

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

**DISTRIBUIÇÃO DE BACTÉRIAS EM SEDIMENTOS DA BACIA DE
CAMPOS, OCEANO ATLÂNTICO SUDOESTE**

KARLA DANILA COLOIA DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Orientador: RODOLFO PARANHOS, DR.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

ABRIL DE 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO/UFRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA-PPGE

CX.POSTAL 68.020 – ILHA DO FUNDÃO
CEP: 21941-590 – RIO DE JANEIRO – RJ – BRASIL
TEL./FAX: (21) 2290-3308 TEL.: (21) 2562-6320

Distribuição de bactérias em sedimentos da Bacia de Campos, Oceano Atlântico

KARLA DANILA COLOIA DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Ecologia).

Defendida em 19 de abril de 2010

APROVADA POR:

Prof. Rodolfo Paranhos, Dr.

Prof^ª. Helena Passeri Lavrado, Dr.

Prof. Carlos Rezende, Dr.

FICHA CATALOGRAFICA

CARVALHO, KARLA DANILA COLOIA

Distribuição de bactérias em sedimentos da Bacia de Campos, Oceano
Atlântico Sudoeste [Rio de Janeiro] 2010.

119 p. 29.7 cm (Instituto de Biologia/UFRJ, M.Sc., Ecologia, 2010)

Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, PPGE

1. Abundância Bacteriana, 2. Sedimentos, 3. Bacia de Campos

I. IB/UFRJ II. Título (série)

*Dedico esta dissertação à minha
filha Beatriz, a quem eu amo
incondicionalmente.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo fôlego da vida e por Sua perfeição, expressa em todas as coisas positivas do universo.

À minha mãe, Maria Tereza, por me ensinar a viver e por ser para mim o maior exemplo de força e dedicação que já existiu. Obrigada por me ensinar a amar os livros e por sempre me incentivar a estudar. Aos meus irmãos, Carla e Douglas, pelo carinho durante toda a minha vida. Obrigada por vocês estarem sempre presentes em minha vida, nos bons e maus momentos. Eu amo muito vocês.

À minha querida filha, Beatriz, presente de Deus na minha vida, pelo carinho incondicional, por sua alegria e simplicidade e por ter me ensinado a ser mãe. Você é o que tenho de mais precioso.

Ao meu esposo Marcel, grande amigo e companheiro de todas as horas, pelo carinho, companheirismo, paciência, dedicação e apoio. Agradeço pelo incentivo e confiança, por me compreender nos momentos de estresse e de ausência, e pelas valiosas sugestões durante a realização deste trabalho.

Aos meus sogros, Ernandio e Luzia, pelo acolhimento e carinho. Obrigada pela dedicação, assistência e apoio tão necessários neste último ano.

Ao meu orientador, Rodolfo Paranhos, por contribuir para a minha formação profissional. Obrigada pelo apoio, incentivo e por ter confiado em mim.

Aos Dr. Carlos Rezende e Dra Helena Passeri Lavrado por aceitarem fazer parte da banca examinadora. Também agradeço aos Dr. João José Leal e Dra. Helena Passeri Lavrado por participarem da banca do exame de qualificação e pela contribuição à versão final do primeiro capítulo desta dissertação.

Ao Departamento de Ecologia do Instituto de Biologia da UFRJ por minha aceitação no programa de Pós-Graduação. Agradeço em especial à Márcia e Sueli, secretárias da pós-graduação, pela atenção e ajuda dispensada.

Ao CENPES – PETROBRAS, pela oportunidade de participação no projeto “Caracterização Ambiental do Oceano Profundo da Bacia de Campos - Oceanprof” e pelo financiamento desta pesquisa. Em especial à Ana Paula Falcão, por disponibilizar os dados utilizados neste trabalho, e à Helena Passeri Lavrado, pela coordenação do projeto Oceanprof.

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Hidrobiologia do Departamento de Biologia Marinha da UFRJ: Ana Paula Reis, Bruna Faro, Leandro dos Santos Miranda e Vanessa Alves Lima Rocha, pela dedicação na coleta das amostras; a Camila Belem Pinto, Cristiane Borborema Chaché, Flávia Vasconcelos de Mello, Ingrid de Jesus Magdalena, Ingrid Farias Dantas, Jaqueline Valverde Soares e Luiza Paula da Silva, pelo auxílio nos testes metodológicos e na análise das amostras; Alessandra Silva Morilla Gonzalez, Anderson de Souza Cabral e Roseni Rocha Silva de Carvalho, pelo auxílio na parte escrita e revisão dos capítulos; Bruna Faro, por ceder gentilmente as fotos da coleta. Muito obrigada pela colaboração de vocês.

À querida amiga, Alessandra Silva Morilla Gonzalez, por esclarecer minhas inúmeras dúvidas, pelas longas conversas, pelos conselhos e horas de descontração.

Ao querido amigo Vinícius Peruzzi, por sua atenção e pelo grande auxílio nas análises estatísticas.

Às amigas, Maria José, Cristina Araújo e Luciana Muguét, pelos anos de amizade, pelo companheirismo, pelos desabafos e pelas conversas intermináveis.

Gostaria de agradecer também a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado. Vocês me ajudaram a conquistar uma etapa importante da minha vida. Muito obrigada.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo caracterizar os sedimentos da Bacia de Campos em relação à distribuição das bactérias heterotróficas, bem como sua relação com a profundidade e características físico-químicas dos sedimentos. A Bacia de Campos é considerada a maior reserva petrolífera do Brasil, sendo responsável por aproximadamente 84% da produção nacional de petróleo, está localizada no Oceano Atlântico Sudoeste e apresenta mais de 70% da sua área com profundidades superiores a 200 m. Para maior compreensão da dinâmica dos oceanos profundos foi realizado um amplo levantamento bibliográfico que resultou na descrição do estado da arte dos estudos com microbiologia de sedimentos profundos em todo o mundo. A partir das informações contidas na literatura foram destacados os principais métodos de estudo da microbiota do sedimento. Foi dada ênfase especial à análise de abundância bacteriana – métodos existentes, etapas de análise, necessidade de extração prévia das bactérias e limitações das técnicas. Dentre os métodos estudados foi avaliada em laboratório a eficiência de extração utilizando duas abordagens – pirofosfato de sódio e metanol. Como resultados da realização de testes metodológicos foi obtido um protocolo otimizado de extração bacteriana para análise por citometria em fluxo. A citometria em fluxo é comumente utilizada na análise de abundância bacteriana em amostras de água e foi utilizada neste trabalho para a análise de amostras de sedimento. Os sedimentos analisados foram coletados nos anos de 2002 e 2003 durante as campanhas oceanográficas do projeto de Caracterização Ambiental do Oceano Profundo da Bacia de Campos. Com base nas análises realizadas foi possível encontrar relação negativa entre a abundância bacteriana e o aumento da profundidade e não foi observada relação entre o número de bactérias e a concentração de matéria orgânica nos sedimentos da Bacia de Campos. A abundância bacteriana variou consideravelmente entre as diferentes épocas do ano em que foram realizadas as coletas, sugerindo que a distribuição dos microrganismos no sedimento da região estudada pode sofrer alterações sazonais. Atualmente, não existe qualquer registro de trabalhos publicados com microbiologia de sedimento da Bacia de Campos, neste sentido, é essencial que sejam desenvolvidos outros estudos visando uma maior compreensão da dinâmica microbiana nos sedimentos marinhos da região estudada.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the Campos Basin sediments regarding the distribution of heterotrophic bacteria and its relation to water depth and physical-chemical characteristics of sediments. The Campos Basin is the biggest oil reserve in Brazil, accounting for 84% of the national oil production. This basin is located in the Southwest Atlantic Ocean with depths exceeding 200 m in more than 70% of its area. For a better understanding of the deep-sea dynamics, an extensive literature review was performed resulting in an updated understanding of the worldwide studies involving deep-sea sediments microbiology. Thereafter, the main methods were highlighted and special emphasis was given to the analysis of bacterial abundance, existing methods, steps of the analysis, the need for prior bacteria extraction, and of techniques limitations. Among the studied methods, two approaches of extracting bacteria were tested in the laboratory for efficiency: 1) sodium pyrophosphate and 2) methanol. As a result, an optimized extraction protocol was made for bacterial abundance analysis by flow cytometry. The flow cytometry is commonly used in bacterial abundance analyses of water samples and in this work it was used for sediment samples analysis. The analyzed sediment samples were collected in 2002 and 2003 during the oceanographic cruise “Environmental Characterization of The Campos Basin Deep-Sea”. Based on the analyses performed, a negative relationship was found between bacterial abundance and the increase in depth. Moreover, there was no relationship between the bacterial number and organic matter concentration in sediments of the Campos Basin. Bacterial abundance varied considerably between different seasons of the year in which the samples were collected, suggesting that the distribution of the microorganisms in sediment of the studied area may change seasonally. Currently, there is no published work with sediment microbiology of the Campos Basin. Therefore, there is a need for studies aiming the microbial dynamics in marine sediments for further understandings of this area.

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	1
1. <i>INTRODUÇÃO GERAL.....</i>	2
Capítulo 1.....	4
2. <i>ESTADO DA ARTE.....</i>	5
2.1. AS PESQUISAS EM OCEANO PROFUNDO.....	5
2.2. ECOLOGIA MICROBIANA NOS SEDIMENTOS MARINHOS PROFUNDOS.....	10
2.3. PARÂMETROS MICROBIANOS COMUMENTE ANALISADOS NOS SEDIMENTOS.....	16
2.3.1. Atividade Microbiana.....	16
2.3.2. Biomassa.....	17
2.3.3. Abundância.....	19
2.4. CONCLUSÃO.....	33
Capítulo 2.....	35
3. <i>TESTES METODOLÓGICOS.....</i>	36
3.1. INTRODUÇÃO.....	36
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.2.1. Coleta das amostras.....	40
3.2.2. Método de Separação com Metanol.....	42
3.2.3. Método de Separação com Pirofosfato de Sódio.....	43
3.2.4. Determinação da Abundância por Citometria em Fluxo.....	47
3.2.5. Análises Estatísticas.....	48
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
3.3.1. Método do Metanol.....	49
3.3.2. Método do Pirofosfato.....	50
3.3.3. Comparação entre os Métodos – Metanol x Pirofosfato.....	57
3.4. CONCLUSÃO.....	60
Capítulo 3.....	61
4. <i>ABUNDÂNCIA BACTERIANA NOS SEDIMENTOS DA BACIA DE CAMPOS ...</i>	62
4.1. INTRODUÇÃO.....	62
4.2. ÁREA DE ESTUDO.....	64
4.3. HIPÓTESES.....	64
4.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
4.4.1. Coleta das Amostras.....	65
4.4.2. Análise em Laboratório.....	69
4.4.3. Determinação da Abundância por Citometria em Fluxo.....	71
4.4.4. Análises Estatísticas.....	72
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.5.1. Dados de Abundância Bacteriana.....	73
4.5.2. Correlação com Parâmetros abióticos do sedimento .. Erro! Indicador não definido.	
4.6. CONCLUSÃO.....	90

Conclusão Final.....	91
5. <i>CONCLUSÃO FINAL</i>	92
Bibliografia.....	94
6. <i>BILBIOGRAFIA</i>	95

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. Principais fatores de conversão de abundância bacteriana e volume celular em biomassa de carbono.	18
Tabela II. Médias de Abundância Bacteriana em amostras de sedimento de diversos locais do mundo.	27
Tabela II. Continuação.	28
Tabela III. Dados de abundância bacteriana obtidos da extração com metanol.	49
Tabela IV. Agrupamento dos dados de abundância bacteriana obtidos no teste da potência do sonicador. Agrupamento realizado de acordo com o Teste de Tukey.	52
Tabela V. Agrupamento dos dados de abundância bacteriana obtidos no teste do tempo de espera após centrifugação das amostras. Agrupamento realizado de acordo com o Teste de Tukey.	55
Tabela VI. Dados de abundância bacteriana obtidos da extração com pirofosfato.	56
Tabela VII. Dados de abundância bacteriana obtidos da extração com metanol e pirofosfato.	58
Tabela VIII. Área, profundidade da isóbata e coordenadas (DATUM SAD – 69) das estações de coleta visitadas nas campanhas de verão (2002) e inverno (2003).	66
Tabela IX. Dados de abundância bacteriana, valores médios e coeficientes de variação (por profundidade de coleta) obtidos na campanha de verão realizada em novembro de 2002.	74
Tabela X. Dados de abundância bacteriana, valores médios e coeficientes de variação (por profundidade de coleta) obtidos na campanha de inverno realizada em junho de 2003.	77
Tabela XI. Valores médios de abundância bacteriana obtidos nas campanhas de verão e inverno.	78
Tabela XII. Valores de “p” para Comparação Múltipla entre os dados de abundância bacteriana obtidos nas diferentes Áreas/Campanhas (Kruskal-Wallis; H=18,43). Em vermelho $p < 0,05$	81
Tabela XIII. Valores de “p” para Comparação Múltipla entre os dados de abundância bacteriana obtidos nas diferentes Profundidades (Kruskal-Wallis; H=18,43). Em vermelho $p < 0,05$	82
Tabela XIV. Médias de Abundância Bacteriana em amostras de sedimento de diversos locais do mundo.	84
Tabela XIV. Continuação.	85

