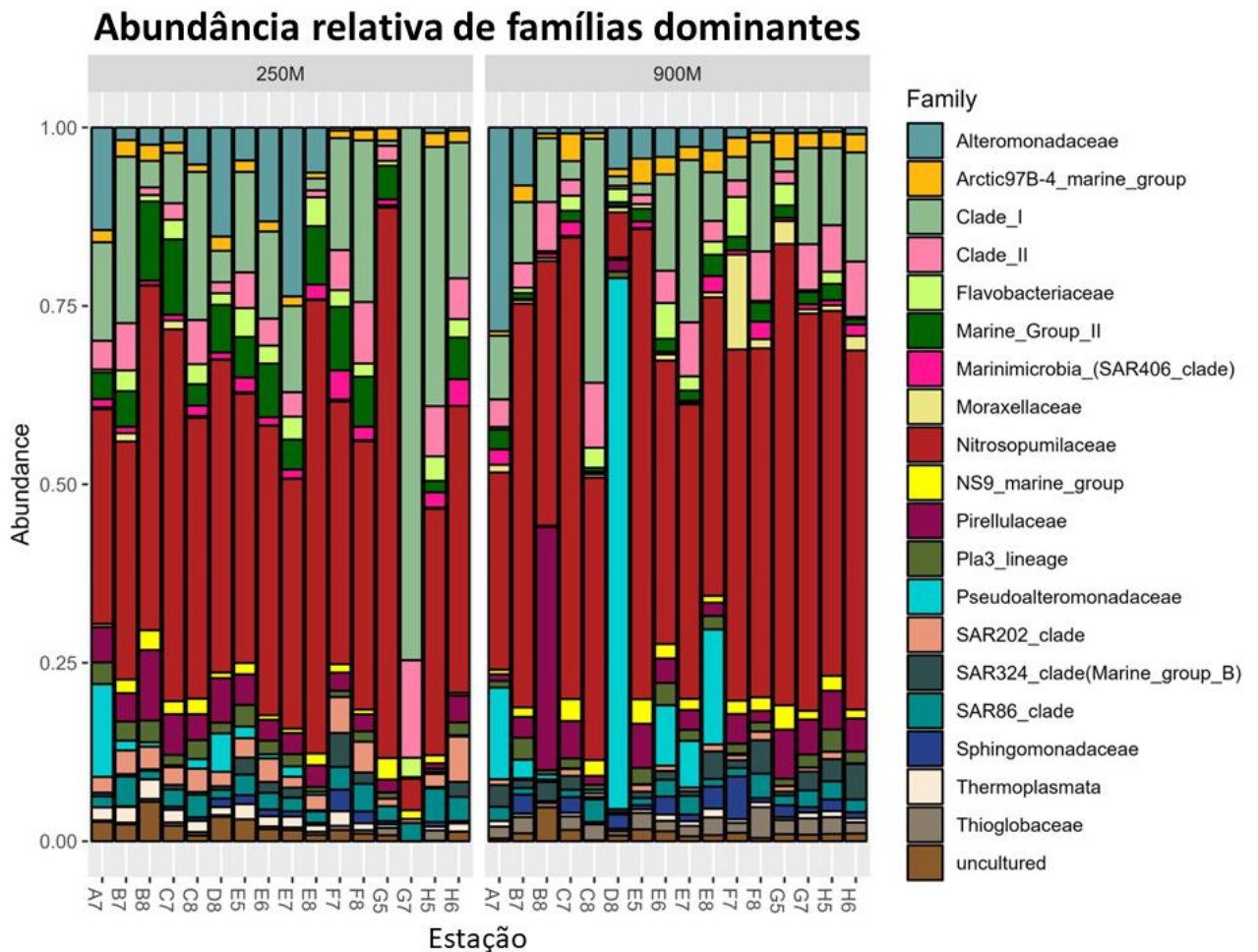


Figura 15. Abundância relativa de Famílias dominantes (>1%) por estação nos estratos de 250 m e 900 m, separadamente. As cores representam as famílias. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Importância ecológica da comunidade presente na zona mesopelágica

A predição funcional de ASVs agrupadas tanto por profundidade como por estação mostrou que das 9002 ASVs analisadas a partir do banco de dados FAPROTAX, 8354 foram atribuídas a pelo menos uma função, representando 92% do total. Foram selecionadas as 9 funções relacionadas a fatores ambientais mais encontradas e relevantes para a análise de predição (Tabela 3).

Tabela 3. Número de ASVs para cada grupo funcional a partir da predição funcional baseada no banco de dados curado do FAPROTAX.

Predição Funcional	Número de ASVs
Quimioheterotrofia	1835
Quimioheterotrofia aeróbica	1707
Nitrificação	228
Redução de nitrato	141
Oxidação de amônia	88
Oxidação de componentes de enxofre	84
Fixação de nitrogênio	81
Respiração de nitrato	60
Respiração de nitrogênio	60

Fonte: Elaborado pelo autor.

Todas as funções apresentadas na tabela 3 foram preditas para todas as estações, em diferentes abundâncias. A estação A5 tem as porcentagens mais baixas para todas as funções, embora todas estejam presentes. A estação G6 tem maior presença das funções respiração de nitrogênio, redução de nitrato, respiração de nitrato, nitrificação e oxidação de amônia. A estação H6 teve alta prevalência de oxidação aeróbica de nitrito, fixação de nitrogênio, quimioheterotrofia aeróbica e quimioheterotrofia. Na estação G4 prevaleceram as funções de nitrificação e oxidação aeróbica de amônia e na estação F8 a oxidação aeróbica de nitrito. A redução e a respiração de nitrato são funções relacionadas e tiveram o mesmo padrão de abundância entre todas as estações (Figura 16).

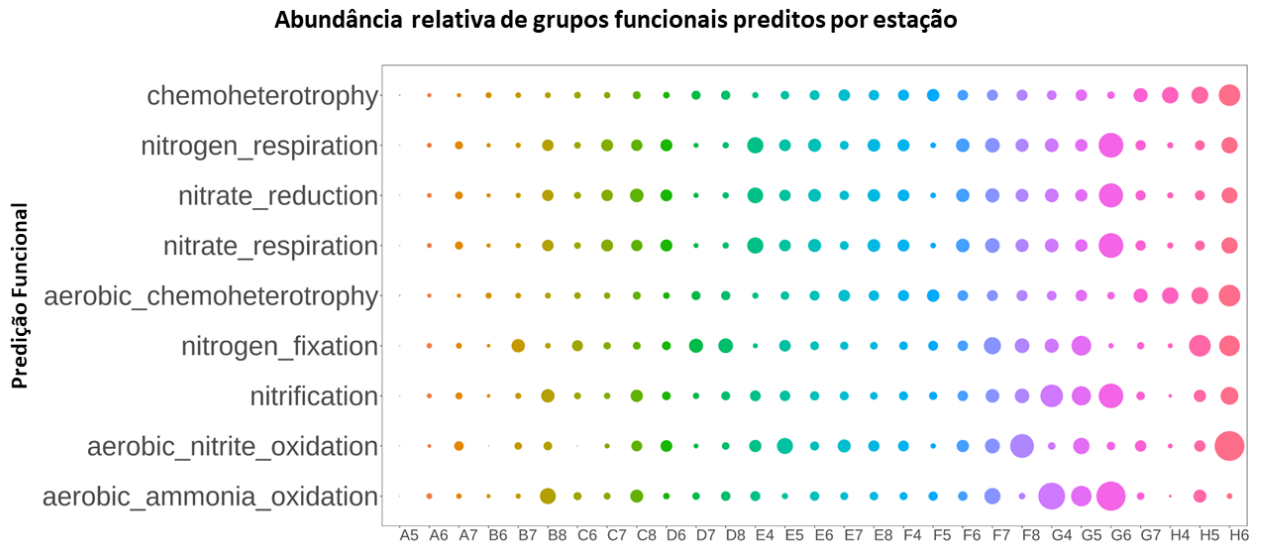


Figura 16. Abundância relativa dos grupos funcionais preditos para as comunidades de presentes em cada estação. O tamanho dos círculos representa a porcentagem da abundância relativa, de 1% até 100%. Fonte: Elaborado pelo autor.

As funções analisadas também foram detectadas em diferentes abundâncias em ambas as profundidades coletadas. A predição de quimioheterotrofia, quimioheterotrofia aeróbica, nitrificação e oxidação aeróbia de amônia foi similar entre as profundidades, enquanto a respiração de nitrogênio, respiração de nitrato, redução de nitrato, fixação de nitrogênio e oxidação aeróbica de nitrito foram mais encontradas nas comunidades presentes em 900 m de profundidade (Figura 17).

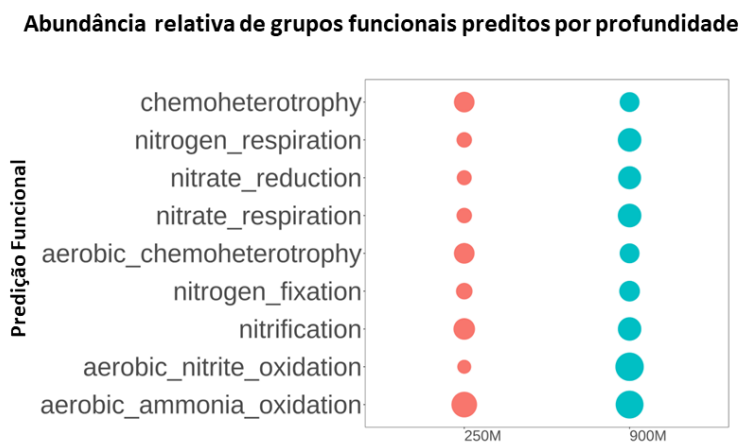


Figura 17. Abundância relativa dos grupos funcionais preditos para as comunidades de presentes em cada profundidade. O tamanho dos círculos representa a porcentagem da abundância relativa, podendo ir de 1% até 100%. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 Distribuição da comunidade por profundidade

Utilizando o índice de Chao1, foram observadas as variações na riqueza de espécies por profundidade nas diferentes estações amostradas (Figura 18). As estações A7, B7, B8, C7, D8, E8, F8 e H6 mostraram maior índice de riqueza na profundidade de 250 m, enquanto as estações C8, E5, E6, E7, F7, G5, G7 e H5 mostraram maior riqueza de espécies na profundidade de 900 m (Figura 18a). No geral, a mediana foi maior na profundidade de 250 m, comparado com as amostras de 900 m (Figura 18b). Porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa a partir do teste de Mann-Whitney ($p = 0.445$) (Figura 18).

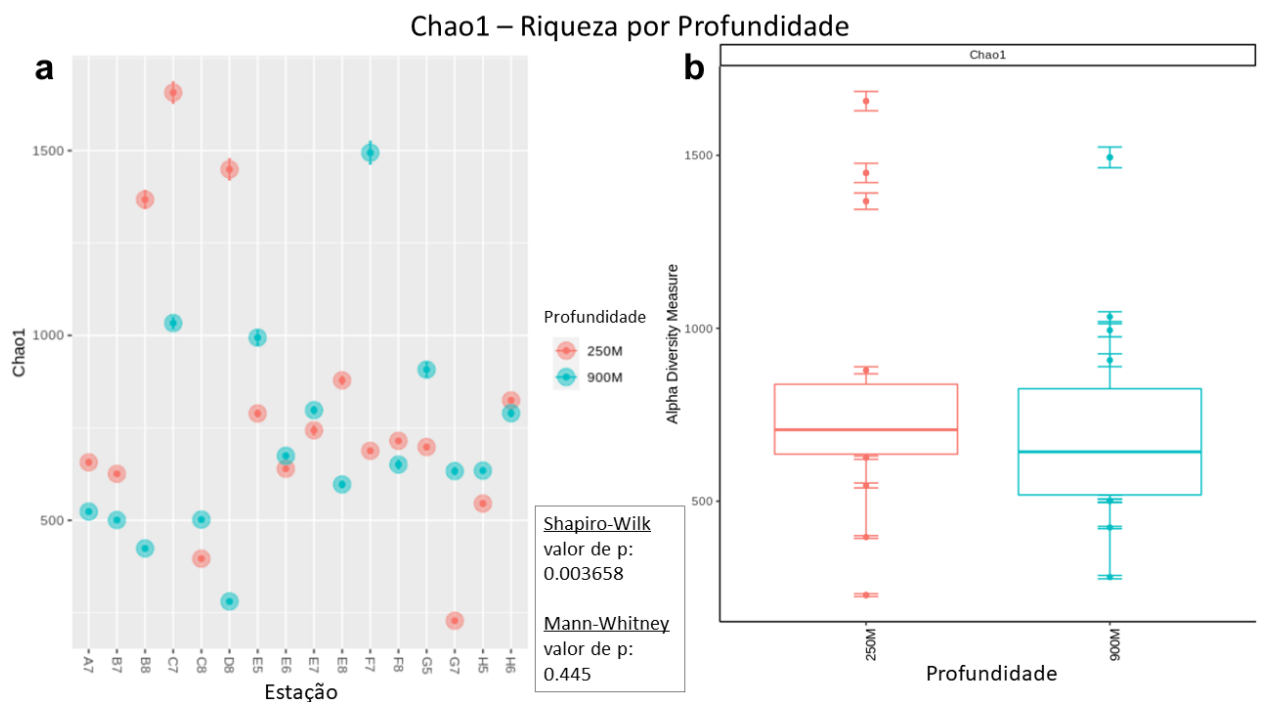


Figura 18. Índice de Chao1 por profundidade. a) Valores Chao1 em ambas as profundidades de cada estação. b) Comparação da mediana dos valores de Chao1 de todas as estações por profundidade. O teste de Shapiro-Wilk mostra que os valores seguem uma distribuição não-normal e o teste de Mann-Whitney indica que a diferença entre profundidades é estatisticamente significativa. Fonte: Elaborado pelo autor.

A alfa diversidade representada pelo índice de Shannon, por sua vez, mostrou valores mais altos na profundidade de 250 m, sendo a diversidade maior na profundidade de 900 m apenas nas estações E7 e G7 (Figura 19a). Essa diferença foi

estatisticamente significativa de acordo com o teste de Mann-Whitney ($p = 0.003$) (Figura 19b).

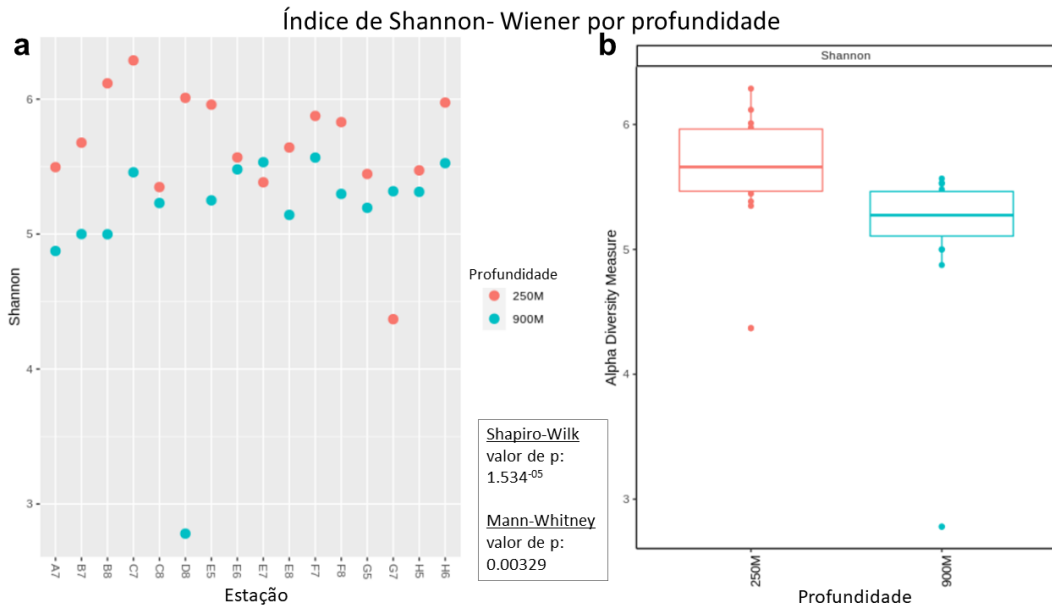


Figura 19. Índice de Shannon-Wiener por profundidade. a) Valores do índice de Shannon-Wiener em ambas as profundidades de cada estação. b) Comparação da mediana dos valores de Shannon-Wiener de todas as estações por profundidade. O teste de Shapiro-Wilk mostra que os valores seguem uma distribuição não-normal e o teste de Mann-Whitney indica que a diferença entre profundidades é estatisticamente significativa. Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi analisado um total de 7464 diferentes ASVs de bactéria e arqueia pertencentes a 56 filós, 469 famílias e 809 gêneros. Dessas, 1019 (~14%) são compartilhadas entre as duas profundidades analisadas, enquanto 3261 (~43%) foram encontradas apenas na profundidade de 250m e 3184 (~43%) apenas a 900m de profundidade (Figura 20).

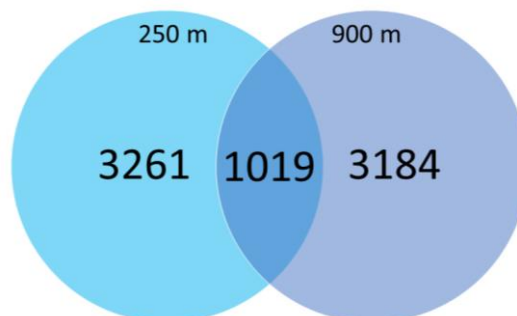


Figura 20. Diagrama de Venn por profundidade. Representação dos números de ASVs encontrados exclusivamente em cada estrato e de ASVs que ambos os estratos compartilham. Fonte: Elaborado pelo autor.

A diferença entre as ASVs únicas e compartilhadas foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$), indicando que a maioria das ASVs encontradas na zona mesopelágica está presente exclusivamente em uma das profundidades analisadas.

A análise de abundância diferencial identificou 40 famílias dos filos Proteobacteria, Nitrospinota, Crenarchaeota, Verrucomicrobiota, Planctomycetota, Bacteroidota, Actinobacteriota, Acidobacteriota, Halobacterota, Bdellovibrionata, Myxococcota e Nitrospirota que foram significativamente ($p < 0.05$) mais abundantes em pelo menos uma das duas profundidades analisadas.

As famílias Vibrionaceae, Nitrospiraceae, Nannocystaceae, Lentimicrobiaceae, Kiloniellaceae, Ectothiorhodospiraceae, Crocinitomicaceae, Alcanivoraceae e Actinomarinnaceae foram significativamente mais abundantes na profundidade de 250 m. Em 900 m, foram significativamente mais abundantes as famílias Rhodobacteraceae, Pseudomonadaceae, Pseudoalteromonadaceae, Moritellaceae, Methylophilaceae, Comamonadaceae e Beijerinckiaceae (Figura 21).

Diferentes ASVs representadas pelas famílias Vicinamibacteraceae, Thioglobaceae, Saprospiraceae, Rubritalaceae, Rubinisphaeraceae, Puniceococcaceae, Pseudohongiellaceae, Pirellulaceae, Phycisphaeraceae, Nitrospinaceae, Nitrosopumilaceae, Myxococcaceae, Microtrichaceae, Magnetospiraceae, Halomicrobiaceae, Gimesiaceae, Flavobacteriaceae, Cyclobacteriaceae, Bdellovibrionaceae, Alteromonadaceae e os clados I e II do grupo SAR 11 (ordem Pelagibacterales) tiveram abundância diferencial significativa para as duas profundidades analisadas (Figura 21).