Tabela XV. Coeficiente de correlação (r_s) entre os dados de abundância bacteriana e os parâmetros físico-químicos analisados no sedimento (Correlação de Spearman, valores em vermelho $p < 0,05$). 87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de artigos publicados entre 1990 e setembro de 2009 presentes na base de dados da <i>Web of Science</i> . A busca utilizou a combinação das palavras-chave “ <i>bacteria</i> ”, “ <i>sediment</i> ” e “ <i>ocean</i> ”.....	8
Figura 2. Resumo esquemático do processamento das amostras em laboratório.....	40
Figura 3. Esquema do procedimento de fixação das amostras.....	41
Figura 4. Esquema do procedimento de extração bacteriana utilizando metanol.	42
Figura 5. Esquema da parte inicial do procedimento de extração bacteriana utilizando pirofosfato de sódio.....	44
Figura 6. Esquema do procedimento completo de extração bacteriana utilizando pirofosfato de sódio.....	47
Figura 7. Resultados obtidos após extração com metanol. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^9$ bactérias.g ⁻¹ PU) das amostras analisadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.	50
Figura 8. Perfis citométricos obtidos após extração com metanol para cada amostra de sedimento testada. Em amarelo podem ser observadas as esferas fluorescentes utilizadas para aferição, em preto o ruído e em verde estão as células procaríóticas enumeradas.	50
Figura 9. Resultados do teste da potência do sonicador. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^9$ bactérias.g ⁻¹ PU) para as potências testadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.	51
Figura 10. Resultados do teste da temperatura do banho de incubação das amostras. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^9$ bactérias.g ⁻¹ PU) para as condições testadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.	52
Figura 11. Resultados do teste do tempo de incubação das amostras. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^9$ bactérias.g ⁻¹ PU) para os tempos testados. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.	53
Figura 12. Resultados do teste do tempo de espera após a centrifugação das amostras. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^9$ bactérias.g ⁻¹ PU) para os tempos testados. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.....	54
Figura 13. Resultados obtidos após extração com pirofosfato de sódio. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana	

($\times 10^9$ bactérias.g⁻¹ PU) das amostras analisadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média. 56

Figura 14. Perfis citométricos obtidos após extração com pirofosfato para cada amostra de sedimento testada. Em amarelo podem ser observadas as esferas fluorescentes utilizadas para aferição, em preto o ruído e em verde estão as células procaríóticas enumeradas. 57

Figura 15. Resultados obtidos após extração com pirofosfato de sódio (PIRO) e metanol (MOH) para as duas amostras analisadas. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^9$ bactérias.g⁻¹). As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média. 58

Figura 16. Mapa da Bacia de Campos com as estações de coleta (Fonte: CENPES/PETROBRAS). 65

Figura 17. Coletor de fundo do tipo box-corer utilizado na coleta das amostras. 67

Figura 18. Retirada da água de interface com o sedimento. 68

Figura 19. Amostra de sedimento após inserção das colméias. 68

Figura 20. Esquema do procedimento de fixação das amostras. 69

Figura 21. Esquema do procedimento de extração bacteriana com pirofosfato de sódio. 70

Figura 22. Resultados da campanha de verão obtidos para as áreas Norte e Sul. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^7$ bactérias.g⁻¹) das amostras analisadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média. 73

Figura 23. Resultados da campanha de verão obtidos para as profundidades de coleta. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^7$ bactérias.g⁻¹) das amostras analisadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média. 75

Figura 24. Resultados da campanha de inverno obtidos para as áreas Norte e Sul. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^7$ bactérias.g⁻¹) das amostras analisadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média. 76

Figura 25. Resultados da campanha de inverno obtidos para as profundidades de coleta. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^7$ bactérias.g⁻¹) das amostras analisadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média. 76

Figura 26. Resultados das campanhas de verão e inverno. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^7$ bactérias.g⁻¹) de todas amostras analisadas por campanha. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média. 79

Figura 27. Resultados obtidos para as áreas norte e sul. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^7$ bactérias.g⁻¹) de todas amostras analisadas nas duas campanhas (verão e inverno). As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média. 80

Figura 28. Resultados das campanhas de verão e inverno obtidos para as áreas norte e sul. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^7$ bactérias.g⁻¹) de todas amostras analisadas (por área em cada campanha). As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média. 81

Figura 29. Resultados obtidos para as profundidades de coleta. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^7$ bactérias.g⁻¹) de todas amostras analisadas nas duas campanhas (verão e inverno). As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média. 82

Introdução Geral

1. INTRODUÇÃO GERAL

A presente dissertação buscou avaliar a distribuição das bactérias nos sedimentos da Bacia de Campos na região compreendida entre 21°50' e 22°50'S, e 39°30' e 40°30'W. A Bacia de Campos está localizada na margem sudoeste do Oceano Atlântico Sul e ocupa uma porção da margem continental do Brasil entre 20,5°S (cidade de Vitória) e 24°S (Arraial do Cabo) em uma área de mais de 100 mil quilômetros quadrados (VIANA *et al.*, 1998). Considerada a maior reserva petrolífera do Brasil, a Bacia de Campos atualmente é responsável por aproximadamente 84% da produção nacional de petróleo, com uma produção diária de cerca de 1,49 milhões de barris de óleo e 22 milhões de metros cúbicos de gás (PETROBRAS, 2001, 2010).

No capítulo 1 foram discutidos aspectos relevantes da metodologia de análise de abundância bacteriana em amostras de sedimento. Com este propósito uma ampla bibliografia foi consultada e o aspecto histórico do estudo dos microrganismos em sedimentos marinhos foi avaliado. Além da revisão bibliográfica a que se propôs o capítulo, foram abordados os princípios, métodos e problemas da análise de abundância bacteriana em sedimentos marinhos. Já no capítulo 2 foram descritos os testes metodológicos realizados com a finalidade de otimizar o procedimento de análise de abundância nas amostras de sedimento. Foram comparados dois métodos de separação e os métodos foram avaliados quanto à eficiência de separação, expressa pela abundância bacteriana nas amostras testadas. Esta etapa de verificação metodológica foi de grande importância, pois garantiu a confiabilidade dos dados de abundância das amostras da Bacia de Campos, analisadas posteriormente aos testes. As discussões apresentadas neste capítulo representam uma grande contribuição para as pesquisas de ecologia microbiana em sedimentos, em função de apresentar uma otimização dos protocolos existentes para a extração de células procarióticas deste tipo de matriz.

Finalizando o presente estudo, foi analisada, no capítulo 3, a distribuição das bactérias nos sedimentos da Bacia de Campos. Além disso, procurou-se correlacionar a distribuição com as características ambientais e com os parâmetros abióticos analisados nestes sedimentos. Neste capítulo foram descritos os procedimentos de coleta e análise e foram discutidos, à luz da literatura, os resultados de abundância bacteriana obtidos nas amostras coletadas. Este trabalho faz parte do projeto de Caracterização Ambiental do Oceano Profundo da Bacia de Campos (OCEANPROF), sendo o primeiro estudo a fornecer dados de abundância bacteriana na Bacia de Campos. O projeto OCEANPROF

é um projeto interdisciplinar, que envolveu pesquisadores da UFRJ, UERJ, PUC, UENF, USP e INPE, financiado pelo CENPES-PETROBRAS. Fizeram parte deste projeto quatro operações ou campanhas: operação Roncador, realizada em outubro de 2001, operação ALBACAR, em maio de 2002, operação OCEANPROF I, em novembro de 2002, e operação OCEANPROF II, em junho de 2003. No presente estudo foram apresentados apenas os dados obtidos nas operações OCEANPROF I e OCEANPROF II.

Capítulo 1

2. ESTADO DA ARTE

2.1. AS PESQUISAS EM OCEANO PROFUNDO

Mais de 97% da água na biosfera se encontra nos oceanos, que cobrem a maior parte da superfície da Terra. Cerca de 70% da superfície da Terra é marinha (PARKES *et al.*, 1994) e aproximadamente 65% corresponde a áreas com profundidade acima de 200m (GAGE & TYLER, 1991). As regiões oceânicas podem ser divididas com base nas principais feições fisiográficas em plataforma continental, talude continental e planície abissal. A região de plataforma apresenta um declive suave até profundidades de cerca de 200 m e é continuada pelo talude continental, que apresenta declive acentuado até cerca de 4 km de profundidade, onde encontra a planície abissal. As planícies abissais são regiões relativamente planas, apresentam profundidades de 4-6 km e cobrem extensas áreas do fundo oceânico (GAGE & TYLER, 1991). Em alguns locais apresentam elevações gigantescas que podem formar cordilheiras ou atingir a superfície e formar ilhas, como as ilhas de Trindade e o Arquipélago de São Pedro e São Paulo, localizados no Oceano Atlântico Sudoeste. Nestas planícies, podem ainda surgir depressões que apresentam grande profundidade, denominadas fossas (NYBAKKEN & BERTINESS, 2004), cujo máximo é o local conhecido como *Challenger Deep*, a cerca de 10.900 m de profundidade, na Fossa das Marianas (GOODAY, *et al.*, 2010).

Compreendendo a maior parte das áreas oceânicas, a região profunda dos oceanos tem início na quebra da plataforma, a cerca de 200 m de profundidade (THISTLE, 2003). Os sedimentos de regiões profundas ainda são minimamente conhecidos e explorados devido à dificuldade de amostragem e observação *in situ* de áreas tão remotas (NYBAKKEN & BERTINESS, 2004). O advento dos submersíveis e dos veículos de operação remota (ROVs) tornou possível a observação direta da região profunda dos oceanos. Alguns destes veículos podem realizar medidas físicas e batimétricas, coleta de amostras, manipulações de ferramentas, entre outras atividades. Entretanto, uma proporção relativamente pequena da região oceânica tem sido visitada por estes veículos devido ao seu elevado custo e quantidade reduzida em todo o mundo. O método mais comumente utilizado nos estudos de mar profundo consiste na coleta de amostras de sedimento utilizando amostradores de fundo não consolidado. Entre estes, os mais utilizados estão *box corers e multi-corers* (exemplo de utilização destes equipamentos – BOETIUS *et al.*, 1996, WIT *et al.*, 1997, DANOVARO *et al.*, 1998,

QUÉRIC *et al.*, 2004, RAGHUKUMAR *et al.*, 2006). Estes equipamentos coletam a camada superior do fundo oceânico (usualmente 0-20 cm) e trazem à superfície uma fatia do sedimento superficial com seus organismos associados e idealmente com uma pequena quantidade de água sobrejacente.

Além da amostragem superficial, é possível recuperar sedimentos localizados muitos metros abaixo do assoalho oceânico, conforme realizado por PARKES *et al.*, (1994) e ROUSSEL *et al.* (2008), que apresentaram resultados de amostras coletadas a 842 m e 1.626 m abaixo dos sedimentos de superfície, respectivamente. Particularmente, para o propósito de coleta em subsuperfície são utilizados equipamentos e navios de sondagem e perfuração. Segundo SCHIERMEIER (2009), desde que se iniciou a pesquisa do fundo oceânico abaixo do assoalho marinho, na década de 1960, operações de perfuração oceânica (*ocean drilling*) disponibilizaram, para pesquisa, sedimentos e núcleos de rocha extraídos do fundo do mar que forneceram valiosas informações, desde a formação das placas tectônicas até a história do clima da Terra. Entretanto, parece ser consensual que ainda há muito a ser descoberto. Ao longo da história da pesquisa em oceano profundo, diversos trabalhos foram realizados a partir de programas de perfuração oceânica, etapa fundamental que precede a exploração e produção de petróleo e derivados (PARKES *et al.*, 1994 e 2000; WELLSBURY *et al.*, 1997 e 2002; D'HONDT *et al.*, 2002; SCHIPPERS *et al.*, 2005; SCHIPPERS & NERETIN, 2006; LIPP *et al.*, 2008).

O presente trabalho objetiva uma revisão sobre a ecologia microbiana nos sedimentos marinhos, no contexto do conhecimento e compreensão dos processos biológicos nos ecossistemas de mar profundo, ressaltando os aspectos já bem definidos e discutindo tópicos ainda não consolidados na literatura. Foram abordados parâmetros comumente utilizados em estudos ambientais, tais como abundância, biomassa e atividade microbiana, com ênfase especial na análise de abundância bacteriana em amostras de sedimentos.

Os sedimentos marinhos superficiais se configuram como importante matriz biológica e têm grande importância na ecologia do sistema de mar profundo. Processos que ocorrem neste compartimento, como a degradação de matéria orgânica, afetam profundamente, ao longo do tempo geológico, a composição química do oceano e da atmosfera. As bactérias de sedimentos profundos constituem a maior fração global das bactérias bentônicas totais e desempenham um importante papel na maior parte dos ciclos biogeoquímicos (TURLEY & DIXON, 2002). O ciclo global do carbono é, sem

dúvida, o mais afetado pela ação dos microrganismos (REX *et al.*, 2006), que também influenciam os ciclos do fósforo, nitrogênio e enxofre. A decomposição de matéria orgânica provavelmente resulta na formação de um complexo húmus marinho e na liberação de compostos de fosfato, sulfato ou sulfeto e de nitrogênio (ZOBELL & MORITA, 1959). É importante destacar que os sedimentos marinhos são extremamente dinâmicos e interagem constantemente com a coluna d'água sobrejacente.

Os sedimentos de regiões profundas, distantes do continente, recebem a maior parte da matéria orgânica que possuem das águas rasas sobrejacentes (ROWE & DEMING, 1985; REX *et al.*, 2006), onde ocorre intensa atividade fotossintética. Esta matéria orgânica alcança o mar profundo como uma chuva lenta de detritos orgânicos particulados ou como partículas um pouco maiores, tais como pelotas fecais, material esquelético exterior descartado por crustáceos, ou carcaças. Embora o fluxo ocorra em níveis extremamente baixos, devido ao consumo e à degradação microbiana sofrida pelas partículas orgânicas durante o trajeto entre a superfície e o assoalho oceânico, a quantidade que chega ao fundo ainda pode suportar toda a vida existente ali (ROWE & DEMING, 1985; GAGE, 2003). Nos sedimentos de superfície, o material orgânico que chega é primariamente utilizado pelas bactérias, onde o termo “bactérias” se refere a células procarióticas detectáveis por corantes específicos de DNA (DEMING & CARPENTER, 2008), que utilizam detritos orgânicos para produção de biomassa e respiração (DANOVARO *et al.*, 2008). As bactérias transformam o material refratário em formas mais lábeis antes da sua utilização pelos depositívoros. O material orgânico não assimilado rapidamente pela fauna depositívora na interface água-sedimento se torna substrato que será colonizado pelas bactérias do sedimento. Deste modo ocorre o aumento do valor nutricional da matéria orgânica refratária devido à sua conversão em biomassa bacteriana, ou pelo processo de degradação do detrito complexo em formas mais simples, compostos mais facilmente assimiláveis. Em ambos os casos, as bactérias regulam este recurso alimentar para os depositívoros de acordo com a sua taxa de transformação (RICHARDSON & YOUNG, 1987).

Devido à sua importância e complexidade, os sedimentos marinhos e sua microbiota associada têm sido objeto de inúmeros estudos ao longo dos últimos anos. Estes estudos aumentaram consideravelmente nas últimas duas décadas, segundo dados da base de artigos *Web of Science*[®] (Figura 1). Numa combinação dos termos “bacteria”, “sediment” e “ocean”, foram listados 380 trabalhos publicados entre os anos de 1976 e setembro de 2009, dos quais 379 estão entre os anos de 1990 e 2009. A

tendência de aumento no número de trabalhos abordando as bactérias de sedimentos oceânicos pode ser observada pelas médias de publicações na década de 1990, que é de 12 artigos por ano, enquanto no período compreendido entre 2000 e 2009 a média anual é maior que o dobro da década anterior, 26 artigos.

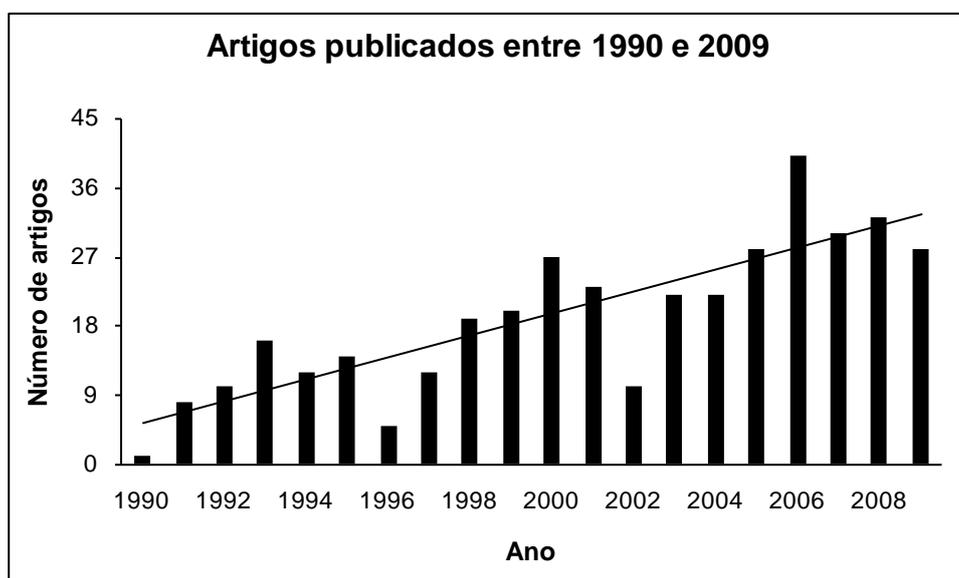


Figura 1. Número de artigos publicados entre 1990 e setembro de 2009 presentes na base de dados da *Web of Science*. A busca utilizou a combinação das palavras-chave “*bacteria*”, “*sediment*” e “*ocean*”.

Apesar da grande quantidade de trabalhos publicados recentemente sobre amostras de sedimento oceânico, o estudo da microbiota de sedimentos marinhos, bem como as expedições de pesquisa em águas profundas, tem mais de meio século de história. ZOBELL & MORITA (1959) publicaram observações realizadas na Expedição Galathea em 1951 e demonstraram pela primeira vez a ocorrência de bactérias vivas em algumas das partes mais profundas do oceano (Fossa das Filipinas – 10 km de profundidade). Antes desta data, 5.942 m era a maior profundidade em que haviam sido encontradas bactérias (ZOBELL & MORITA, 1959). Muitos microbiologistas questionaram se as bactérias poderiam existir nestes abismos oceânicos, no entanto, os autores comprovaram que as bactérias encontradas eram de fato originárias dos sedimentos profundos coletados mostrando que estas bactérias tinham habilidade para crescer em um meio com nutrientes a pressões hidrostáticas que eram aproximadamente isobáricas com a profundidade da qual elas foram retiradas (10 km). ZOBELL & MORITA (1959) referenciaram diversas publicações das décadas de 1930 e 1940, sugerindo relativa frequência na realização de pesquisas oceanográficas na época.

Claude ZoBell, considerado o pai da microbiologia marinha, teve um papel fundamental no estudo da dinâmica microbiana, sendo seus artigos citados até os dias atuais em trabalhos publicados por diversos autores (p. ex. JANNASCH & JONES, 1959; PAUL & MORITA, 1971; WATSON *et al.*, 1977; MEYER-REIL *et al.*, 1978; DEMING & COLWELL, 1982; DEFLAUN & MAYER, 1983; ROWE & DEMING, 1985; BOETIUS *et al.*, 1996; MASCARELLI, 2009).

2.2. ECOLOGIA MICROBIANA NOS SEDIMENTOS MARINHOS PROFUNDOS

Sedimentos profundos são geralmente ambientes com limitação de recursos orgânicos, cuja disponibilidade afeta a abundância e a distribuição dos organismos bentônicos. Estes recursos são provenientes da zona fótica ou trazidos por movimentos de massas d'água, atingindo, por fim, a superfície do sedimento (DANOVARO *et al.*, 1999; GAGE, 2003; REX *et al.*, 2006). Este panorama difere da realidade de ambientes marinhos costeiros, rios e lagos, onde a entrada de material orgânico alóctone fornece substratos orgânicos adicionais, possibilitando maior produtividade nestes ecossistemas (BOTT & KAPLAN, 1990). Exceções ao modelo oceânico são os locais quimiossintéticos, tais como as fontes hidrotermais e exsudações frias (*cold seeps*) (REX *et al.* 2006). Considerados verdadeiros 'oásis' estes ambientes abrigam concentrações de biomassa muitas ordens de grandeza acima da normalmente observada para regiões profundas (GAGE & TYLER, 1991). Em escalas locais, o fluxo de carbono ao fundo oceânico e sua utilização pelos organismos bentônicos podem ser estimados diretamente por meio da implantação de armadilhas de sedimentos (*sediment traps*) e pela determinação do consumo de oxigênio pela comunidade do sedimento (SMITH *et al.*, 2001). Atualmente, existem poucas medidas deste tipo para fornecer uma quantificação razoável da disponibilidade de alimento em grandes escalas geográficas, medidas estas essenciais para a compreensão do ciclo global do carbono (REX *et al.*, 2006).

A atividade microbiana nos sedimentos de bacias oceânicas profundas é restrita em muitos sentidos. Limitação de recursos alimentares, baixas temperaturas e alta pressão hidrostática levam a baixas densidades populacionais e lentas taxas de renovação de nutrientes, exigindo estratégias fisiológicas específicas para sobrevivência e crescimento sob tais condições (BOLLIGER *et al.*, 1991). Mesmo assim, o perfil de distribuição em função da profundidade das células bacterianas em divisão e já divididas é equivalente a uma porcentagem constante ($\cong 4,8\%$) da população total (PARKES *et al.*, 1994). A presença de células em divisão indica que uma proporção da população bacteriana total é ativa e viável, visto que o número de células em divisão se correlacionou com a medida independente de produtividade bacteriana (baseada na incorporação de H³-timidina) em sedimentos profundos. Tal correlação, associado à presença de bactérias cultiváveis, ao rápido crescimento de bactérias em meios de

enriquecimento e à presença de DNA de alto peso molecular, indicativo de bactérias intactas, sustentam as conclusões de PARKES *et al.*, (1994).

Embora não haja dúvidas de que existem bactérias no mar profundo e que alguma proporção delas pode metabolizar e crescer *in situ* (LOCHTE & TURLEY, 1988), embora sob extrema limitação no suprimento de energia orgânica, a origem das bactérias de mar profundo foi há algumas décadas uma questão divergente na literatura. WIRSEN & JANNASCH (1975) defendiam que a maioria das bactérias presentes no sedimento e na água de mar profundo era originada em águas mais rasas, visto que sua resposta ao aumento da pressão hidrostática era similar à das bactérias de águas rasas. Por exemplo, pressões de 200 a 500 atmosferas reduzem taxas metabólicas bacterianas a algumas ordens de grandeza abaixo da que ocorria em pressão atmosférica normal. Entretanto, segundo ROWE & DEMING (1985), existiria a predominância de microrganismos que exibem barotolerância ou ainda taxas metabólicas que são melhores sob pressões extremas do que a pressões atmosféricas. Nos dias atuais considera-se a existência de uma microbiota barofílica distinta, que rapidamente degrada as partículas que chegam ao sedimento, convivendo com uma fração desconhecida de bactérias originadas em águas superficiais que são transportadas ao fundo do mar junto com fitodetritos que precipitam ao longo da coluna d'água (GAGE, 2003; REX *et al.*, 2006). No sedimento profundo estas bactérias oriundas da superfície apresentam taxas metabólicas reduzidas quando comparadas à microbiota típica de profundidade (GAGE, 2003).

Historicamente, a abundância de vida sobre o fundo do mar foi imaginada como sendo uma função da concentração de matéria orgânica nos sedimentos. Entretanto, isto não tem sido demonstrado para as bactérias em sedimentos profundos. Em tese, a quantidade de matéria orgânica presente no sedimento deveria fornecer uma aproximação razoável da quantidade de substrato potencial aos microrganismos depositívoros. Porém, quando se relaciona o número de organismos por m² com o carbono orgânico presente no sedimento não é observado nenhum padrão consistente (ROWE *et al.*, 1991). A matéria orgânica em sedimentos de mar profundo é mais difícil de ser oxidada que aquela de sedimentos de águas rasas. Isto levou à noção atualmente aceita de que a matéria orgânica em sedimentos de mar profundo é altamente refratária e não está facilmente disponível aos organismos (ROWE *et al.*, 1991). Desta forma, a distribuição dos microrganismos no sedimento parece estar mais associada ao fluxo de carbono orgânico ao sedimento e, conseqüentemente, à quantidade de material orgânico

recém sedimentado, que à concentração de carbono orgânico total presente no sedimento (ROWE *et al.*, 2008). Segundo DANOVARO & SERRESI (2000), a regulação da população bacteriana de sedimentos profundos poderia ocorrer por mecanismos do tipo *bottom-up* (pelo fluxo de carbono orgânico da camada fótica e pela disponibilidade da matéria orgânica) e/ou *top-down* (pelo consumo das células bacterianas por nanoflagelados, por exemplo, e possivelmente por infecção viral).