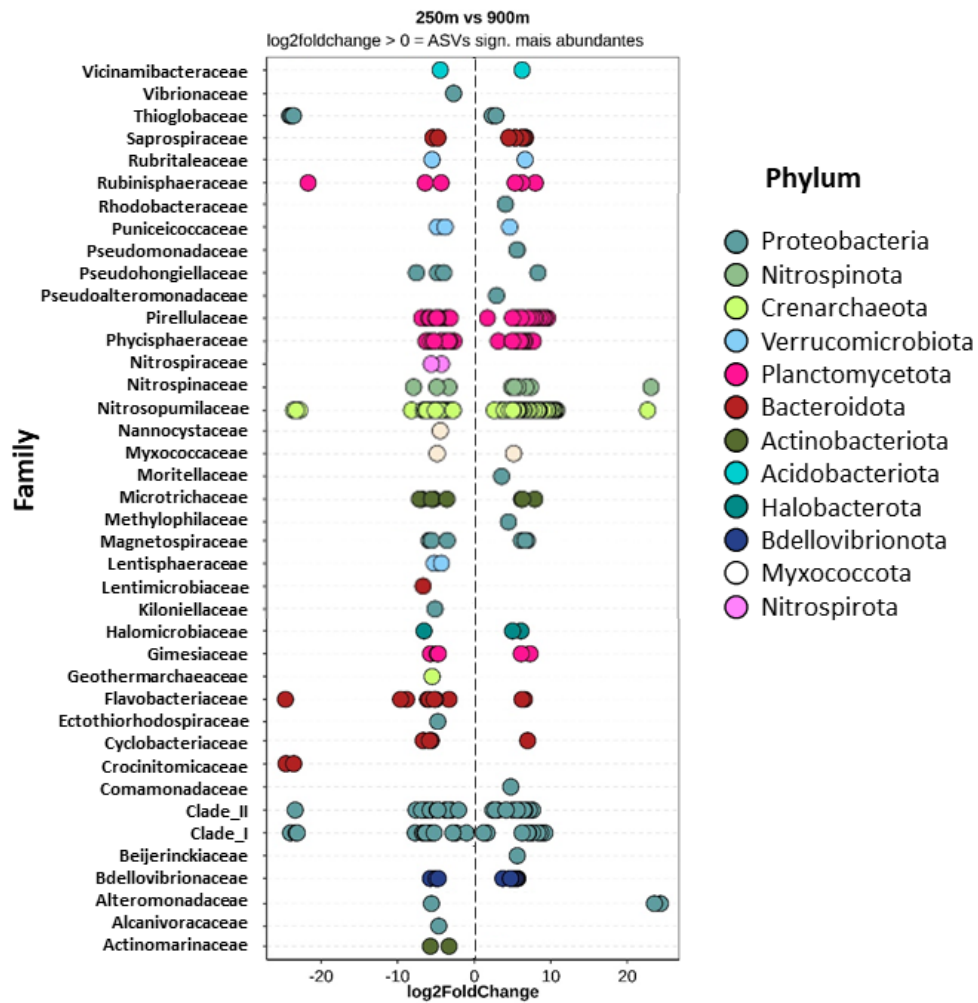


Figura 21. Abundância diferencial de ASVs por família entre amostras de 250 e 900 metros. Cada círculo representa uma ASV. As ASVs estão agrupadas por família, ou seja, vários círculos dentro de uma família representam as ASVs atribuídas àquela família. Círculos distribuídos a esquerda da linha tracejada representam ASVs significativamente mais abundantes nas amostras de 250 metros. Círculos localizados a direita representam ASV mais abundantes em amostras de 900 metros. Cores representam os filos. Fonte: Elaborado pelo autor.

As famílias com ASVs de abundância diferencial significativa encontradas apenas em 250 m tem diferentes valores de abundância relativa. Alcanivoracaceae representa ~0.4% do total de famílias, enquanto Nannocystaceae, Kiloniellaceae e Ectothiorhodospiraceae tem valores abaixo de 0.0001% (Figura 21 e Tabela 4).

Em 900 m, foi identificada uma ASV de Pseudoalteromonadaceae, família que representa ~8% do total e é a terceira mais abundante nessa profundidade (Figura 15). Ainda em 900 m, são destacadas ASVs com abundância diferencial significativa

das famílias Moritellaceae, Methylophilaceae e Beijerinckiaceae, que representam menos que 0.0001% do total (Figura 21 e Tabela 4).

Tabela 4. Abundância relativa de famílias com abundância diferencial em 250 m ou 900 m. Porcentagem de abundância relativa das famílias com ASVs presentes apenas na profundidade de 250 m ou 900 m de acordo com a análise de abundância diferencial.

Profundidade	Família	Abundância relativa
250 M	Vibrionaceae	0.005%
250 M	Nitrospiraceae	0.04%
250 M	Nannocystaceae	<0.0001%
250 M	Lentimicrobiaceae	0.04%
250 M	Kiloniellaceae	<0.0001%
250 M	Ectothiorhodospiraceae	<0.0001%
250 M	Crocinitomicaceae	0.3%
250 M	Alcanivoracaceae	0.4%
250 M	Actinomarinaceae	0.3%
900 M	Rhodobacteraceae	0.6%
900 M	Pseudomonadaceae	0.2%
900 M	Pseudoalteromonadaceae	5%
900 M	Moritellaceae	<0.0001%
900 M	Methylophilaceae	<0.0001%
900 M	Comamonadaceae	0.03%
900 M	Beijerinckiaceae	<0.0001%

Fonte: Elaborado pelo autor.

As famílias presentes em ambas as profundidades nessa análise, com ASVs diferentes para cada uma delas, variam em abundância relativa. A família Nitrosopumilaceae e o Clado I de Pelagibacterales são as mais abundantes reportadas nesse trabalho (Figura 15), enquanto as famílias Pseudohongiellaceae e Myxococcaceae representam menos de 0.0001% do total de famílias (Figura 21 e Tabela 5).

Tabela 5. Abundância relativa de famílias com abundância diferencial em ambas as profundidades. Porcentagem de abundância relativa das famílias com ASVs presentes em ambas as profundidades de acordo com a análise de abundância diferencial.

Família	Abundância relativa
Vicinamibacteraceae	0.06%
Thioglobaceae	0.9%
Saprospiraceae	0.02%
Rubritalaceae	0.1%
Rubinisphaeraceae	0.1%
Puniceicoccaceae	<0.0001%
Pseudohongiellaceae	0.2%
Pirellulaceae	3%
Phycisphaeraceae	0.6%
Nitrospinaceae	0.4%
Nitrosopumilaceae	30%
Myxococcaceae	<0.0001%
Microtrichaceae	0.6%
Magnetospiraceae	0.1%
Halomicrobiaceae	0.02%
Gimesiaceae	0.05%
Flavobacteriaceae	2%
Cyclobacteriaceae	0.2%
Bdellovibrionaceae	<0.0001%
Alteromonadaceae	2%
Clado I	8%
Clado II	3%

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

A distribuição espacial dos microrganismos nos oceanos tem sido estudada há décadas, e mostra que entre os fatores que podem influenciar a sua estrutura estão a disponibilidade de recursos, nutrientes, luz, predação e os parâmetros físicos e químicos do habitat (GALAND et al., 2010). Mesmo sendo limitada pela baixa disponibilidade de luz e ausência da produção primária fotossintética, sabe-se que a zona mesopelágica possui elevadas taxas de alimentação, respiração e produção primária através da quimiossíntese (COSTELLO; BREYER, 2017; MESTRE et al., 2018). Além disso, essa é a zona do ambiente pelágico onde a maior riqueza de espécies tem sido relatada (QUERO et al., 2020; WILSON et al., 2017)

Neste estudo, a latitude e longitude não mostraram correlação significativa com a riqueza e diversidade de espécies de procariotos. Em contraste, análise vertical da zona mesopelágica mostrou que apesar da riqueza de espécies ter sido similar entre as profundidades estudadas, a alfa diversidade de Shannon foi maior em 250 m de profundidade. Sabe-se que o índice de diversidade de Shannon-Wiener leva em consideração a riqueza e a abundância relativa das espécies (SHANNON, 1948), podendo, nesse caso, indicar que a profundidade de 250 m possui grupos menos dominantes do que a profundidade de 900 m e, conseqüentemente, composição mais diversa.

A partir do resultado do nMDS, observa-se que as profundidades 250 m e 900 m, (referentes as massas d'água ACAS e AIA, respectivamente) também têm influência na distribuição das comunidades presentes na Bacia de Santos. Esse resultado está de acordo com estudos que mostram que as comunidades microbianas são pouco afetadas geograficamente comparando com sua estratificação por profundidade (ABIRAMI *et al.*, 2021; CHAFFRON *et al.*, 2021; FERREIRA *et al.*, 2022; TENG *et al.*, 2021). Já foram identificados padrões de estratificação de comunidades na zona pelágica entre zonas (epipelágica, mesopelágica, batipelágica, abissopelágica e hadopelágica) e entre massas d'água (AGOGUÉ *et al.*, 2011; GALAND *et al.*, 2010) no Mar Mediterrâneo, Mares Nórdicos, Oceanos Atlântico Sul e Norte, Índico, Pacífico e Ártico, sugerindo metabolismos adaptados para responder aos diferentes ambientes encontrados de acordo com a profundidade (AGOGUÉ *et al.*, 2011; GALAND *et al.*, 2010; LE MOINE BAUER *et al.*, 2018; SANZ-SÁEZ *et al.*, 2020). Os resultados apresentados neste trabalho mostram que as massas d'água também diferem em densidade. Acredita-se que essa diferença entre densidades possa agir como barreira para a dispersão dos microrganismos (DOBAL-AMADOR *et al.*, 2016; HAMDAN *et al.*, 2013; HERNANDO-MORALES; AMENEIRO; TEIRA, 2017). Devido a essa barreira, os padrões de circulação das massas d'água funcionam como biotransportadores, carreando a comunidade microbiana e afetando diretamente na sua dispersão. Os microrganismos de vida livre podem ficar restritos a movimentação natural da massa d'água com a qual entram em contato, sendo inclusive transportados pela circulação termohalina (HERNANDO-MORALES; AMENEIRO; TEIRA, 2017). Considerando que parâmetros estocásticos podem participar da dispersão de microrganismos (GALAND *et al.*, 2010), estudos também investigam a participação da seleção

ambiental dos grupos microbianos pelas condições de cada massa d'água a partir da dispersão dos mesmos (HAMDAN et al., 2013).

As 3 ordens mais abundantes encontradas na região mesopelágica da Bacia de Santos foram comuns entre as duas profundidades (Nitrosopumilales, Pelagibacterales e Alteromonadales), sendo as diferenças observadas somente a partir da quarta ordem mais abundante – Flavobacteriales em 250 m e Pirellulales em 900 m de profundidade. Essa diferença aumenta conforme a abundância dos grupos diminuí, sugerindo que os grupos menos dominantes poderiam ser responsáveis pela estratificação encontrada entre profundidades. Contudo, a análise de abundância diferencial mostra que tanto os grupos mais raros quanto os mais dominantes tem ASVs significativamente mais abundantes em cada profundidade analisada. A família Nitrosopumilaceae, por exemplo, parte da ordem mais abundante nos dados apresentados (Nitrosopumilales), representa ~40% do total de famílias em 250 m e ~46% em 900 m (Figura 14), sendo um grupo dominante com diferentes ASVs significativas para cada uma das profundidades. Já as famílias Pseudohongiellaceae e Myxococcaceae, têm ASVs diferentes com presença significativa em cada profundidade, mas representam menos de 1% do total de famílias encontradas nesse estudo.

Em contraste à estratificação identificada, pode-se também destacar a presença de ASVs comuns entre as profundidades, mostrando versatilidade suficiente de seu metabolismo para prosperar independente da variação das condições ambientais. O processo de transferência de procariotos para maiores profundidades através de seu acoplamento a partículas de neve marinha têm sido reportado como conectividade vertical e pode ser uma das explicações para a presença dessas as ASVs em ambas as profundidades (MESTRE et al., 2018). Esse comportamento já foi descrito para membros de *Alteromonas*, gênero classificado dentro da terceira ordem mais abundante em ambas as profundidades nos dados apresentados, a ordem Alteromonadales (MESTRE et al., 2018; SANZ-SÁEZ et al., 2020). Uma das causas dessa conectividade pode ser o resultado dos processos hidrográficos de mistura e correntes oceânicas, que causam a interação de massas d'água e, conseqüentemente, a mistura de diferentes comunidades de microrganismos (HAMDAN et al., 2013).

Na zona mesopelágica, a ordem mais abundante encontrada na Bacia de Santos foi Nitrosopumilales, uma arqueia que pertence a classe Nitrososphaeria e filo Crenarchaeota. Esse grupo é composto por arqueias oxidadoras de amônia aeróbias obrigatórias, autotróficas e fixadoras de CO₂. São amplamente distribuídas nos oceanos e principalmente no mar profundo (QIN *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2020). As arqueias oxidadoras de amônia (AOA) são responsáveis pela primeira etapa do ciclo do nitrogênio, a nitrificação. A nitrificação consiste na oxidação da amônia (NH₃) em nitrato (NO₃⁻) através do nitrito (NO₂⁻) (KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018; VERHAMME; PROSSER; NICOL, 2011). Os níveis de nitrato encontrados na zona mesopelágica da Bacia de Santos podem estar relacionados com a atividade de nitrificação realizada por Nitrosopumilus, sendo tanto a abundância dessa ordem (Figura 14) quanto as concentrações de nitrato (Figura 7) maiores em 900 m.

Além do ciclo do nitrogênio, as AOA também contribuem significativamente com o ciclo do carbono, fixando CO₂ por uma via altamente eficiente para a produção de energia, o que possibilita sua sobrevivência em regiões oligotróficas nos oceanos (KONNEKE *et al.*, 2014).

As ordens Pelagibacterales e Alteromonadales foram o segundo e terceiro grupos mais abundantes, e são bactérias amplamente reconhecidos por seu papel no ciclo do carbono. Elas pertencem as classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria, respectivamente. Ambas são classificadas no filo Proteobacteria, um dos maiores filios do domínio Bacteria, e estão entre os grupos mais abundantes da região mesopelágica dos oceanos Ártico e Pacífico (QUERO *et al.*, 2020; SANZ-SÁEZ *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020).

Essas duas classes têm grupos relacionados a heterotrofia e são conhecidas por serem as maiores consumidoras de dimetil sulfônio propionato (DMSP) presente na água, suprindo suas necessidades de Carbono e Enxofre através dele e tendo grande influência nos ciclos dos dois elementos. O DMSP é precursor do dimetil sulfeto (DMS), um composto volátil produzido a partir da hidrólise do DMSP que aumenta o albedo e a produção de nuvens, mitigando o aquecimento global. O DMS também é a fonte mais importante de enxofre biogênico, representando 80% das emissões de enxofre biogênico da atmosfera (CUI *et al.*, 2015; TENG *et al.*, 2021).

A assimilação de DMSP pode seguir duas vias metabólicas diferentes em Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria, a primeira resultando na produção de metanetiol e a segunda na produção de DMS. Em oceanos polares, esses dois grupos são os principais responsáveis pelo ciclo DMSP/DMS (SUN *et al.*, 2016; TENG *et al.*, 2021).

Juntamente com a classe Betaproteobacteria, as classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria também podem utilizar fosfato para suprir suas necessidades de fósforo quando o último é limitante (LONGNECKER; LOMAS; VAN MOOY, 2010; SEBASTIÁN *et al.*, 2012). Além desses grupos, a ordem Sphingomonadales também tem membros relacionados ao ciclo do fósforo, tendo em seu genoma genes que são potenciais degradadores de fosforo orgânico dissolvido. Essa ordem representou cerca de 1% das comunidades encontradas em 250 m, e 2% do total em 900 m, estando entre as 20 ordens mais abundantes na zona mesopelágica (Figura 14) (XU *et al.*, 2018). O fosfato foi detectado em toda a zona mesopelágica da Bacia de Santos (Figura 7), mostrando níveis mais elevados na região mais profunda (900 m). No oceano, o fósforo dissolvido pode ser encontrado na forma orgânica ou inorgânica, sendo essas duas formas conectadas pela atividade metabólica de microrganismos. O fósforo é um nutriente limitante nos oceanos e não pode ser totalmente substituído por nenhum outro elemento. Por essa razão, os níveis de fósforo de um ambiente determinam por exemplo os níveis de produção primária e de sequestro de carbono (VAN MOOY *et al.*, 2009). Seu ciclo pode estar acoplado com os ciclos do carbono, nitrogênio e ferro, principalmente pelo processo de fixação do nitrogênio (DUHAMEL *et al.*, 2021; KARL, 2014).

A ordem Pelagibacterales, previamente conhecida como SAR11, é o bacterioplâncton mais abundante no oceano (MORRIS *et al.*, 2002). Seus membros tem metabolismo diverso, incluindo adaptações a ambientes oligotróficos, o que explica a capacidade de assimilação de uma quantidade muito maior de aminoácidos dissolvidos e livres no meio quando comparado aos demais microrganismos (GIOVANNONI, 2017). Logo, diferente dos demais grupos, esse clado é pouco afetado pela limitação de carbono e nitrogênio, um dos motivos que explica sua abundância (GIOVANNONI, 2017; MALMSTROM *et al.*, 2004). A ordem Pelagibacterales é composta por organismos de vida livre e podem consumir até 25%

do carbono que é fixado na superfície, tendo portanto, influência significativa no ciclo do carbono (HERNÁNDEZ *et al.*, 2020; MALMSTROM *et al.*, 2004).

A terceira ordem mais abundante, Alteromonadales, tem membros comumente encontrados acoplados a partículas na coluna d'água, como já citado, mas também é um dos principais grupos responsáveis pela remineralização de carbono orgânico particulado (COP) na zona mesopelágica. Indicada como um “hot spot”, ela também mostra interações positivas com diversos grupos de bactérias na mesma região, indicando que pode ser um grupo que realiza *cross-feeding* (alimentação cruzada, em tradução livre). São encontradas em seu genoma grandes quantidades de proteases e hidrolases, o que pode indicar a quebra de COP não só em glicose e agarose, mas em uma vasta variedade de substratos que podem ser usados como fonte de Carbono (KONG *et al.*, 2021). Nesse trabalho, sua distribuição aumentou com a profundidade, corroborando com estudos anteriores (AGOGUÉ *et al.*, 2011).

A predição funcional dos grupos encontrados na análise realizada (Figura 16) mostrou a quimioheterotrofia como a função mais encontrada em todas as amostras. Quimioheterotróficos podem utilizar diferentes elementos para a geração de energia, mas tem compostos de carbono como principais componentes necessários ao seu metabolismo (WHITMAN, 2015), podendo ter relação com a metilotrofia (utilização de metano como fonte de carbono), e a metanogênese (utilização de hidrogênio para redução de CO₂ e produção de metano) (MUNN, 2019). Grupos quimioheterotróficos são classificados como quimioorganoheterotróficos ou quimiolitoheterotróficos, dependendo de sua capacidade de utilizar fontes orgânicas ou inorgânicas de energia, respectivamente (MCKINLEY; WETZEL, 1979).

Foram preditas também a redução de nitrato e a respiração de nitrato e nitrogênio, o que é esperado, já que as funções são relacionadas. A redução de nitrato pode seguir diversas vias que podem resultar na geração de nitrogênio molecular, nitrito e amônia, o ultimo sendo um composto limitante no oceano (CABELLO; ROLDÁN; MORENO-VIVIÁN, 2004). Essas 3 funções foram preditas principalmente para as comunidades microbianas presentes em 900 m (Figura 17), estando esse resultado de acordo com os níveis mais elevados de nitrato encontrados nessa profundidade (Figura 7). Outra função predita relacionada ao ciclo do nitrogênio foi a fixação de nitrogênio (Figura 22).

O nitrogênio (N_2) é o gás mais abundante na atmosfera terrestre, porém não pode ser utilizado diretamente em sua forma molecular pela maioria dos seres vivos. A fixação do nitrogênio é a incorporação do gás nitrogênio por microrganismos para uso em seu metabolismo e resulta na subsequente liberação desse elemento na forma de amônia (NH_3), através do uso da enzima nitrogenase (Figura 22). Esse processo permite a entrada de N_2 no ciclo do nitrogênio, e é a etapa mais importante desse ciclo (WARD; CAPONE; ZEHR, 2007). Sendo a maior fonte de nitrogênio para o oceano, os fixadores de nitrogênio contribuem na sustentação da produção primária e na manutenção do nitrogênio global (FALKOWSKI; FENCHEL; DELONG, 2008). A zona mesopelágica tem as maiores medições de fixação afótica de nitrogênio publicadas e, apesar da perda do volume fixado pela denitrificação e processo annamox, estima-se que essa seja a zona responsável pela sustentação da fixação afótica de nitrogênio (ARÍSTEGUI, 2005; BENAVIDES et al., 2018; INGALLS et al., 2006; MOISANDER et al., 2017; WARD; CAPONE; ZEHR, 2007).

A nitrificação e oxidação aeróbia de amônia e nitrito são processos relacionados e foram preditas para os grupos do ambiente mesopelágico analisado nesse estudo. Como já mencionado, a ordem Nitrosopumilales foi o grupo mais abundante encontrado na zona mesopelágica da Bacia de Santos (Figura 13) e é composto por arqueias oxidadoras de amônia, sugerindo a participação desse grupo para a predição dessa função. A versatilidade na sua distribuição nos oceanos ocorre exatamente pela capacidade de nitrificação e oxidação aeróbia de amônia e nitrito (Figura 22) (KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018).

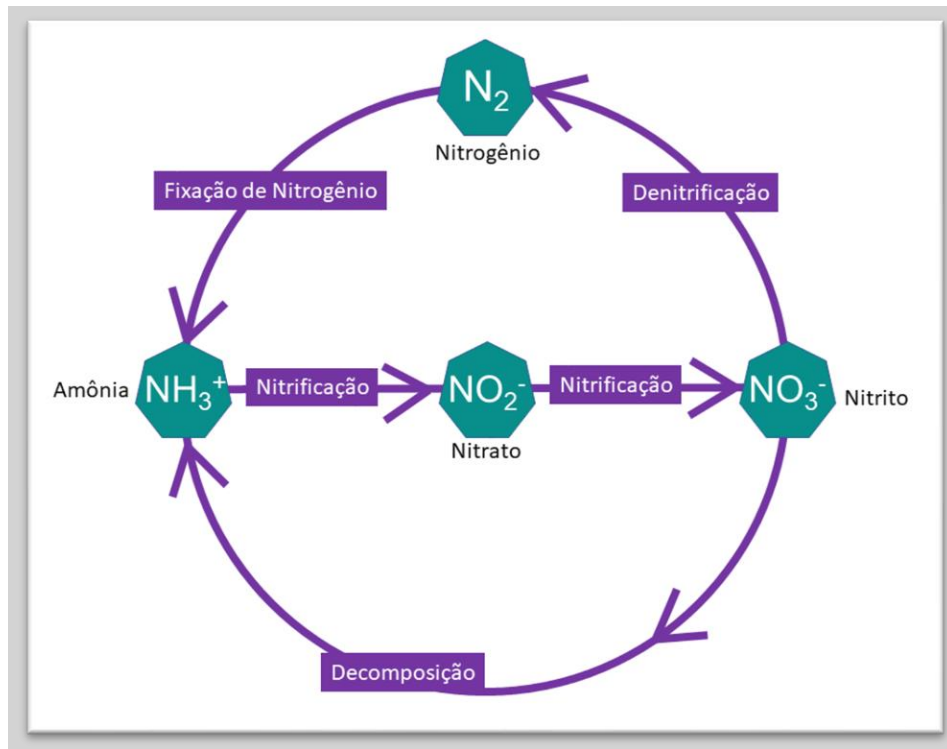


Figura 22. Esquema simplificado do ciclo do nitrogênio. Os polígonos verdes representam as espécies de nitrogênio. As setas roxas indicam as transformações entre as espécies e estão nomeadas na figura. Fonte: Elaborado pelo autor.