Atualmente os vírus são considerados importantes componentes de comunidades microbianas aquáticas (COLOMBET *et al.*, 2007; BRUSSAARD *et al.*, 2008; AUGUET *et al.*, 2009) e seu papel na ecologia de sedimentos marinhos passou a ser estudado amplamente a partir de 1990 (PAUL *et al.*, 1993; MARANGER & BIRD 1996; DRAKE *et al.*, 1998). Contagens diretas indicam que esta é a forma de vida mais abundante nos oceanos (PAUL *et al.*, 1993; DANOVARO *et al.*, 2008), superando – em 2 a 5 vezes – a abundância de bactérias nos sedimentos (DANOVARO & SERRESI, 2000). Os vírus podem ser responsáveis por cerca de 10 a 30% da mortalidade bacteriana nos ecossistemas aquáticos, podendo chegar, em alguns casos, até 72%. Este processo tem efeito cascata sobre a ciclagem biogeoquímica da matéria orgânica nos ambientes marinhos devido à capacidade dos vírus em infectar as bactérias. Este processo é reconhecido como um dos mecanismos mais relevantes de liberação de matéria orgânica dissolvida, interferindo na reciclagem dos nutrientes e nas vias de utilização de carbono orgânico pelas bactérias (DANOVARO & SERRESI, 2000) e demais organismos do sedimento.

Além dos vírus, os consumidores diretos das bactérias são responsáveis pelo controle da abundância bacteriana observada nos sedimentos marinhos. Deste modo, a população é somente uma expressão do balanço dinâmico entre a taxa de reprodução e a taxa de morte ou consumo. Observações em laboratório realizadas por ZOBELL & MORITA (1959) indicaram que bactérias de mar profundo reproduzem (por fissão transversal) uma vez a cada 2 a 20 horas em meio nutriente incubado a 1000 atm e 3°C; esta taxa deve ser um pouco mais lenta na água do mar ou nos sedimentos profundos, aos quais nenhuma fonte de carbono tenha sido adicionada. Além disso, estas bactérias podem estar dormentes *in situ*, mas na interface água-sedimento é muito provável que elas estejam em processo de reprodução.

A geração bacteriana constante pode contribuir substancialmente para a nutrição de animais bentônicos (BOTT & KAPLAN, 1990). As bactérias consistem em sua maior parte de proteínas e lipídios facilmente digeríveis. Muitas são ricas em vitaminas

e outros fatores de crescimento acessórios que podem ser benéficos à fauna bentônica distantes de produtos de atividade fotossintética (ZOBELL & MORITA, 1959). No estudo da microbiota de mar profundo não se pode negligenciar a interação da mesma com grupos de organismos de diferentes tamanhos presentes no sedimento (microfauna, meiofauna, macrofauna e megafauna). Alguns autores ressaltaram a importância da meiofauna como uma ligação entre as bactérias e a macrofauna (ROWE *et al.*, 1991). Nematóides, foraminíferos e copépodos são considerados os principais representantes da meiofauna (HERRING, 2002; LESEN, 2005; PASCAL *et al.*, 2008; ROWE *et al.*, 2008). A composição da macrofauna pode variar consideravelmente com a profundidade, entretanto, segundo alguns autores (GAGE & TYLER, 1991; HERRING, 2002), este grupo de organismos é dominado, principalmente, por poliquetas e crustáceos peracáridos. A microfauna do sedimento também está envolvida com o controle da abundância bacteriana. Esta classe de tamanho inclui protozoários ciliados e flagelados (WIELTSCHNIG *et al.*, 2008; PASCAL *et al.*, 2009) que são conhecidos por contribuir consideravelmente para a regulação da população bacteriana. Entre os membros dominantes de muitas comunidades bentônicas profundas podemos ressaltar as holotúrias depositívoras, representantes da megafauna, que consomem o material depositado no fundo oceânico de modo intermitente, misturando e revirando o sedimento (DEMING & COLWELL, 1982; HERRING, 2002).

Além de oxidarem a maioria dos tipos de matéria orgânica com o consumo de oxigênio e contribuírem para a nutrição da fauna bentônica, as bactérias podem afetar a composição química não-conservativa do fundo oceânico a partir de diferentes metabolismos (ZOBELL & MORITA, 1959). Bactérias amonificantes liberam amônia de substâncias nitrogenadas e bactérias nitrificantes podem oxidar a amônia a nitrito e nitrato. Na ausência de oxigênio livre, bactérias redutoras de sulfato podem produzir sulfeto de hidrogênio, que, se difundido nas águas oxigenadas, pode ser oxidado com a formação de sulfato ou enxofre (ZOBELL & MORITA, 1959). O suprimento de oxigênio aos sedimentos de superfície permite a mineralização aeróbica continuada da matéria orgânica nos primeiros 10 cm do fundo oceânico. Como o oxigênio é esgotado em estratos profundos, os processos que empregam outros aceptores de elétrons, tais como NO_3^- , $\{\text{MnOx}\}$, $\{\text{FeOx}\}$ e SO_4^{2-} , tornam-se dominantes desde que ainda existam substratos oxidáveis disponíveis nestas profundidades (BOLLIGER *et al.*, 1991). A disponibilidade de oxigênio no sedimento depende, entre outros fatores, da penetração

de oxigênio, que pode variar de milímetros até cerca de 10 cm (CAI & SAYLES, 1996; MOURET *et al.*, 2009).

Com respeito à utilização do carbono orgânico que alcança o fundo do mar por parte dos microrganismos, a maior parte deste material é degradada na camada superior, até cerca de 8 cm de profundidade (BOLLIGER *et al.*, 1991). Esta também é a profundidade na qual se encontra 85% da biomassa bacteriana total viável presente nos primeiros 20 cm do sedimento (ROWE & DEMING, 1985). Do *input* total de carbono orgânico, apenas 6,5% são enterrados abaixo da camada de mistura do sedimento, dos outros 93% utilizados, 90% são consumidos pelos organismos na interface água-sedimento, e apenas 10% abaixo dela. Dos 93% de carbono consumido pela biota, pelo menos 90% são convertidos a CO₂ (ROWE E DEMING, 1985). De acordo com estes autores, a pequena quantidade de produção secundária que ocorre, caso o sistema esteja em estado de equilíbrio, deve ser exportada por mecanismos envolvidos na predação por organismos pelágicos, perda de ovos ou juvenis planctônicos ou migrações ontogenéticas.

Grande homogeneidade na distribuição da matéria orgânica foi descrita a partir de 15 cm de profundidade de sedimentos abissais do Atlântico Norte (ROWE & DEMING, 1985). Segundo estes autores, a falta de um gradiente de carbono orgânico de qualquer significado abaixo dos 15 primeiros centímetros implicaria que a remineralização em maiores profundidades tenha cessado. Esta opinião contrasta com os resultados de PARKES *et al.* (1994), que encontraram bactérias viáveis a mais de 500 m abaixo do sedimento de superfície e consideraram esta presença como uma indicação de que a matéria orgânica sedimentar, incluindo fósseis moleculares, deve ser submetida a contínuas modificações bacterianas mesmo após a sedimentação. Porém deve ser considerado que as taxas metabólicas nestas profundidades são menores que as observadas nos sedimentos de superfície (PARKES *et al.*, 1994)

Estudos de biomassa disponível (*standing stock*) nos sedimentos marinhos representam uma consequência de médio prazo do *input* de energia que está positivamente correlacionado com o fluxo de carbono orgânico particulado (ROWE *et al.*, 1991; DANOVARO *et al.*, 1999). Tais estudos têm sido realizados ao longo das últimas décadas em escalas locais e regionais (ROWE & DEMING, 1985; RICHARDSON & YOUNG, 1987; ROWE *et al.*, 1991). REX *et al.* (2006) realizaram pela primeira vez um estudo de biomassa disponível em escala global, a partir da síntese de dados sobre abundância e biomassa das quatro maiores classes de tamanho de

organismos bentônicos (bactéria, meiofauna, macrofauna e megafauna) identificados em estudos realizados em todo o mundo. A partir de uma análise de covariância entre os grupos de organismos, foram observadas fortes e consistentes mudanças na biomassa disponível e no tamanho corporal médio, relacionadas à profundidade. Enquanto a abundância dos três grupos de animais diminui significativamente com o aumento da coluna d'água, a densidade bacteriana permanece relativamente constante. Entre os grupos de animais, a macrofauna diminui mais rapidamente com a profundidade que a meiofauna. Em outras palavras, com o aumento da profundidade, a comunidade se torna mais dominada por organismos menores (REX *et al.*, 2006). A revisão do papel relativo dos pequenos organismos sugere que as bactérias e a meiofauna dominam onde existem fluxos de matéria orgânica extremamente baixos. A dominância de grupos de tamanho maior ocorre em águas rasas e em áreas de mar profundo com elevados fluxos de matéria orgânica lábil (RICHARDSON & YOUNG 1987).

A análise em escala global realizada por REX *et al.* (2006) foi composta, em sua maior parte, por amostras realizadas no Atlântico e áreas adjacentes. Os autores atribuem este fato à proximidade destas áreas com instituições oceanográficas americanas e européias estabelecidas há muitos anos. O Atlântico Sul ocidental e grande parte do Oceano Indo-Pacífico, particularmente o Hemisfério Sul, são atualmente subrepresentados no que se refere a medidas de biomassa disponível – a maioria destas regiões permanece inexplorada. É imprescindível, portanto, que grupos de pesquisas locais e regionais destas áreas carentes em estimativas de fluxo de carbono ao sedimento e medidas de biomassa disponível nos sedimentos profundos realizem pesquisas que contribuam para o avanço do conhecimento e para um maior entendimento do ciclo global do carbono.

2.3. PARÂMETROS MICROBIANOS COMUMENTE ANALISADOS NOS SEDIMENTOS

2.3.1. Atividade Microbiana

A avaliação da atividade metabólica microbiana indica, em termos gerais, a taxa de processamento e mineralização da matéria orgânica. Na interface água-sedimento, tais processos dependem, por um lado, da intensidade e da composição do suprimento orgânico, e de outro, das condições ambientais, tais como temperatura, natureza e disponibilidade dos oxidantes, tipo de sedimento e bioturbação (RELEXANS *et al.*, 1996). Acredita-se que a atividade *in situ* das bactérias de mar profundo é provavelmente limitada pelo conteúdo de carbono na água do mar e no sedimento e não pela elevada pressão hidrostática ou baixa temperatura (ZOBELL & MORITA, 1959).

A atividade microbiana pode ser estimada a partir da incorporação de carbono ou produção bacteriana, da respiração e do consumo de oxigênio. Os métodos comumente utilizados para avaliar a produção bacteriana em amostras de sedimento são baseados na incorporação de aminoácidos marcados com ^{14}C , conforme utilizado por SCHWARZ & COLWELL (1975), WIRSEN & JANNASCH (1975), DEMING & COLWELL (1982), TABOR *et al.* (1982), RELEXANS *et al.* (1996) e DEMING & CARPENTER (2008). Outros autores (WIT *et al.*, 1997; BOETIUS *et al.*, 2000; DIXON & TURLEY, 2000; MANINI *et al.*, 2004; DEMING & CARPENTER, 2008; TAMMERT *et al.*, 2008) empregaram aminoácidos marcados com ^3H e a partir dos resultados de incorporação destes compostos estimaram a produção bacteriana. A respiração bacteriana em termos de $^{14}\text{CO}_2$ pode ser estimada após a incubação da amostra com ^{14}C -aminoácidos. Esta abordagem foi aplicada por diversos autores (SCHWARZ & COLWELL, 1975, TABOR *et al.*, 1982; RELEXANS *et al.*, 1996; BOETIUS *et al.*, 2000; DEMING & CARPENTER, 2008). Dados de consumo de oxigênio também fornecem uma importante estimativa da taxa de mineralização da matéria orgânica (RELEXANS *et al.*, 1996; WIT *et al.*, 1997), entretanto, é usualmente difícil determinar se as taxas de consumo de O_2 fornecem uma medida exclusiva da oxidação do carbono pelos microrganismos ou se incluem a oxidação de sulfeto, ferro e manganês ou ainda o consumo por parte de outros organismos presentes no sedimento (BLACKBURN, 1987).

O processo de incorporação de aminoácidos radioativos deve ser realizado, idealmente, simulando-se as condições *in situ* de temperatura e pressão. DEMING & CARPENTER (2008) observaram que quando incubados a pressões semelhantes à pressão *in situ*, microrganismos de sedimento localizadas abaixo de 2.700 m apresentavam taxas de atividade muito próximas ou maiores que quando incubados a pressão atmosférica, indicando a existência de comunidades bem adaptadas à pressão. O mesmo foi observado por TAMBURINI *et al.* (2002, 2009) que demonstraram estimativas de produção bacteriana de amostras profundas, incubadas a pressão atmosférica, bastante reduzidas em relação a amostras mantidas à pressão *in situ*.