As comunidades microbianas que se mostraram mais abundantes na zona mesopelágica da Bacia de Santos estão de acordo com grupos previamente encontrados na região mesopelágica dos oceanos Atlântico Sul e Norte, Pacífico Sul, Índico e Austral. Trabalhos anteriores sugerem sua contribuição ecológica não só para o ciclo do carbono, mas também para os ciclos do metano e enxofre (ALVES JUNIOR *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2022; SANZ-SÁEZ *et al.*, 2020). Tanto os grupos mais abundantes como os mais raros apresentam ASVs que podem estar adaptadas às massas d'água em que se encontram e serem responsáveis por estruturar as diferentes comunidades do presente estudo. Esse resultado corrobora com estudos mostrando a versatilidade de metabolismos que pode ser encontrada no mesmo grupo na zona mesopelágica (ALVES JUNIOR *et al.*, 2015; ORCUTT *et al.*, 2011; SUNAGAWA *et al.*, 2015; SWAN *et al.*, 2014). A conectividade vertical também pode estar presente nessa região. Esse evento tem grande colaboração para a formação das comunidades do oceano profundo, e a identificação de sua ocorrência pode auxiliar no avanço de seu estudo.

Esse trabalho mostrou que a região mesopelágica da Bacia de Santos abriga comunidade de bactérias e arqueias com potencial participação principalmente nos ciclos do carbono e nitrogênio, ambos de grande importância para a manutenção da vida nos oceanos. A distribuição desses microrganismos no local de estudo mostrou ser influenciada por parâmetros oceanográficos característicos das massas d'água, como temperatura, salinidade, densidade e concentração de oxigênio dissolvido. Esses dados são relevantes para a elaboração de modelos ecológicos e previsão de seu comportamento frente as alterações climáticas ou a impactos antropogênicos. Além disso, apesar de não abrigar um número maior de espécies, a região mais profunda pode abrigar grupos com caráter mais dominante do que na sua superfície, reafirmando a necessidade de mais estudos exploratórios na zona mesopelágica, globalmente. Outro fator que ressalta a importância de tais estudos é do fato de que apenas cerca de 41% das ASVs tiveram identificação a nível de espécie. Futuros estudos na região podem possibilitar a identificação de novos táxons e funções ainda desconhecidas na zona mesopelágica da Bacia de Santos.

7 CONCLUSÕES

- Os resultados indicam que a distribuição dos microrganismos na região mesopelágica da Bacia de Santos não tem relação com a latitude ou longitude na Bacia de Santos, mas é afetada pela profundidade.
- A ordem mais abundante na zona mesopelágica da Bacia de Santos é a arqueia quimiossintetizante Nitrosopumilales, seguida das bactérias heterotróficas da ordem Pelagibacterales e Alteromonadales.
- As variáveis ambientais características de cada massa d'água e as concentrações de nitrato e fosfato se mostraram responsáveis pela estratificação vertical dos microrganismos da zona mesopelágica na Bacia de Santos.
- Diferentes membros da mesma família podem ser encontrados em ambas as massas d'água ou estarem adaptados à apenas uma delas, indicando alta diversidade metabólica dessas famílias na Bacia de Santos.
- Diversos grupos de microrganismos encontrados na zona mesopelágica da Bacia de Santos atuam no ciclo do carbono e nitrogênio, principalmente através da fixação do N_2 e do CO_2 . Além disso, há a presença de microrganismos consumidores de DMSP e responsáveis pela quimiossíntese na Bacia de Santos.

REFERÊNCIAS*

- ABIRAMI, B. et al. Impacts of global warming on marine microbial communities. **Science of The Total Environment**, v. 791, p. 147905, 15 out. 2021.
- ACINAS, S. G. et al. Deep ocean metagenomes provide insight into the metabolic architecture of bathypelagic microbial communities. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 604, dez. 2021.
- AFGAN, E. et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W3–W10, 8 jul. 2016.
- AGOGUÉ, H. et al. Water mass-specificity of bacterial communities in the North Atlantic revealed by massively parallel sequencing: BACTERIAL ASSEMBLAGES IN NORTH ATLANTIC OCEAN. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 2, p. 258–274, jan. 2011.
- ALVES JUNIOR, N. et al. Microbial community diversity and physical–chemical features of the Southwestern Atlantic Ocean. **Archives of Microbiology**, v. 197, n. 2, p. 165–179, mar. 2015.
- AMORIM, N. R. D. CARACTERIZAÇÃO GEOFÍSICA DA DORSAL DE SÃO PAULO E SEU SIGNIFICADO EVOLUTIVO NA BACIA DE SANTOS. p. 71, 2013.
- ANDERSON, T. R.; TANG, K. W. Carbon cycling and POC turnover in the mesopelagic zone of the ocean: Insights from a simple model. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 57, n. 16, p. 1581–1592, ago. 2010.
- ARÍSTEGUI, J. Active mesopelagic prokaryotes support high respiration in the subtropical northeast Atlantic Ocean. **Geophysical Research Letters**, v. 32, n. 3, p. L03608, 2005.
- ARÍSTEGUI, J. et al. Variability in Water-Column Respiration and Its Dependence on Organic Carbon Sources in the Canary Current Upwelling Region. **Frontiers in Earth Science**, v. 8, p. 349, 26 ago. 2020.
- AVERY, O. T.; MACLEOD, C. M.; MCCARTY, M. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 79, n. 2, p. 137–158, 1 fev. 1944.
- AZAM, F. Microbial Control of Oceanic Carbon Flux: The Plot Thickens. **Science, New Series**, v. 280, n. 5364, p. 694–696, 1998.
- BAR-ON, Y. M.; PHILLIPS, R.; MILO, R. The biomass distribution on Earth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 25, p. 6506–6511, 19 jun. 2018.
- BENAVIDES, M. et al. Deep Into Oceanic N₂ Fixation. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, p. 108, 6 abr. 2018.
- BOKULICH, N. A. et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 90, 17 maio 2018.
- BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, ago. 2019.
- *De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

- BRIGGS, N.; DALL'OLMO, G.; CLAUSTRE, H. Major role of particle fragmentation in regulating biological sequestration of CO₂ by the oceans. **Science**, v. 367, n. 6479, p. 791–793, 14 fev. 2020.
- BUCHAN, A. et al. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 686–698, out. 2014.
- BUESSELER, K. O. et al. Revisiting Carbon Flux Through the Ocean's Twilight Zone. **Science**, v. 316, n. 5824, p. 567–570, 27 abr. 2007.
- CABELLO, P.; ROLDÁN, M. D.; MORENO-VIVIÁN, C. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. **Microbiology**, v. 150, n. 11, p. 3527–3546, 1 nov. 2004.
- CAINELLI, C.; MOHRIAK, W. U. General evolution of the eastern Brazilian continental margin. **The Leading Edge**, v. 18, n. 7, p. 800–805, jul. 1999.
- CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, jul. 2016.
- CALLEJA, M. L. et al. The Mesopelagic Scattering Layer: A Hotspot for Heterotrophic Prokaryotes in the Red Sea Twilight Zone. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, p. 259, 13 ago. 2018.
- CAO, S. et al. Diversity and community structure of bacterioplankton in surface waters off the northern tip of the Antarctic Peninsula. **Polar Research**, v. 38, n. 0, 21 mar. 2019.
- CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, maio 2010.
- CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108 Suppl 1, p. 4516–4522, 15 mar. 2011.
- CASTRO, B. M. et al. MULTIDISCIPLINARY OCEANOGRAPHIC PROCESSES ON THE WESTERN ATLANTIC CONTINENTAL SHELF BETWEEN 4°N AND 34°S. **The Sea**, v. 14, p. 39, 2006.
- CAVAN, E. L. et al. Exploring the ecology of the mesopelagic biological pump. **Progress in Oceanography**, v. 176, p. 102125, set. 2019.
- CHAFFRON, S. et al. Environmental vulnerability of the global ocean epipelagic plankton community interactome. **Science Advances**, ago. 2021.
- CHAISSON, M.; PEVZNER, P.; TANG, H. Fragment assembly with short reads. **Bioinformatics**, v. 20, n. 13, p. 2067–2074, 1 set. 2004.
- COSTELLO, M. J.; BREYER, S. Ocean Depths: The Mesopelagic and Implications for Global Warming. **Current Biology**, v. 27, n. 1, p. R36–R38, jan. 2017.
- CUI, Y. et al. Abundance and Distribution of Dimethylsulfoniopropionate Degradation Genes and the Corresponding Bacterial Community Structure at Dimethyl Sulfide Hot Spots in the Tropical and Subtropical Pacific Ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 12, p. 4184–4194, 15 jun. 2015.
- DANOVARO, R. et al. Marine viruses and global climate change. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 6, p. 993–1034, nov. 2011.

DAYHOFF, M. O.; LEDLEY, R. **Comproteín: a computer program to aid primary protein structure determination**. AFIPS '62 (Fall). **Anais...**1962.

DELONG, E. F. et al. Community Genomics Among Stratified Microbial Assemblages in the Ocean's Interior. **Science**, v. 311, n. 5760, p. 496–503, 27 jan. 2006.

DIAS, R. J. S. **Morfologia e sedimentação na Plataforma Continental Externa e Talude ao largo da Ilha de São Sebastião -SP**. Mestrado em Oceanografia Geológica—São Paulo: Universidade de São Paulo, 12 set. 2016.

DJURHUUS, A. et al. Microbe biogeography tracks water masses in a dynamic oceanic frontal system. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 3, p. 170033, mar. 2017.