Alguns autores reportaram que apenas uma reduzida proporção dos microrganismos presentes nos ecossistemas aquáticos exibe atividade metabólica significativa (DEL GIORGIO & BOUVIER, 2002; SMITH & DEL GIORGIO, 2003). A fração relativamente baixa de bactérias metabolicamente ativas, considerando-se o número total de microrganismos presentes, levou à idéia de que uma proporção significativa de células individuais não está comprometida ativamente na atividade microbiana e no metabolismo no nível de comunidade (TAMMERT *et al.*, 2008). De acordo com estes autores, a importância da análise de atividade microbiana em relação a outros parâmetros comumente analisados em amostras ambientais é sustentada pelo fato de que a estimativa de abundância bem como a biomassa bacteriana total consiste de indivíduos com uma ampla variedade de atividades metabólicas, incluindo células mortas ou inativas. Entretanto, a proporção de células quantificada pela análise de abundância que não está contribuindo efetivamente para o metabolismo microbiano pode ser utilizada como fonte de matéria orgânica no sedimento, contribuindo deste modo para a nutrição da fauna bentônica. Por esta razão, a avaliação da atividade metabólica deve ser realizada em conjunto com a análise de outros parâmetros biológicos como a abundância e a biomassa.

2.3.2. Biomassa

A biomassa bacteriana é uma das informações fundamentais ao estudo da ecologia microbiana (MAEDA *et al.*, 1983). Este parâmetro é normalmente definido como conteúdo de carbono celular que está associado a bactérias intactas, sem fazer referência à viabilidade ou atividade metabólica das células em questão. A significância

dos dados de biomassa está relacionada à distribuição da matéria orgânica viva nos oceanos (HOLM-HANSEN & BOOTH, 1966). Segundo ROWE E DEMING (1985), a estimativa da biomassa bacteriana total em termos de carbono por metro quadrado é útil para comparação com os fluxos de carbono e outras medidas de estoque vivo.

Para a determinação da biomassa pode-se fazer o uso de técnicas diretas e indiretas. Como exemplo de determinação indireta, pode-se destacar o método da adenosina 5'-trifosfato (HOLM-HANSEN & BOOTH, 1966; STOECK *et al.*, 2000; NAKAMURA & TAKAYA, 2003) e o método do lipopolisacarídeo (WATSON *et al.*, 1977; MAEDA *et al.*, 1983; LA FERLA *et al.*, 2004). Os métodos diretos consistem basicamente na enumeração das células bacterianas, seguida ou não da mensuração do volume celular. Os números e/ou volumes das células são então convertidos em biomassa de carbono por meio de fatores de conversão já publicados ou criados a partir de um determinado conjunto de amostras para um dado ambiente, existindo diferentes opções de fatores na literatura (ver Tabela I).

Tabela I. Principais fatores de conversão de abundância bacteriana e volume celular em biomassa de carbono.

Referência	Amostra	Fator
ZoBell & Morita 1959	Sedimento	200 fg C.célula ⁻¹
Williams & Carlucci 1976	Água	10 fg C.célula ⁻¹
Ferguson & Rublee 1976	Água	87 fg C.µm ⁻³ / 8 fg C.célula ⁻¹
Watson <i>et al.</i> 1977	Água	121 fg C.µm ⁻³ / 11 a 34 fg C.célula ⁻¹
Robinson <i>et al.</i> 1982	Água	200 fg C.célula ⁻¹
Bratbak & Dundas 1984	Água	220 fg C.µm ⁻³
Bratbak 1985	Água	560 fg C.µm ⁻³ / 110 a 310 fg C.célula ⁻¹
Nagata 1986	Água	106 fg C.µm ⁻³
Lee & Fuhrman 1987	Água	380 fg C.µm ⁻³ / 20 fg C.célula ⁻¹
Fry 1990	Sedimento	310 fg C.µm ⁻³
Børsheim <i>et al.</i> 1990	Água	300 fg C.µm ⁻³ / 25 fg C.célula ⁻¹
Bjornsen & Kuparinen 1991	Água	400 fg C.µm ⁻³ / 48 fg C.célula ⁻¹
Zubkov <i>et al.</i> 1998	Água	19 fg C.célula ⁻¹

(fg) fentograma = 10⁻¹⁵ g

A ampla faixa de valores observada para os fatores de conversão descritos na Tabela 1 (87 a 560 fg C.µm⁻³) pode estar associada à metodologia utilizada na obtenção do fator, à presença de carbono no material extracelular coletado junto com as células e aos diferentes tipos de célula presentes nas amostras (ROBINSON *et al.*, 1982, BRATBAK, 1985; BØRSHEIM *et al.*, 1990). Especificamente em relação a fatores que consideram o volume celular, a obtenção do volume é uma etapa crítica do processo

uma vez que diversas aplicações podem ser utilizadas para esta finalidade (microscopia de epifluorescência, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e analisadores eletrônicos de partículas) (BRATBAK, 1985). Ainda de acordo com Bratbak (1985), as células presentes na amostra podem apresentar diferentes estados fisiológicos e o processo de fixação das amostras pode causar encolhimento das células, variando assim seu volume.

No cálculo da biomassa bacteriana com utilização de fatores de conversão previamente estabelecidos na literatura se faz necessário considerar o tipo de amostra em questão, a faixa de profundidade de origem das amostras e obter informações sobre os tipos celulares presentes. A biomassa de sedimentos rasos pode ser subestimada quando calculada a partir da conversão direta da abundância bacteriana (DEMING & CARPENTER, 2008), já que sedimentos rasos têm maior diversidade de tamanhos celulares quando comparados a sedimentos profundos. Sendo assim, o cálculo da biomassa diretamente da abundância (sem informação do tamanho celular) pode ser adequada somente para estimar biomassa bacteriana em sedimentos abissais que geralmente contêm células menores.

Uma boa alternativa seria a medição do volume celular e a identificação dos diferentes tipos de células em amostras de sedimentos, independente da profundidade em que foram coletadas (DANOVARO *et al.*, 1998). Após a análise dos tamanhos celulares e o cálculo do biovolume, pode-se utilizar fatores específicos para as respectivas classes de tamanho de bactérias (como descrito por WATSON *et al.*, 1977), possibilitando assim que a biomassa calculada, obtida a partir do biovolume, seja a mais próxima possível da biomassa real do ambiente estudado.

2.3.3. Abundância

O estudo dos microrganismos em amostras naturais envolve a enumeração como um índice geral de atividade e como uma medida de biomassa (JANNASCH & JONES, 1959). De acordo com WATSON *et al.* (1977), o fracasso em demonstrar populações bacterianas significativas no oceano pode ser atribuído primariamente à inadequação das técnicas empregadas na análise de abundância. Nenhum grupo de organismos marinhos tem recebido tanta atenção quanto os procariotos, o que tem trazido incontestáveis avanços em ecologia microbiana (EPSTEIN & ROSSEL, 1995). Apesar

disso, algumas características fundamentais do domínio das populações bacterianas são ainda difíceis de avaliar adequadamente, a exemplo da abundância de bactérias nos sedimentos.

Bactérias em sedimentos marinhos em todo o mundo influenciam os ciclos biogeoquímicos elementares nos oceanos, as estratégias de alimentação da fauna bentônica, e os projetos de engenharia para biorremediação de compostos tóxicos *in situ* (SCHMIDT *et al.*, 1998). Considerando que a distribuição bacteriana é relacionada às propriedades do sedimento (DANOVARO & FABIANO, 1995), a abundância bacteriana pode ser utilizada como um forte indicativo de mudanças no fluxo de nutrientes no fundo oceânico, resultante de variações sazonais e interanuais (DANOVARO *et al.*, 1999) e de outras mudanças ambientais.

2.3.3.1. Preservação das amostras para análise de abundância bacteriana

Esta é uma das etapas mais críticas do processo de obtenção de dados de abundância bacteriana. Estima-se que aproximadamente 25% das bactérias marinhas de regiões profundas morrem em 10 minutos quando aquecidas a 30°C e somente 20% podem sobreviver por 10 minutos a 40°C. Isto ocorre porque bactérias de mar profundo são mais sensíveis ao aquecimento que as populações de águas rasas, portanto é necessário cautela para que o processamento das amostras não seja realizado próximo ou além do limiar de tolerância de temperatura de muitos microrganismos marinhos (ZOBELL & MORITA, 1959).

Para análise de abundância utilizando-se métodos de cultivo a amostra de sedimento coletada deve ser processada logo após a coleta, no entanto pode-se realizar a preservação por curtos períodos de tempo, refrigerando-se a amostra (GOUDA *et al.*, 2006). No processo de preservação das amostras para posterior determinação da abundância através da análise direta (por microscopia ou citometria em fluxo), o formol tem sido a substância mais utilizada (JANNASCH & JONES, 1959; MEYER-REIL *et al.*, 1978; DEMING & COLWELL, 1982 e 1985; ROWE & DEMING, 1985; VELJI & ALBRIGHT, 1986a e 1986b; BOTT & KAPLAN, 1990; PARKES *et al.*, 1994; EPSTEIN & ROSSEL, 1995; RELEXANS *et al.*, 1996; WIT *et al.*, 1997; DANOVARO *et al.*, 1998 e 2002a; SCHMIDT *et al.*, 1998; MANINI *et al.*, 2004; DUHAMEL & JACQUET, 2006; RAGHUKUMAR *et al.*, 2006; DEMING & CARPENTER, 2008). A

fixação costuma ser realizada logo após a coleta do sedimento, para garantir a qualidade das amostras no momento da análise de abundância, sendo comumente associado à refrigeração (em torno de 4°C) ou congelamento. FURTADO & CASPER (2000) reforçaram o papel da preservação das amostras e ressaltaram que a fixação com paraformaldeído minimiza a perda celular no processo de sonicação das amostras, durante o processo de extração. Isto ocorre porque fixadores a base de aldeídos formam ligações cruzadas inter e intramoleculares com proteínas e conseqüentemente fortalecem os componentes celulares, incluindo as paredes celulares (VELJI & ALBRIGHT, 1986b).

Além do formol, o glutaraldeído também pode ser utilizado no processo de preservação das amostras, a exemplo dos trabalhos de DIXON & TURLEY (2000), TURLEY & DIXON (2002) e LUNAU *et al.* (2005). No entanto, existe na literatura divergência de opiniões com respeito à eficiência do glutaraldeído. DUHAMEL & JACQUET (2006) ressaltaram a importância da preservação das amostras publicando contagens bacterianas de amostras fixadas com formol cerca de 33% superiores a amostras que não receberam qualquer tipo de fixador e até 77% a mais que amostras preservadas com glutaraldeído. Essas conclusões contrastam com as de LUNAU *et al.* (2005), que obtiveram resultados mais satisfatórios com amostras fixadas com glutaraldeído. Vale ressaltar que o método de extração utilizado por DUHAMEL & JACQUET (2006) foi diferente do utilizado por LUNAU *et al.* (2005), deste modo, a discrepância entre os resultados pode estar relacionada com uma possível interação entre os agentes utilizados no processo de separação das bactérias e as soluções de formol e glutaraldeído utilizadas na preservação das amostras. O paraformaldeído seria mais adequado à extração com pirofosfato de sódio, já o glutaraldeído forneceria melhores resultados quando aplicado o método de extração com metanol. Das substâncias em questão o formol (ou paraformaldeído) parece ser o mais indicado para a preservação de células bacterianas destinadas à análise de abundância bacteriana após extração com pirofosfato.

2.3.3.2. Utilização de métodos de cultivo x métodos de análise direta

Trabalhos importantes foram realizados na década de 1950 utilizando métodos de cultivo na enumeração das bactérias do sedimento (ZOBELL & MORITA, 1959).

Com o desenvolvimento do microscópio de fluorescência, a determinação da abundância bacteriana na água e no sedimento tornou-se simples e mais precisa. Esta precisão foi importante para o entendimento da dinâmica dos microrganismos e seu papel no metabolismo dos ambientes (FURTADO & CASPER, 2000). Há muito tempo sabe-se que técnicas de cultivo fornecem apenas uma pequena fração das bactérias vivas presentes no ambiente (WATSON *et al.*, 1977), uma vez que não se pode fornecer um meio com os requisitos nutricionais e condições ambientais essenciais para o crescimento de todas as bactérias. Além disso, grupos de bactérias que ocorrem em aglomerados ou aderidos a partículas sólidas são registrados como somente um único indivíduo nos métodos de cultivo.

Até a década de 1970, as análises de abundância bacteriana eram realizadas basicamente utilizando-se métodos de cultivo. Muito embora o método de contagem direta (utilizando microscopia de epifluorescência) na época estivesse sendo amplamente adotado, ainda estava longe de ser um procedimento de rotina. Apesar disso, diversos corantes, membranas filtrantes e microscópios estavam sendo testados (HOBBIE *et al.*, 1977). Estes autores apresentaram grande contribuição na determinação da abundância bacteriana por meio da realização de testes metodológicos para a detecção com microscopia de epifluorescência. O procedimento descrito por HOBBIE *et al.* (1977), para amostras de água, foi utilizada para análise de abundância bacteriana em amostras de sedimento nas décadas seguintes, inserindo-se apenas uma etapa de diluição da amostra (DEMING & COLWELL, 1982 e 1985; ROWE & DEMING, 1985; ROWE *et al.*, 1991; EPSTEIN & ROSSEL, 1995; TURLEY & DIXON, 2002; RAGHUKUMAR *et al.*, 2006).

O progresso nas ciências aquáticas é limitado pela disponibilidade de métodos que possam ser usados para observar e descrever características, recursos e processos que ocorrem nos ecossistemas naturais. Alguns destes métodos envolvem ferramentas, instrumentos ou tecnologias que são utilizadas no dia a dia da pesquisa nos laboratórios sem que os pesquisadores pensem a respeito da origem das descobertas (KARL, 2007). Segundo KARL (2007), a utilização dos filtros Nuclepore[®], disseminada por HOBBIE *et al.* (1977) foi um destes achados históricos que revolucionou a pesquisa em microbiologia aquática a partir do uso da microscopia de epifluorescência. Embora tenha ocorrido grande avanço nos métodos nas últimas décadas para quantificar células bacterianas totais, ainda persistem alguns problemas. Especialmente na análise de amostras de sedimentos, a adsorção de fluorocromos às partículas do sedimento e à

impossibilidade de observação de células aderidas resulta em uma visualização ineficiente das células sobre as membranas filtrantes. A diluição do sedimento não assegura melhor visualização ao microscópio, pois muitas vezes as células bacterianas não ficam distribuídas de maneira uniforme e/ou estão aderidas aos fragmentos (FURTADO & CASPER, 2000). Assim, a contagem de bactérias do sedimento exige a tarefa de separá-las das partículas antes das contagens (EPSTEIN & ROSSEL, 1995).

Além da análise direta por microscopia, pode-se também utilizar a citometria em fluxo como alternativa na determinação da abundância bacteriana de amostras de sedimento. Esta última técnica tem sido amplamente utilizada para amostras de água (DEL GIORGIO *et al.*, 1996; MARIE *et al.*, 1997; LEBARON *et al.*, 1998; GASOL *et al.*, 1999; GASOL & DEL GIORGIO, 2000; ANDRADE *et al.*, 2003), porém seu uso é ainda reduzido para a análise de amostras de sedimento, tendo sido aplicado apenas por DUHAMEL & JACQUET (2006), AMALFITANO & FAZI (2008) e AMALFITANO *et al.* (2009). Esta reduzida utilização da citometria em fluxo na análise de amostras de sedimento pode estar associada a diversos fatores tais como o custo de aquisição e operação do equipamento e a necessidade de eliminar completamente as partículas no processo de extração, uma vez que a presença de partículas na amostra pode rapidamente entupir o tubo de entrada do instrumento (AMALFITANO *et al.*, 2009).

2.3.3.3. Efeitos da etapa de extração sobre a análise de abundância

A análise de abundância bacteriana corando-se a solução diluída de sedimento e realizando a análise direta ao microscópio sem extração prévia das bactérias do sedimento foi amplamente utilizada entre as décadas de 1970 e 1990 (WATSON *et al.*, 1977; DEMING & COLWELL, 1982 e 1985; ROWE & DEMING, 1985; RICHARDSON & YOUNG, 1987; ROWE *et al.*, 1991). No entanto, análises microscópicas diretas de material natural são sujeitas a erro. As dificuldades na enumeração das bactérias de sedimentos incluem principalmente incertezas na diferenciação entre as células e as partículas, pois amostras bentônicas, ricas em material detritico, produzem uma quantidade considerável de partículas autofluorescentes de tamanho e forma semelhantes aos das bactérias (EPSTEIN & ROSSEL, 1995). Além disso, a concentração de material detritico em amostras naturais

frequentemente excede a concentração de bactérias, por estas razões, a correta identificação de uma bactéria é frequentemente difícil de ser realizada em amostras sem prévia separação (WATSON *et al.*, 1977). A precisa quantificação da abundância bacteriana nos sedimentos é um pré-requisito essencial para entender o papel microbiano nos processos do ecossistema bentônico. A separação das células das partículas de sedimento e sua apropriada desagregação são necessárias para aplicações avançadas de microscopia de epifluorescência, uma vez que a absorção de corantes fluorescentes pela matriz mineral e a firme ligação das células às partículas abióticas dificultam a visualização direta das células (AMALFITANO & FAZI, 2008).

O processo de separação ou extração é o principal desafio na análise de bactérias em amostras de sedimento e visa a otimização das contagens bacterianas. Este processo consiste na combinação de tratamentos químicos e físicos destinados a aumentar a proporção de células separadas das partículas, minimizando a perda de organismos (AMALFITANO & FAZI, 2008). Para alcançar este objetivo, é necessário observar todo o processo de manipulação das amostras que inclui o tratamento da amostra que precede a extração, a separação propriamente dita das bactérias das partículas do sedimento e os processos de coloração e contagem das bactérias.

Entre as abordagens utilizadas para separar as bactérias das partículas de sedimento podem ser destacadas a agitação das amostras, a homogeneização do sedimento em equipamentos específicos e a sonicação da amostra empregando banho de ultrassom ou processadores ultrasônicos (sonicadores com sonda, utilizados mais comumente para romper células) (EPSTEIN & ROSSEL, 1995). Nos últimos anos foram realizados diversos estudos com o objetivo de testar a eficiência destes métodos físicos de separação, associados ou não a métodos químicos (EPSTEIN & ROSSEL, 1995; FURTADO & CASPER, 2000; DANOVARO *et al.*, 2001; BUESING & GESSNER, 2002; LUNAU *et al.*, 2005; DUHAMEL & JACQUET, 2006). Na maioria dos casos, contudo, o procedimento requer tempo e material para obter elevada eficiência na recuperação bacteriana (FURTADO & CASPER, 2000).

A utilização de sonicadores com sondas (capazes de romper células) na separação de células bacterianas das partículas de sedimento foi validada a partir de testes nos quais foram encontrados tempos e frequências adequados para que se obtenha a máxima extração das bactérias, sem danificar as células (EPSTEIN & ROSSEL, 1995; BUESING & GESSNER, 2002; AMALFITANO & FAZI, 2008). EPSTEIN & ROSSEL (1995) realizaram testes para avaliar o grau de dano causado às células

bacterianas com a sonicação, mas não observaram dano significativo nas células fixadas com formaldeído depois de serem submetidas a 180 s de sonicação (com intervalos a cada 60 s). Estes autores mostraram que a sonicação pode ser até 238% mais eficiente que a homogeneização e ainda extrair 307% mais bactérias dos sedimentos que quando utilizado banhos de ultrassom. BUESING & GESSNER (2002) recomendam o uso de sonicadores com sonda para amostras com elevado conteúdo de material orgânico.

Alguns trabalhos foram feitos utilizando-se apenas banho de ultrassom para separar as bactérias da matriz do sedimento (RELEXANS *et al.*, 1996, DANOVARO *et al.*, 1998 e 2002b; MANINI *et al.*, 2004). Na tentativa de extrair as bactérias das partículas, é comum utilizar o processo de sonicação associado à homogeneização da amostra. Entretanto, a eficiência do processo de extração das células pode ser aumentada diluindo-se a amostra e adicionando uma etapa de separação química, utilizando substâncias surfactantes como o tripolifosfato de sódio, o pirofosfato de sódio, o Polioxietileno-Sorbitan Monooleate (Tween 80) e o Triton-X. A adição destas substâncias não somente maximiza a extração das células do material particulado, mas também previne que as células se liguem novamente à matriz do sedimento (FRY, 1990). Além disso, o uso destes compostos defloculantes ou surfactantes proporciona uma distribuição mais uniforme das bactérias sobre os filtros contendo a amostra (VELJI & ALBRIGHT, 1986a; EPSTEIN & ROSSEL, 1995).

Diversos estudos utilizam o pirofosfato de sódio (associado ou não a outros detergentes) combinado à sonicação, visando uma dissociação mais eficiente entre as bactérias e as partículas de sedimento (MEYER-REIL *et al.*, 1978; VELJI & ALBRIGHT, 1986a e 1986b; BOTT & KAPLAN, 1990; FRY, 1990; PARKES *et al.*, 1994; EPSTEIN & ROSSEL, 1995; WIT *et al.*, 1997; DUHAMEL & JACQUET, 2006; AMALFITANO & FAZI, 2008; AMALFITANO *et al.*, 2009). A sonicação, realizada após a adição de pirofosfato, é considerada uma das primeiras etapas da extração das bactérias (DUHAMEL & JACQUET, 2006). Segundo estes autores, diferentes estudos que utilizam a sonicação concordam que 3 minutos são suficientes para separar bactérias do sedimento sem, entretanto, fazer referência ao efeito da adição de gelo ao banho de ultrassom. De acordo com DUHAMEL & JACQUET (2006) a adição de gelo ocasiona redução de cerca de 29% na abundância bacteriana final. Além da temperatura do banho durante a sonicação, a diluição também é um fator crítico. Segundo GOUGH & STAHL (2003), durante a sonicação de amostras de sedimento a diluição pode reduzir o rompimento celular causado pelo bombardeamento com partículas pequenas.

A principal desvantagem da utilização dos métodos de extração, principalmente aqueles que utilizam sonicação, é o efeito negativo da aplicação do tratamento sobre a membrana celular. AMALFITANO *et al.* (2009) realizaram um procedimento de dupla coloração de ácido nucléico, adicionando simultaneamente os corantes Sybr Green II (permeável à membrana) e iodeto de propídio (impermeável à membrana) e observaram maior proporção de células com a parede danificada em amostras submetidas a tratamento de separação, quando comparado a amostras analisadas sem extração prévia. Entretanto, apesar dos efeitos sobre a membrana celular, o procedimento de separação melhora consideravelmente a detecção das bactérias do sedimento, aumentando a abundância bacteriana final.

Além do uso de pirofosfato de sódio existem ainda técnicas de separação que utilizam Triton-X (SCHMIDT *et al.*, 1998; DEMING & CARPENTER, 2008), Metanol (LUNAU *et al.*, 2005) e Ácido fluorídrico (MORONO *et al.*, 2009). Apesar da diversidade de métodos disponíveis, os procedimentos que utilizam pirofosfato de sódio associado a uma etapa de sonicação, no processo de extração das bactérias têm sido amplamente utilizados na literatura (Tabela II), se mostrando mais adequado para esta aplicação. Vale ressaltar que alguns protocolos descritos na literatura são de difícil aplicação, pois faltam informações importantes como o tipo de sonicação utilizada (se banho de ultrassom ou se sonicador com sonda), tempos de incubação, concentrações de reagentes e soluções, entre outras.

Tabela II. Médias de Abundância Bacteriana em amostras de sedimento de diversos locais do mundo.

Estudo	Amostragem		Extração	Análise		Abundância Bacteriana x 10 ⁸ células.g ⁻¹ *
	Localização	Profundidade		Coloração	Deteccção	
ZoBell & Morita 1959	Fossa das Filipinas ¹	10.000 m 1.000 m	**	**	Cultivo	0,002 – 0,04 (PU) 0,005 – 0,02 (PU)
ZoBell & Morita 1959	Oceano Índico	7.000 m	**	**	Cultivo	0,01 – 0,02 (PU)
Deming & Colwell 1982	Planície Abissal Demerara ²	4.500 - 4.800 m	**	Acridine Orange	Epif.	4,4 – 10,7 (PS)
Rowe & Deming 1985	Planície Abissal Demerara ²	4.500 - 4.800 m	**	Acridine Orange	Epif.	3,1 – 4,7 (PS)
Rowe & Deming 1985	Baía de Biscay ³	4.000 - 4.700 m	**	Acridine Orange	Epif.	2,0 – 4,3 (PS)
Boetius <i>et al.</i> 1996	Mediterraneo Oriental	200 – 4.600 m	Pirofosfato e sonicação	Acridine Orange	Epif.	15,5 – 39,4 células.cm ⁻³
Wit <i>et al.</i> 1997	Oceano Índico	4.200 – 4.800 m	Pirofosfato e sonicação	DAPI	Epif.	8,6 – 96,9 (PS)
Danovaro <i>et al.</i> 1998	Mediterraneo Oriental	40 - 1.500 m	Sonicação	Acridine Orange	Epif.	1,0 – 3,5 (PS)
Boetius <i>et al.</i> 2000	Mar Árábico	1.900 - 4.400 m	Sonicação	Acridine Orange	Epif.	6,0 – 40,0 células.cm ⁻³
Danovaro & Serresi 2000	Mediterraneo Oriental	1.200 - 4.200 m	Pirofosfato e sonicação	SYBR-1	Epif.	4,0 – 11,0 (PS)
Dixon & Turley 2000	Atlântico Nordeste	1.100 – 3.600 m	Sonicação	Acridine Orange	Epif.	1,1 – 12,0 (PS)

(*) Unidade diferente quando especificada, (**) Não realizado, (PU) peso úmido, (PS) peso seco, (Epif.) Microscopia de Epifluorescência, (Cel.) Células, ¹Oceano Pacífico, ²Atlântico Norte, ³Costa Oeste da França, ⁴Itália, ⁵ Alexandria – Egito.

Tabela II. Continuação.