DOBAL-AMADOR, V. et al. Vertical stratification of bacterial communities driven by multiple environmental factors in the waters (0–5000m) off the Galician coast (NW Iberian margin). **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 114, p. 1–11, 1 ago. 2016.

DUHAMEL, S. et al. Phosphorus as an integral component of global marine biogeochemistry. **Nature Geoscience**, v. 14, n. 6, p. 359–368, jun. 2021.

DURET, M. T.; LAMPITT, R. S.; LAM, P. Prokaryotic niche partitioning between suspended and sinking marine particles. **Environmental Microbiology Reports**, v. 11, n. 3, p. 386–400, jun. 2019.

DURKIN, C. A.; ESTAPA, M. L.; BUESSELER, K. O. Observations of carbon export by small sinking particles in the upper mesopelagic. **Marine Chemistry**, v. 175, p. 72–81, out. 2015.

FALKOWSKI, P. G.; FENCHEL, T.; DELONG, E. F. The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles. **Science**, v. 320, n. 5879, p. 1034–1039, 23 maio 2008.

FERREIRA, J. C. N. et al. Abundance and microbial diversity from surface to deep water layers over the Rio Grande Rise, South Atlantic. **Progress in Oceanography**, v. 201, p. 102736, fev. 2022.

FILHO, C.; MENDES, B. M. Correntes e massas de água da plataforma continental norte de São Paulo. 1997.

GALAND, P. E. et al. Unique archaeal assemblages in the Arctic Ocean unveiled by massively parallel tag sequencing. **The ISME Journal**, v. 3, n. 7, p. 860–869, jul. 2009.

GALAND, P. E. et al. Hydrography shapes bacterial biogeography of the deep Arctic Ocean. **The ISME Journal**, v. 4, n. 4, p. 564–576, abr. 2010.

GAMBOA, L. A. P. et al. Evaporitos estratificados no Atlântico Sul. Em: **Sal: Geologia e Tectônica. Exemplos nas Bacias Brasileiras**. São Paulo: Beca Edições, 2008. p. 91–763.

GAUTHIER, J. et al. A brief history of bioinformatics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 6, p. 1981–1996, 27 nov. 2019.

GIOVANNONI, S. J. SAR11 Bacteria: The Most Abundant Plankton in the Oceans. **Annual Review of Marine Science**, v. 9, n. 1, p. 231–255, 2017.

GLOVER, A. G. et al. Managing a sustainable deep-sea 'blue economy' requires knowledge of what actually lives there. **eLife**, v. 7, p. e41319, 27 nov. 2018.

- GRAM, L. et al. Possible Quorum Sensing in Marine Snow Bacteria: Production of Acylated Homoserine Lactones by Roseobacter Strains Isolated from Marine Snow. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 4111–4116, ago. 2002.
- GRASSHOFF, K. **Methods of Seawater Analysis, 3rd Completely Revised and Enlarged Edition**. 3. ed. [s.l.] Wiley, 2009.
- HAMDAN, L. J. et al. Ocean currents shape the microbiome of Arctic marine sediments. **The ISME Journal**, v. 7, n. 4, p. 685–696, abr. 2013.
- HAO, Y.; PEI, Z.; BROWN, S. M. Bioinformatics in Microbiome Analysis. Em: **Methods in Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 44p. 1–18.
- HERNÁNDEZ, L. et al. Evolutionary history of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) demethylation enzyme DmdA in marine bacteria. **PeerJ**, v. 8, p. e9861, 10 set. 2020.
- HERNANDO-MORALES, V.; AMENEIRO, J.; TEIRA, E. Water mass mixing shapes bacterial biogeography in a highly hydrodynamic region of the Southern Ocean. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 1017–1029, mar. 2017.
- HERNDL, G. J.; REINTHALER, T. Microbial control of the dark end of the biological pump. **Nature Geoscience**, v. 6, n. 9, p. 718–724, set. 2013.
- HIDALGO, M.; BROWMAN, H. I. Developing the knowledge base needed to sustainably manage mesopelagic resources. **ICES Journal of Marine Science**, v. 76, n. 3, p. 609–615, 1 maio 2019.
- HU, S. et al. A laboratory investigation of interactions between denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO) and anammox processes in anoxic environments. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 8706, ago. 2015.
- INGALLS, A. E. et al. Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 17, p. 6442–6447, 25 abr. 2006.
- JEON, Y.-S. et al. Improved pipeline for reducing erroneous identification by 16S rRNA sequences using the Illumina MiSeq platform. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 60–69, jan. 2015.
- JIAO, N. et al. Unveiling the enigma of refractory carbon in the ocean. **National Science Review**, v. 5, n. 4, p. 459–463, 1 jul. 2018.
- JUNG, M.-Y. et al. Ammonia-oxidizing archaea possess a wide range of cellular ammonia affinities. **The ISME Journal**, v. 16, n. 1, p. 272–283, jan. 2022.
- KARL, D. M. Microbially Mediated Transformations of Phosphorus in the Sea: New Views of an Old Cycle. **Annual Review of Marine Science**, v. 6, n. 1, p. 279–337, 3 jan. 2014.
- KARNER, M. B.; DELONG, E. F.; KARL, D. M. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. **Nature**, v. 409, n. 6819, p. 507–510, jan. 2001.
- KIM, B.-R. et al. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 2089–2093, 28 dez. 2017.

- KONG, L.-F. et al. Illuminating Key Microbial Players and Metabolic Processes Involved in the Remineralization of Particulate Organic Carbon in the Ocean's Twilight Zone by Metaproteomics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 20, p. e00986-21, 28 set. 2021.
- KONNEKE, M. et al. Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO₂ fixation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 22, p. 8239–8244, 3 jun. 2014.
- KUYPERS, M. M. M.; MARCHANT, H. K.; KARTAL, B. The microbial nitrogen-cycling network. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 263–276, maio 2018.
- LARA, E. et al. Unveiling the role and life strategies of viruses from the surface to the dark ocean. **Science Advances**, v. 3, n. 9, p. e1602565, set. 2017.
- LE MOINE BAUER, S. et al. Water Masses and Depth Structure Prokaryotic and T4-Like Viral Communities Around Hydrothermal Systems of the Nordic Seas. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1002, 31 maio 2018.
- LEEUW, J. D.; MAIR, P. Shepard Diagram. Em: **Wiley StatsRef: Statistics Reference Online**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 1–3.
- LIMA-MENDEZ, G. et al. Determinants of community structure in the global plankton interactome. **Science**, v. 348, n. 6237, 2015.
- LONGNECKER, K.; LOMAS, M. W.; VAN MOOY, B. A. S. Abundance and diversity of heterotrophic bacterial cells assimilating phosphate in the subtropical North Atlantic Ocean. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 2773–2782, out. 2010.
- LOUCA, S.; PARFREY, L. W.; DOEBELI, M. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. p. 7, 2016.
- MALMSTROM, R. R. et al. Contribution of SAR11 Bacteria to Dissolved Dimethylsulfoniopropionate and Amino Acid Uptake in the North Atlantic Ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4129–4135, jul. 2004.
- MANNA, V. et al. Prokaryotic Response to Phytodetritus-Derived Organic Material in Epi- and Mesopelagic Antarctic Waters. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1242, 9 jun. 2020.
- MCKINLEY, K. R.; WETZEL, R. G. Photolithotrophy, photoheterotrophy, and chemoheterotrophy: Patterns of resource utilization on an annual and a diurnal basis within a pelagic microbial community. **Microbial Ecology**, v. 5, n. 1, p. 1–15, mar. 1979.
- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 22 abr. 2013.
- MESTRE, M. et al. Sinking particles promote vertical connectivity in the ocean microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 29, p. E6799–E6807, 17 jul. 2018.
- MISLAN, K. A. S. et al. Group behavior among model bacteria influences particulate carbon remineralization depths. **Journal of Marine Research**, v. 72, n. 3, p. 183–218, 1 maio 2014.

- MODI, A. et al. The Illumina Sequencing Protocol and the NovaSeq 6000 System. Em: MENGONI, A.; BACCI, G.; FONDI, M. (Eds.). . **Bacterial Pangenomics: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US, 2021. p. 15–42.
- MOHRIAK, W. U. **Sedimentary Basins of the Brazilian Continental Margin**. [s.l.: s.n.].
- MOISANDER, P. H. et al. Chasing after Non-cyanobacterial Nitrogen Fixation in Marine Pelagic Environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- MOODY, G. **Digital Code of Life: How Bioinformatics is Revolutionizing Science, Medicine, and Business**. Londres. v. 1, 2004.
- MORAN, M. A. The global ocean microbiome. **Science**, v. 350, n. 6266, p. aac8455–aac8455, 11 dez. 2015.
- MOREIRA, J. L. P et al. Bacia de Santos. **Boletim de Geociências da Petrobrás**, Rio de Janeiro. v.15, n. 2, p. 531 - 549. 2007.
- MORRIS, R. M. et al. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 806–810, dez. 2002.
- MUNN, C. B. **Marine Microbiology: Ecology & Applications**. 3. ed. [s.l.] CRC, 2019. v. 1
- NAYAK, A. R.; TWARDOWSKI, M. S. “Breaking” news for the ocean’s carbon budget. **Science**, v. 367, n. 6479, p. 738–739, 14 fev. 2020.
- OKSANEN, J. et al. **Vegan: Community Ecology Package (Version 2.5-5)**. [s.l.: s.n.].
- ORCUTT, B. N. et al. Microbial Ecology of the Dark Ocean above, at, and below the Seafloor. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 361–422, jun. 2011.
- PAIJMANS, J. L. A. et al. Sequencing single-stranded libraries on the Illumina NextSeq 500 platform **arXiv: 1711.11004** , 29 nov. 2017.
- PALIY, O.; SHANKAR, V. Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 5, p. 1032–1057, mar. 2016.
- PARADA, A. E.; NEEDHAM, D. M.; FUHRMAN, J. A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples: Primers for marine microbiome studies. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1403–1414, maio 2016.
- PEDLER, B. E.; ALUWIHARE, L. I.; AZAM, F. Single bacterial strain capable of significant contribution to carbon cycling in the surface ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 20, p. 7202–7207, 20 maio 2014.
- PEREIRA, M. J. et al. Estratigrafia da Bacia de Santos: Análise das sequencias, sistemas deposicionais e revisão litoestratigráfica. v. 1, p. 65–79, 1986.
- PIRELLA KARLUSICH, J. J. et al. Global distribution patterns of marine nitrogen-fixers by imaging and molecular methods. **Nature Communications**, v. 12, p. 4160, 6 jul. 2021.

PROUD, R.; COX, M. J.; BRIERLEY, A. S. Biogeography of the Global Ocean's Mesopelagic Zone. **Current Biology**, v. 27, n. 1, p. 113–119, jan. 2017.

QIN, W. et al. Candidatus Nitrosopumilales. Em: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2016. p. 1–2.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Database issue, p. D590–D596, jan. 2013.

QUERO, G. M. et al. Inorganic and Organic Carbon Uptake Processes and Their Connection to Microbial Diversity in Meso- and Bathypelagic Arctic Waters (Eastern Fram Strait). **Microbial Ecology**, v. 79, n. 4, p. 823–839, maio 2020.

QUIGG, A. et al. From Nano-Gels to Marine Snow: A Synthesis of Gel Formation Processes and Modeling Efforts Involved with Particle Flux in the Ocean. **Gels (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 3, p. 114, 9 ago. 2021.

RIGONATO, J. et al. **Insights into biotic and abiotic modulation of ocean mesopelagic communities**. [s.l.] Ecology, 27 fev. 2021.

ROBINSON, C. et al. Mesopelagic zone ecology and biogeochemistry – a synthesis. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 57, n. 16, p. 1504–1518, ago. 2010.

ROBISON, B. H. Conservation of Deep Pelagic Biodiversity. **Conservation Biology**, v. 23, n. 4, p. 847–858, 2009.

ROCHA, C.; PASSOW, U. Factors influencing the sinking of POC and the efficiency of the biological carbon pump. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 54, p. 639–658, 1 mar. 2007.

RUCKELSHAUS, M. et al. Securing ocean benefits for society in the face of climate change. **Marine Policy**, v. 40, p. 154–159, jul. 2013.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, dez. 1977.

SANTOS, A. et al. Computational methods for 16S metabarcoding studies using Nanopore sequencing data. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 296–305, 2020.

SANZ-SÁEZ, I. et al. Diversity and distribution of marine heterotrophic bacteria from a large culture collection. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 207, dez. 2020.

SEBASTIÁN, M. et al. Bacterioplankton groups involved in the uptake of phosphate and dissolved organic phosphorus in a mesocosm experiment with P-starved Mediterranean waters. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 2334–2347, set. 2012.

SEYLER, L. M. et al. Discerning autotrophy, mixotrophy, and heterotrophy in marine TACK archaea from the North Atlantic. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 4, n. 3, p. fiy014, 30 jan. 2018.

SHANNON, C. E. A Mathematical Theory of Communication. **Bell System Technical Journal**, v. 27, n. 3, p. 379–423, 1948.

- SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135–1145, out. 2008.
- SILVEIRA, I. C. A. DA et al. A corrente do Brasil ao largo da costa leste brasileira. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 48, p. 171–183, 2000.
- SINGH, B. K. et al. Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 779–790, nov. 2010.
- SONG, C. et al. Nutrient regeneration mediated by extracellular enzymes in water column and interstitial water through a microcosm experiment. **Science of The Total Environment**, v. 670, p. 982–992, 20 jun. 2019.
- SOUZA, L. S. DE; SGARBI, G. N. C. Bacia de Santos no Brasil: geologia, exploração e produção de petróleo e gás natural. **Boletim de Geología**, v. 41, n. 1, p. 175–195, 2016.
- SPANG, A.; CACERES, E. F.; ETTEMA, T. J. G. Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. **Science**, v. 357, n. 6351, p. eaaf3883, 11 ago. 2017.
- STRAMMA, L.; ENGLAND, M. On the water masses and mean circulation of the South Atlantic Ocean. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 104, n. C9, p. 20863–20883, 15 set. 1999.
- SUN, J. et al. One Carbon Metabolism in SAR11 Pelagic Marine Bacteria. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23973, 23 ago. 2011.
- SUN, J. et al. The abundant marine bacterium *Pelagibacter* simultaneously catabolizes dimethylsulfoniopropionate to the gases dimethyl sulfide and methanethiol. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 8, p. 16065, ago. 2016.
- SUN, Y.; DEBELJAK, P.; OBERNOSTERER, I. Microbial iron and carbon metabolism as revealed by taxonomy-specific functional diversity in the Southern Ocean. **The ISME Journal**, v. 15, n. 10, p. 2933–2946, out. 2021.
- SUNAGAWA, S. et al. Structure and function of the global ocean microbiome. **Science**, v. 348, n. 6237, p. 1261359, 22 maio 2015.
- SUTTON, T. T. et al. A global biogeographic classification of the mesopelagic zone. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 126, p. 85–102, ago. 2017.
- SWAN, B. K. et al. Genomic and Metabolic Diversity of Marine Group I Thaumarchaeota in the Mesopelagic of Two Subtropical Gyres. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95380, 17 abr. 2014.
- TENG, Z.-J. et al. Biogeographic traits of dimethyl sulfide and dimethylsulfoniopropionate cycling in polar oceans. **Microbiome**, v. 9, n. 1, p. 207, dez. 2021.
- TRIPP, H. J. The unique metabolism of SAR11 aquatic bacteria. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 147–153, abr. 2013.
- TURNER, J. T. Zooplankton fecal pellets, marine snow, phytodetritus and the ocean's biological pump. **Progress in Oceanography**, v. 130, p. 205–248, jan. 2015.
- VAN MOOY, B. A. S. et al. Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. **Nature**, v. 458, n. 7234, p. 69–72, 5 mar. 2009.

- VERHAMME, D. T.; PROSSER, J. I.; NICOL, G. W. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. **The ISME Journal**, v. 5, n. 6, p. 1067–1071, jun. 2011.
- VIANA, A. R. et al. Hydrology, morphology and sedimentology of the Campos continental margin, offshore Brazil. **Sedimentary Geology**, v. 115, p. 133–157, 1 jan. 1998.
- VOLK, T.; HOFFERT, M. I. Ocean Carbon Pumps: Analysis of Relative Strengths and Efficiencies in Ocean-Driven Atmospheric CO₂ Changes. **The carbon cycle and atmospheric CO₂: natural variations Archean to present**, v. 32, p. 99-110, 1985.
- WANG, K. et al. Community assembly of bacteria and archaea in coastal waters governed by contrasting mechanisms: A seasonal perspective. **Molecular Ecology**, v. 29, n. 19, p. 3762–3776, out. 2020.
- WARD, B.; CAPONE, D.; ZEHR, J. What's New in the Nitrogen Cycle? **Oceanography**, v. 20, n. 2, p. 101–109, 1 jun. 2007.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737–738, abr. 1953.
- WEBB, T. J.; VANDEN BERGHE, E.; O'DOR, R. Biodiversity's Big Wet Secret: The Global Distribution of Marine Biological Records Reveals Chronic Under-Exploration of the Deep Pelagic Ocean. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. e10223, 2 ago. 2010.
- WEINBAUER, M. et al. Seasonal variability of microbial respiration and bacterial and archaeal community composition in the upper twilight zone. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 71, n. 2, p. 99–115, 16 dez. 2013.
- WHITMAN, W. B. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (BMSAB)**. 18. ed. [s.l.] Wiley, 2015.
- WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 12, p. 6578–6583, 9 jun. 1998.
- WHITTAKER, R. H. EVOLUTION AND MEASUREMENT OF SPECIES DIVERSITY. **TAXON**, v. 21, n. 2–3, p. 213–251, maio 1972.
- WICKHAM, H. Package "ggplot2". **Create elegant data visualisations using the grammar of graphics**. v. 2, n. 1, p. 1-189, 2009.
- WILSON, B. et al. Changes in Marine Prokaryote Composition with Season and Depth Over an Arctic Polar Year. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, 13 abr. 2017.
- WUCHTER, C. et al. Archaeal nitrification in the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 33, p. 12317–12322, 15 ago. 2006.
- XU, L. et al. Complete genome sequence of *Erythrobacter seohaensis* SW-135T sheds light on the ecological role of the genus *Erythrobacter* for phosphorus cycle in the marine environment. **Marine Genomics**, v. 40, p. 21–24, jul. 2018.

YADEV, B. S.; CHAUHAN, P.; KUSHWAHA, S. Bioinformatics resources for microbial research in biological systems. In: **Microbial genomics in sustainable agroecosystems**. Springer, Singapore, p. 45-60. 2019.

YU, Z. et al. Bacterioplankton community shifts associated with epipelagic and mesopelagic waters in the Southern Ocean. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 12897, out. 2015.

ZHOU, Z. et al. Genome diversification in globally distributed novel marine Proteobacteria is linked to environmental adaptation. **The ISME Journal**, v. 14, n. 8, p. 2060–2077, ago. 2020.

APÊNDICES

Apêndice A – Dados gerais das amostras utilizadas nesse trabalho.

Apêndice B – Dados físico-químicos das amostras utilizadas nesse trabalho.

Apêndice A – Dados gerais das amostras utilizadas nesse trabalho. Quadro com a data, estação, transecto, profundidade de coleta (m), região, coordenadas geográficas, profundidade local (m) e massa da água de cada amostra da região pelágica da Bacia de Santos.

Identificação	Data da Coleta	Estação	Transecto	Profundidade da coleta	Região	Latitude	Longitude	Profundidade local	Massa d'água
SANAGU1_A5_250M	08/08/2019	A5	A	249	Oceânica	-27.22	-46.93	452	ACAS
SANAGU1_A6_250M	09/08/2019	A6	A	250	Oceânica	-27.35	-46.39	1600	ACAS
SANAGU1_A6_900M	09/08/2019	A6	A	900	Oceânica	-27.35	-46.39	1600	AIA
SANAGU1_A7_250M	12/08/2019	A7	A	250	Oceânica	-27.49	-45.85	2210	ACAS
SANAGU1_A7_900M	12/08/2019	A7	A	901	Oceânica	-27.49	-45.85	2210	AIA
SANAGU2_B6_250M	25/08/2019	B6	B	250	Oceânica	-26.56	-46.43	400	ACAS
SANAGU2_B7_250M	24/08/2019	B7	B	250	Oceânica	-26.83	-45.92	1300	ACAS
SANAGU2_B7_900M	24/08/2019	B7	B	900	Oceânica	-26.83	-45.92	1300	AIA
SANAGU2_B8_250M	23/08/2019	B8	B	250	Oceânica	-27.06	-45.47	2260	ACAS
SANAGU2_B8_900M	23/08/2019	B8	B	898	Oceânica	-27.06	-45.47	2260	AIA
SANAGU3_C6_250M	03/09/2019	C6	C	250	Oceânica	-26.03	-45.79	400	ACAS
SANAGU3_C7_250M	04/09/2019	C7	C	251	Oceânica	-26.3	-45.5	1380	ACAS
SANAGU3_C7_900M	04/09/2019	C7	C	900	Oceânica	-26.3	-45.5	1380	AIA
SANAGU3_C8_250M	05/09/2019	C8	C	249	Oceânica	-26.65	-45.1	2310	ACAS
SANAGU3_C8_900M	05/09/2019	C8	C	899	Oceânica	-26.65	-45.1	2310	AIA
SANAGU4_D6_250M	21/09/2019	D6	D	249	Oceânica	-25.64	-45.1	500	ACAS
SANAGU4_D7_250M	22/09/2019	D7	D	249	Oceânica	-25.95	-44.83	1900	ACAS
SANAGU4_D7_900M	22/09/2019	D7	D	894	Oceânica	-25.95	-44.83	1900	AIA
SANAGU4_D8_250M	23/09/2019	D8	D	248	Oceânica	-26.43	-44.42	2390	ACAS
SANAGU4_D8_900M	23/09/2019	D8	D	894	Oceânica	-26.43	-44.42	2390	AIA
SANAGU4_E4_250M	28/09/2019	E4	E	248	Oceânica	-24.81	-44.47	510	ACAS
SANAGU4_E5_250M	27/09/2019	E5	E	251	Oceânica	-25.26	-44.22	1870	ACAS