Estudo	Amostragem			Análise		Abundância Bacteriana
	Localização	Profundidade	Extração	Coloração	Deteção	
Danovaro <i>et al.</i> 2002a	Mar Mediterrâneo	1.300 – 4.000 m	Pirofosfato e sonicação	Acridine Orange	Epif.	1,8 – 6,5 (PS)
Danovaro <i>et al.</i> 2002b	Mar Adriático ⁴	15 – 50 m	Sonicação	Acridine Orange	Epif.	1,4 – 36,5 (PS)
Luna <i>et al.</i> 2002	Mar Adriático ⁴	9 – 12 m	Sonicação	Acridine Orange	Epif.	1,5 – 53,1 (PS)
Turley & Dixon 2002	Atlântico Nordeste	1.100 - 3.600 m	Sonicação	Acridine Orange	Epif.	0,6 – 5,3 células.mL ⁻¹
Quéric <i>et al.</i> 2004	Oceano Ártico	1.200 – 5.600 m	Pirofosfato e Homogeneização	Iodeto de Propídio e Syto 9	Epif.	0,8 – 5,4 células.cm ⁻³
Lunau <i>et al.</i> 2005	Mar do Norte	2 m	Metanol	SYBR Green I	Epif.	0,05 células.mg ⁻¹ (PU)
			Pirofosfato	SYBR Green I	Epif.	0,04 células.mg ⁻¹ (PU)
			Tween 80	SYBR Green I	Epif.	0,03 células.mg ⁻¹ (PU)
	Mar Báltico	405 m	Metanol	SYBR Green I	Epif.	9,0 células.mg ⁻¹ (PU)
			Pirofosfato	SYBR Green I	Epif.	7,0 células.mg ⁻¹ (PU)
			Tween 80	SYBR Green I	Epif.	5,8 células.mg ⁻¹ (PU)
Gouda <i>et al.</i> 2006	Eastern Harbour ⁵	1,5 – 13 m	**	**	Cultivo	0,0001 – 0,1 CFU.g ⁻¹ (PS)
Raghukumar <i>et al.</i> 2006	Bacia Indiana Central	5.000 m	Sonicação	Acridine Orange	Epif.	20,0 (PS)
Hewson & Fuhrman 2007	Oceano Pacífico	20 – 900 m	Pirofosfato e homogeneização	SYBR Green I	Epif.	0,7 – 1,6 células.mL ⁻¹
Deming & Carpenter 2008	Golfo do México	212 – 3.732 m	Triton-X	Acridine Orange e DAPI	Epif.	1,0 – 18,9 células.cm ⁻³

(*) Unidade diferente quando especificada, (**) Não realizado, (PU) peso úmido, (PS) peso seco, (Epif.) Microscopia de Epifluorescência, (Cel.) Células,

¹Oceano Pacífico, ²Atlântico Norte, ³Costa Oeste da França, ⁴Itália, ⁵Alexandria – Egito.

2.3.3.4. *Quantificação da abundância: Microscopia x Citometria em Fluxo (FCM)*

Técnicas de avaliação óptica incluem microscopia de contraste de fases (ZOBELL & MORITA, 1959), microscopia eletrônica de transmissão (DANOVARO *et al.*, 2001) e microscopia de epifluorescência (DEMING & COLWELL, 1982; ROWE & DEMING, 1985; BOLLIGER *et al.*, 1991; DANOVARO *et al.*, 2002a; LUNA *et al.*, 2002; LUNAU *et al.*, 2005; DEMING & CARPENTER, 2008; MORONO *et al.*, 2009). Das três técnicas microscópicas citadas, a mais comumente utilizada na análise de abundância procariótica em amostras de sedimento tem sido a microscopia de epifluorescência.

Entre as vantagens da microscopia eletrônica de transmissão estão a possibilidade de visualização das células e a caracterização da sua morfologia, entretanto, seu custo elevado e capacidade limitada de processamento de amostras parece inviabilizar sua constante utilização. O uso da microscopia de epifluorescência combinado com o desenvolvimento de uma variedade de corantes fluorescentes de ácidos nucléicos altamente específicos logo se tornou o método aceito porque envolvia uma tecnologia mais rápida e menos dispendiosa (DUHAMEL & JACQUET, 2006). No entanto, embora a microscopia seja uma técnica bem estabelecida, reconhecida e utilizada há décadas, esta é uma técnica que apresenta muitos problemas.

O tempo gasto nas contagens ao microscópio é bastante desfavorável, pois limita o número de amostras a ser analisado. Esta demora nas contagens favorece o decaimento da fluorescência do corante, causando erros nas contagens (DUHAMEL & JACQUET, 2006). Além disso, a contagem de apenas uma parte das bactérias sobre o filtro pode adicionar um erro aos resultados de abundância, caso a distribuição das células sobre a membrana não seja homogênea. Na microscopia de epifluorescência, é necessário tomar uma série de cuidados com a autofluorescência dos filtros, corantes e óleo de imersão, e a preparação das lâminas devem produzir contraste suficiente entre as células e o fundo (*background*) (HOBBIE *et al.*, 1977). Contagens microscópicas realizadas na presença de grãos de sedimento e detritos exigem maior diluição a fim de manter a fluorescência não específica baixa (DEMING & CARPENTER, 2008); no entanto, cada pesquisador deve estabelecer critérios e número mínimo de células que devem estar presentes em cada campo óptico.

Como alternativa a estas limitações, a citometria em fluxo tem sido usada rotineiramente para a análise de microrganismos em amostras marinhas e, atualmente, é

bastante aceita como técnica de referência em oceanografia (MARIE *et al.*, 1999; GASOL & DEL GIORGIO, 2000). Contagens bacterianas usando microscopia de epifluorescência ou citometria em fluxo são baseadas no uso de corantes de ácidos nucleicos específicos e altamente fluorescentes (DUHAMEL & JACQUET, 2006). A citometria em fluxo proporciona a aquisição e análise de dados multiparamétricos com grande rapidez. Durante as últimas duas décadas, esta técnica foi usada com sucesso em diversas aplicações como, por exemplo, analisar e contar comunidades microbianas pelágicas de organismos tais como protistas, microalgas, bactérias e vírus, identificar e quantificar conteúdo de DNA de uma população e/ou para investigar o ciclo celular, investigar populações de interesse usando probes moleculares, acessar a fisiologia celular, entre outras. Revisões têm sido publicadas sobre a precisão e exatidão desta técnica aplicada ao campo das ciências aquáticas e ecologia, em particular, e sobre a modificação e/ou otimização de aparatos e procedimentos (DUHAMEL & JACQUET, 2006).

A maior vantagem da citometria em fluxo é a possibilidade de analisar rapidamente uma grande quantidade de células e gerar dados estatisticamente robustos (MARIE *et al.* 1999). A rapidez característica desta metodologia torna possível sua utilização como análise de rotina e em análises exploratórias de propriedades microbianas. Além disso, o curto tempo de exposição da célula corada à luz durante a contagem no citômetro evita o decaimento da fluorescência (DUHAMEL & JACQUET, 2006), melhorando a contagem. Por fim, a análise realizada por um equipamento calibrado elimina a subjetividade das contagens e a dependência da sensibilidade do analista, como ocorre nas contagens realizadas ao microscópio. Apesar de todas as vantagens, o uso da citometria em fluxo na análise de amostras de sedimento é recente, o primeiro artigo a registrar o uso desta técnica para amostras de sedimento só foi publicado no ano de 2006 (DUHAMEL & JACQUET, 2006). Além disso, o uso da citometria em fluxo exige maior rigor na etapa de extração das amostras de sedimento. Tais fatores podem estar contribuindo para a reduzida utilização deste equipamento observada nos artigos publicados atualmente.

A diluição das amostras é uma etapa crítica quando se usa a citometria em fluxo para analisar bactérias, uma vez que é preciso encontrar uma diluição tal que consiga evitar coincidência de eventos durante a leitura pelo equipamento e, ao mesmo tempo, garantir que nenhuma informação da amostra seja perdida pelo excesso de diluição (MARIE *et al.*, 1999; DUHAMEL & JACQUET, 2006). Tanto na citometria em fluxo

quanto na microscopia de epifluorescência, o excesso de diluição pode ser evitado pelo uso de métodos eficazes de extração prévia das bactérias da matriz do sedimento. Essa etapa é imprescindível para o uso da citometria em fluxo por ser esta uma técnica bastante sensível. Uma simples diluição da amostra pode tornar os dados de citometria altamente variável e a presença de partículas na amostra poderá rapidamente entupir o tubo de entrada do instrumento (AMALFITANO *et al.*, 2009). Com a separação das bactérias, pode ser obtida uma amostra com turbidez bastante reduzida em relação à amostra inicial, sendo necessário, portanto, menor diluição e manipulação da amostra.

Usando protocolos ótimos para cada técnica, DUHAMEL & JACQUET (2006) encontraram boa correlação entre a citometria em fluxo e a análise por microscopia de epifluorescência ($r_s = 0,84$), sugerindo que a citometria em fluxo é adequada para atingir e fornecer contagens confiáveis para bactérias de sedimento. O mesmo foi observado por AMALFITANO & FAZI (2008) e AMALFITANO *et al.* (2009), onde conseguiram, com o auxílio da citometria em fluxo, avaliar o dano celular causado pelo processo de extração das bactérias. De acordo com os autores, o impacto negativo dos tratamentos de separação sobre a atividade metabólica da célula está mais provavelmente relacionado às mudanças no estado da membrana celular, aumentando assim o interesse na aplicabilidade de ensaios metabólicos por citometria em amostras de sedimento que tenham suas bactérias previamente separadas das partículas.

2.3.3.5. Unidades utilizadas para expressar os resultados

A questão mais importante é que cada unidade utilizada contém uma informação variada sobre o ambiente físico, de modo que relações ecológicas podem ser mascaradas ou falsamente quantificadas quando uma escala imprópria é usada (SCHMIDT *et al.*, 1998). Como exemplo de relações ecológicas falsamente quantificadas, podemos citar a abundância bacteriana nos sedimentos. Segundo SCHMIDT *et al.* (1998), a falta de consistência nas dimensões publicadas, usadas para expressar em termos numéricos parâmetros microbianos bentônicos, reflete o desafio de trabalhar com uma matriz sedimentar porosa complexa. Após a análise de dados disponíveis na literatura, abrangendo um intervalo de profundidade de 200 a 6000 m, REX *et al.* (2006) concluíram que os sedimentos marinhos superficiais comportam uma densidade de bactérias notavelmente constante ($\cong 10^9$ células.cm⁻³) independente da profundidade no

oceano, sendo o defendido por SCHMIDT *et al.* (1998) e DEMING & CARPENTER (2008). Contudo, casos de abundância bacteriana dependente da profundidade surgem em escalas locais, regionais (QUÉRIC *et al.*, 2004) ou temporais (DANOVARO *et al.*, 1999). A explicação que tem sido aceita para a variabilidade na abundância (ou biomassa e atividade), relacionada ou não com a profundidade, é a quantidade de material orgânico que chega ao assoalho oceânico e sua disponibilidade físico-química *in situ*.

Considerando a escala micrométrica relevante à célula individual, na análise de comunidades bacterianas é mais adequado que as bactérias, como a infauna maior, seja medida por volume e não por massa de sedimento (DEMING & CARPENTER, 2008). Apesar disso, muitos autores dimensionam parâmetros bacterianos por massa de sedimento (ZOBELL & MORITA, 1959; DEMING & COLWELL, 1982; ROWE & DEMING, 1985; WIT *et al.*, 1997; DANOVARO *et al.*, 1998; DANOVARO & SERRESI, 2000; DIXON & TURLEY, 2000; DANOVARO *et al.*, 2002a e 2002b; LUNA *et al.*, 2002; LUNAU *et al.*, 2005; GOUDA *et al.*, 2006; RAGHUKUMAR *et al.*, 2006). O dimensionamento do número de bactérias por massa de sedimento tem sido mais utilizado provavelmente devido à praticidade de se trabalhar com massa de sedimento em detrimento do volume.

2.4. CONCLUSÃO

As duas fontes mais importantes de matéria orgânica lábil nos oceanos profundos são a ‘chuva’ de carbono orgânico particulado da superfície e a transformação bacteriana de matéria orgânica refratária em compostos mais rapidamente assimiláveis no fundo do mar (RICHARDSON & YOUNG, 1987). A transformação da matéria orgânica envolve processos realizados por organismos procariotos presentes nos sedimentos, os quais utilizam os detritos orgânicos e desempenham um papel importante na produção de biomassa e nos ciclos biogeoquímicos em uma escala global (DANOVARO *et al.*, 2008). A distribuição destes organismos pode ser utilizada como forte indicativo de mudanças no fluxo de nutrientes ao fundo oceânico visto que a abundância microbiana é estreitamente relacionada às propriedades dos sedimentos (DANOVARO & FABIANO, 1995; DANOVARO *et al.*, 1998).