SANAGU4_E5_900M	27/09/2019	E5	E	892	Oceânica	-25.26	-44.22	1870	AIA
SANAGU4_E6_250M	26/09/2019	E6	E	248	Oceânica	-25.7	-43.97	2125	ACAS
SANAGU4_E6_900M	26/09/2019	E6	E	893	Oceânica	-25.7	-43.97	2125	AIA
SANAGU4_E7_250M	25/09/2019	E7	E	248	Oceânica	-26.15	-43.72	2250	ACAS
SANAGU4_E7_900M	25/09/2019	E7	E	892	Oceânica	-26.15	-43.72	2250	AIA
SANAGU4_E8_250M	24/09/2019	E8	E	250	Oceânica	-26.54	-43.51	2410	ACAS
SANAGU4_E8_900M	24/09/2019	E8	E	892	Oceânica	-26.54	-43.51	2410	AIA
SANAGU5_F4_250M	08/10/2019	F4	F	251	Oceânica	-24.29	-43.57	500	ACAS
SANAGU5_F5_250M	09/10/2019	F5	F	250	Oceânica	-24.74	-43.34	1760	ACAS
SANAGU5_F5_900M	09/10/2019	F5	F	900	Oceânica	-24.74	-43.34	1760	AIA
SANAGU5_F6_250M	10/10/2019	F6	F	251	Oceânica	-25.2	-43.1	2200	ACAS
SANAGU5_F7_250M	11/10/2019	F7	F	250	Oceânica	-25.73	-42.83	2200	ACAS
SANAGU5_F7_900M	11/10/2019	F7	F	900	Oceânica	-25.73	-42.83	2200	AIA
SANAGU6_F8_250M	22/10/2019	F8	F	246	Oceânica	-26.14	-42.62	2450	ACAS
SANAGU6_F8_900M	22/10/2019	F8	F	892	Oceânica	-26.14	-42.62	2450	AIA
SANAGU6_G4_250M	24/10/2019	G4	G	249	Oceânica	-23.84	-42.67	450	ACAS
SANAGU6_G5_250M	24/10/2019	G5	G	249	Oceânica	-24.29	-42.44	1550	ACAS
SANAGU6_G5_900M	24/10/2019	G5	G	889	Oceânica	-24.29	-42.44	1550	AIA
SANAGU6_G6_900M	23/10/2019	G6	G	892	Oceânica	-24.74	-42.21	2160	AIA
SANAGU6_G7_250M	21/10/2019	G7	G	248	Oceânica	-25.2	-41.98	2290	ACAS
SANAGU6_G7_900M	21/10/2019	G7	G	893	Oceânica	-25.2	-41.98	2290	AIA
SANAGU6_H4_250M	17/10/2019	H4	H	244	Oceânica	-23.8	-41.78	510	ACAS
SANAGU6_H5_250M	18/10/2019	H5	H	247	Oceânica	-24.24	-41.52	1920	ACAS
SANAGU6_H5_900M	18/10/2019	H5	H	888	Oceânica	-24.24	-41.52	1920	AIA
SANAGU6_H6_250M	18/10/2019	H6	H	250	Oceânica	-24.53	-41.35	2400	ACAS

SANAGU6_H6_900M	18/10/2019	H6	H	892	Oceânica	-24.53	-41.35	2400	AIA
-----------------	------------	----	---	-----	----------	--------	--------	------	-----

Apêndice B – Dados físico-químicos das amostras utilizadas nesse trabalho. Quadro com os dados físico-químicos das amostras da região pelágica da Baía de Santos: temperatura, salinidade, densidade, oxigênio dissolvido, nitrito, nitrato e fosfato.

Identificação	Estação	Transecto	Temperatura (°C)	Salinidade absoluta	Densidade (kg/m ³)	Oxigênio dissolvido (mg/L)	Nitrito (um)	Nitrato (um)	Fosfato (um)
SANAGU1_A5_250M	A5	A	12.6129	35.3560	26.6935	6.6650	0.01	13.34	0.91
SANAGU1_A6_250M	A6	A	16.0215	35.8433	26.3158	6.6345	0.00	5.46	0.42
SANAGU1_A6_900M	A6	A	4.3679	34.4776	27.3742	6.9583	0.00	31.51	2.08
SANAGU1_A7_250M	A7	A	16.6822	35.9870	26.2687	6.6674	0.01	4.20	0.37
SANAGU1_A7_900M	A7	A	4.6473	34.4919	27.3486	6.8561	0.01	33.97	2.12
SANAGU2_B6_250M	B6	B	13.7736	35.5252	26.5794	6.6732	0.06	9.98	0.49
SANAGU2_B7_250M	B7	B	16.5672	35.9391	26.2594	6.5829	0.04	4.16	0.22
SANAGU2_B7_900M	B7	B	4.4315	34.4891	27.3772	6.8161	0.02	30.65	1.95
SANAGU2_B8_250M	B8	B	17.1061	36.0276	26.1964	6.4769	0.06	4.61	0.26
SANAGU2_B8_900M	B8	B	5.0405	34.5209	27.3226	6.6078	0.04	32.46	0.96
SANAGU3_C6_250M	C6	C	13.6494	35.4964	26.5837	6.6136	0.01	9.29	0.61
SANAGU3_C7_250M	C7	C	15.3206	35.7451	26.4036	6.5902	0.01	14.68	0.98
SANAGU3_C7_900M	C7	C	4.4717	34.4981	27.3799	6.7219	0.00	32.89	1.95
SANAGU3_C8_250M	C8	C	16.1064	35.8907	26.3323	6.7435	0.01	4.67	0.41
SANAGU3_C8_900M	C8	C	4.3990	34.4733	27.3668	6.9531	0.00	30.06	1.93
SANAGU4_D6_250M	D6	D	13.0599	35.4011	26.6352	6.5591	0.08	10.60	0.83
SANAGU4_D7_250M	D7	D	15.4769	35.7310	26.3561	6.4664	0.02	7.39	0.44
SANAGU4_D7_900M	D7	D	4.4722	34.4662	27.3531	7.0251	0.02	34.20	0.87
SANAGU4_D8_250M	D8	D	17.2058	36.0366	26.1786	6.4016	0.05	3.75	0.35
SANAGU4_D8_900M	D8	D	4.6461	34.4662	27.3289	7.0956	0.02	29.35	1.99
SANAGU4_E4_250M	E4	E	13.9775	35.5275	26.5364	6.5316	0.07	9.07	0.68
SANAGU4_E5_250M	E5	E	16.6802	35.9328	26.2269	6.4743	0.00	34.68	2.32

SANAGU4_E5_900M	E5	E	4.5548	34.4988	27.3636	6.6822	0.04	32.68	0.82
SANAGU4_E6_250M	E6	E	17.6690	36.1094	26.1193	6.3513	0.03	4.25	0.34
SANAGU4_E6_900M	E6	E	4.8561	34.5087	27.3319	6.6622	0.00	33.67	0.89
SANAGU4_E7_250M	E7	E	17.3103	36.0511	26.1638	6.3435	0.06	4.30	0.39
SANAGU4_E7_900M	E7	E	5.0738	34.5072	27.3041	6.7756	0.05	31.78	2.17
SANAGU4_E8_250M	E8	E	17.2889	36.0419	26.1621	6.3912	0.00	3.79	0.26
SANAGU4_E8_900M	E8	E	4.9103	34.4991	27.3184	6.8180	0.01	30.05	0.96
SANAGU5_F4_250M	F4	F	14.6918	35.6310	26.4580	6.5912	0.01	7.18	0.58
SANAGU5_F5_250M	F5	F	15.4647	35.7538	26.3766	6.7710	0.01	5.45	0.46
SANAGU5_F5_900M	F5	F	4.3266	34.5069	27.3959	6.6395	0.01	31.14	2.18
SANAGU5_F6_250M	F6	F	14.9547	35.6580	26.4195	6.4699	0.02	7.96	0.64
SANAGU5_F7_250M	F7	F	16.1425	35.8621	26.3013	6.6061	0.01	4.84	0.43
SANAGU5_F7_900M	F7	F	4.6661	34.5061	27.3534	6.7078	0.02	26.53	1.85
SANAGU6_F8_250M	F8	F	16.6299	35.9232	26.2314	6.6519	0.02	4.99	0.45
SANAGU6_F8_900M	F8	F	4.9041	34.4972	27.3178	6.9269	0.01	31.09	1.98
SANAGU6_G4_250M	G4	G	13.9695	35.5452	26.5519	6.8315	0.02	7.09	0.57
SANAGU6_G5_250M	G5	G	13.2322	35.4237	26.6163	6.6883	0.01	13.38	0.96
SANAGU6_G5_900M	G5	G	4.2007	34.5161	27.4186	6.5921	0.01	37.94	2.62
SANAGU6_G6_900M	G6	G	4.8213	34.4959	27.3269	6.9171	0.00	33.33	2.29
SANAGU6_G7_250M	G7	G	17.2143	35.9954	26.1443	6.6147	0.05	4.23	0.43
SANAGU6_G7_900M	G7	G	4.6436	34.5103	27.3591	6.6794	0.05	35.97	2.51
SANAGU6_H4_250M	H4	H	13.6670	35.4826	26.5687	6.2851	0.12	12.45	0.96
SANAGU6_H5_250M	H5	H	17.7926	36.1208	26.0967	6.3296	0.03	5.08	0.47
SANAGU6_H5_900M	H5	H	4.6522	34.5460	27.3845	6.2332	0.02	44.26	3.00
SANAGU6_H6_250M	H6	H	17.7668	36.0853	26.0761	6.6924	0.03	2.86	0.30
SANAGU6_H6_900M	H6	H	4.5220	34.5154	27.3779	6.5767	0.01	37.79	2.56