Depois de anos de estudos por grupos de pesquisa independentes utilizando uma variedade de abordagens, as determinantes ambientais da abundância bacteriana em sedimentos marinhos ainda estão pouco definidas na literatura (DEMING & CARPENTER, 2008). Segundo SCHMIDT *et al.* (1998), duas amplas abordagens complementares podem ser usadas para investigar restrições sobre a abundância dos organismos na natureza: (1) A análise das causas da variabilidade nas observações; (2) O desenvolvimento de uma explicação para o valor médio. Os trabalhos que abordam a microbiologia de sedimentos marinhos têm predominantemente usado a primeira abordagem. Na literatura de mar profundo, o fluxo descendente de carbono orgânico particulado prediz claramente a abundância bacteriana, e o tamanho das comunidades microbianas bentônicas parece ser baseado no suprimento de recursos orgânicos ao fundo do mar e não na profundidade (DEMING & CARPENTER, 2008).

Na avaliação dos fatores que determinam o tamanho das populações microbianas nos sedimentos torna-se imprescindível a determinação precisa na análise de abundância bacteriana. Para tal, esta análise deve ser precedida de correta separação das células bacterianas da matriz do sedimento (BUESING & GESSNER, 2002). Neste trabalho foram discutidas as principais metodologias que envolvem as etapas de extração e quantificação da análise de abundância, pois estas etapas são essenciais ao estudo da estrutura da comunidade bacteriana, sendo pré-requisito indispensável para evitar desvios sistemáticos pela extração preferencial de alguns tipos de bactérias e não outras

(BUESING & GESSNER, 2002). Isto é especialmente importante quando convertemos a abundância em biomassa a partir do cálculo do biovolume ou do número de células – a extração de apenas alguns tipos celulares resultará em estimativas errôneas do biovolume da amostra e conseqüente subestimação da biomassa. Dos diversos artigos existentes na literatura sobre testes metodológicos para a análise de abundância bacteriana em amostras de sedimento, nenhum é conclusivo e a grande gama de opções e condições experimentais prejudica a comparação de dados obtidos com metodologias diferentes.

A melhor metodologia para a análise de abundância bacteriana consiste: (1) no uso de paraformaldeído como preservante das células, (2) na utilização de pirofosfato de sódio associado a sonicação para extração das células bacterianas e (3) na quantificação das células separadas do sedimento por citometria em fluxo. A correta determinação da abundância bacteriana e conseqüentemente da biomassa, é uma importante ferramenta em estudos com estimativas de fluxo de carbono ao fundo oceânico e sua utilização pelos organismos bentônicos, contribuindo para uma melhor compreensão do ciclo global do carbono. O uso de parâmetros microbianos e sua integração possibilitarão um maior entendimento do papel desenvolvido pelos organismos procariotos nos oceanos do mundo.

Capítulo 2

3. TESTES METODOLÓGICOS

3.1. INTRODUÇÃO

Artigos dedicados ao aperfeiçoamento metodológico fornecem informações relevantes sobre os rumos da pesquisa numa determinada época. A avaliação destas publicações mostrou que o campo de estudo dos sedimentos apresenta certo atraso em relação às pesquisas realizadas com amostras de água, sejam continentais, costeiras ou oceânicas. É possível encontrar na literatura, já na década de 50 e 70, artigos abordando testes metodológicos da análise de abundância bacteriana em amostras de água (JANNASCH & JONES, 1959; HOBBIIE *et al.*, 1977).

Por outro lado, um dos primeiros artigos publicados com testes específicos para a extração de bactérias em amostras de sedimento foi publicado na década de 80 (VELJI & ALBRIGHT, 1986b). Neste trabalho foram realizados testes com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento com ultrassom, associado ou não a diversos reagentes (ácido clorídrico, carbonato de sódio, hidróxido de sódio, periodato de sódio e pirofosfato de sódio) na etapa de extração das bactérias da matriz do sedimento. Esta publicação referencia vários trabalhos da década de 70 e 80 em que eram utilizados métodos físicos e químicos (associados ou não) para extrair bactérias em diferentes superfícies e substratos – lodos de estações de tratamento, solo e plantas.

Uma série de fatores pode ter contribuído para a desigualdade observada entre pesquisas com água e sedimento. Entretanto, a maior facilidade de aquisição de amostras de água e conseqüentemente seu menor custo de operação, em comparação com os procedimentos para coleta de sedimento, pode ter influenciado na escolha do objeto de trabalho ao longo dos anos. Especificamente em relação à análise de abundância bacteriana a simplicidade na manipulação de amostras de água pode ser um atrativo importante quando se compara a lista de pré-requisitos necessários para a mesma análise em amostras de sedimento.

Artigos antigos tratam da abundância bacteriana em amostras de sedimento (ZOBELL & FELTHAM, 1942; ZOBELL & MORITA, 1959), contudo, nestes trabalhos o número de bactérias apresentado para as amostras de sedimento foi obtido com a utilização de técnicas de cultivo e os autores não mencionam a realização de testes metodológicos nem mesmo extração prévia das bactérias da matriz do sedimento. A utilização de métodos de cultivo, no passado, difundiu a idéia de que as bactérias

eram pouco numerosas nos oceanos. Como resultado, as bactérias não eram consideradas importantes nos processos biológicos nos oceanos, sendo consideradas apenas como decompositoras de material orgânico e produtoras de nutrientes inorgânicos para suportar o crescimento do fitoplâncton (KIRCHMAN & WILLIAMS, 2000).

Técnicas de cultivo possibilitam agregar ao dado de abundância bacteriana a informação de viabilidade celular, uma vez que somente crescerão nos meios de cultura as células metabolicamente ativas presentes nos sedimentos. Entretanto, métodos de cultivo limitam a estimativa de abundância, pois não é possível fornecer um meio com os requisitos nutricionais e condições ambientais essenciais para o crescimento de todas as bactérias ao mesmo tempo (WATSON *et al.*, 1977). Além disso, muitas bactérias encontram-se inativas devido às baixas concentrações de matéria orgânica nos oceanos (KIRCHMAN & WILLIAMS, 2000). Como consequência, as técnicas de cultivo favorecem apenas uma pequena fração das bactérias vivas presentes no ambiente (JANNASCH & JONES, 1959). JANNASCH & JONES, (1959) compararam a eficiência de cinco métodos de cultivo e dois métodos de contagem direta e encontraram estimativas de abundância bacteriana com análise de microscopia 13 a 9700 vezes superiores às observadas com métodos de cultivo.

Em alternativa às técnicas de cultivo, técnicas de contagem direta têm sido amplamente utilizadas (HOBBIE *et al.*, 1977; ROWE & DEMING, 1985; DANOVARO *et al.*, 1998; BOETIUS *et al.*, 2000; QUÉRIC *et al.*, 2004; LUNAU *et al.*, 2005; DEMING & CARPENTER, 2008; AMALFITANO *et al.*, 2009). Estas técnicas são baseadas no uso de corantes de ácidos nucléicos altamente fluorescentes e a quantificação das células coradas pode ser realizada por microscopia ou citometria em fluxo.

Metodologias de análise que aplicam técnicas de contagem direta são relativamente fáceis de aplicar na determinação da abundância bacteriana de amostras de água. Em amostras de sedimento estas técnicas também são eficientes em células previamente separadas da matriz do sedimento, entretanto, bactérias aderidas a superfícies ou imersas em matrizes coloidais são difíceis e frequentemente impossíveis de serem observadas pelos mesmos métodos (VELJI & ALBRIGHT, 1986b). A aderência das bactérias marinhas depende da superfície bacteriana, do substrato ao qual ela está aderida, do meio que separa estas duas superfícies e de fatores ambientais (VELJI & ALBRIGHT, 1986b). A adesão bacteriana ocorre, em grande parte, devido a

polímeros extracelulares constituídos de polissacarídeos e/ou proteínas (VELJI & ALBRIGHT, 1986b; RIIS *et al.*, 1998; RODRIGUEZ-NAVARRO *et al.*, 2007).

O processo de separação ou extração é o principal desafio na análise de bactérias em amostras de sedimento e consiste na combinação de tratamentos químicos e físicos destinados a balancear suficientemente a recuperação das células minimizando a perda de organismos (AMALFITANO & FAZI, 2008). Para alcançar este objetivo é necessário observar todo o processo de manipulação das amostras que inclui o tratamento da amostra que precede a extração, a separação das bactérias das partículas do sedimento e os processos de coloração e contagem das bactérias.

Após coleta das amostras de sedimento, tão rápido quanto for possível deve-se proceder a preservação das amostras. Fixadores a base de aldeídos formam ligações cruzadas inter e intramoleculares com proteínas e conseqüentemente fortalecem os componentes da célula, incluindo as paredes celulares. Esta etapa é fundamental quando se considera que as células presentes na amostra serão submetidas a um processo de separação da matriz do sedimento e, principalmente se este processo incluir alguma etapa física, como a sonicação. Além de manter a integridade da célula até o início do processamento das amostras, a etapa de fixação possibilita um aumento de tolerância das células à sonicação durante o processo de extração (VELJI & ALBRIGHT, 1986).

Neste trabalho foram realizados testes com o objetivo de verificar o desempenho de duas metodologias de separação. A primeira é baseada no uso de metanol aquecido e sonicação em banho de ultrassom e a segunda considera o pirofosfato de sódio associado à sonicação com sonda na extração das bactérias. O método que utiliza o metanol é um procedimento relativamente recente, publicado por LUNAU *et al.* (2005). Segundo estes autores, sob as condições de extração, o metanol quebra os polímeros (frequentemente compostos de polissacarídeos) externos às células e alcança as bactérias adsorvidas à superfície dos sedimentos. Informações adicionais sobre esta metodologia de extração foram obtidas em comunicação pessoal com o autor Mirko Lunau no ano de 2007. Devido à obtenção de um protocolo otimizado desta metodologia de extração e pelo fato de terem sido esclarecidas todas as dúvidas relativas ao método diretamente com os autores, não foram realizados testes preliminares para esta metodologia.

O método de extração baseado no uso de pirofosfato utilizado neste estudo foi baseado na publicação de DANOVARO *et al.* (2001), com algumas modificações sugeridas por DUHAMEL & JACQUET (2006). O uso de pirofosfato de sódio na

extração de bactérias a partir de uma matriz sólida é bastante antigo, tendo sido inicialmente utilizado para amostras de solo, plantas e posteriormente para amostras de sedimento (VELJI & ALBRIGHT, 1986; BOETIUS *et al.*, 1996; RIIS *et al.* 1998; DANOVARO & SERRESI, 2000). Esta substância atua como um detergente ou surfactante, possibilitando a extração das células do material particulado e prevenindo que as células se liguem novamente à matriz do sedimento (FRY, 1990).

Foram realizados testes preliminares visando otimizar a metodologia para a técnica de extração com pirofosfato considerando as condições de trabalho e os equipamentos utilizados. Uma vez determinadas as condições ideais foram realizados testes comparativos entre as duas técnicas (Metanol e Pirofosfato). Após a extração bacteriana, por ambos os métodos, se utilizou a citometria em fluxo para enumerar as células procarióticas contidas nas amostras, observando como padrão de eficiência a abundância bacteriana final e os perfis citométricos (menos ruído e melhor definição das populações bacterianas na área de contagem) das amostras resultantes dos processos de extração.

A despeito de qual seja o método testado, os procedimentos de avaliação de metodologia exigem uma série de cuidados para que se possa atribuir as conclusões do experimento unicamente às variáveis testadas. Para isto deve-se observar o processo de extração não como uma etapa isolada, porém, de modo mais amplo, como parte integrante da determinação da abundância bacteriana. Incertezas metodológicas podem ser evitadas garantindo-se a integridade dos microrganismos no momento da coleta, durante o processamento das amostras em laboratório e na análise propriamente dita.

Para atender a estas exigências e devido à indisponibilidade de amostras de sedimento profundo da Bacia de Campos foi realizada uma coleta específica na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro – RJ, local de fácil acesso em relação ao laboratório onde as amostras foram processadas, o que possibilitou a obtenção de volume suficiente de amostra para realização dos testes metodológicos. Vale ressaltar que este capítulo da dissertação tem como objetivo descrever os testes metodológicos realizados, bem como as conclusões referentes às técnicas de extração. Por esta razão os resultados obtidos não serão discutidos em relação aos locais de coleta nem serão abordados os aspectos ecológicos relacionados ao ambiente de origem das amostras.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Coleta das amostras

Amostras de sedimento foram coletadas na Baía de Guanabara com o auxílio de uma draga de Ekman (20 x 20 x 20 cm). O sedimento coletado foi mantido sob refrigeração até o início do processamento (\cong 2 h). No laboratório o sedimento foi homogeneizado e separado para as diferentes aplicações de acordo com os métodos de extração. Foram coletadas duas amostras com granulometria e concentração de matéria orgânica diferentes, com o objetivo de avaliar a eficiência dos dois métodos em relação a cada tipo de sedimento. Os pontos de coleta foram identificados como PQ e IG localizados, respectivamente, na direção do canal central da Baía, próximo à Ilha de Paquetá (profundidade: 10 m – 684530,04 L e 7472662,13 N) e em uma região mais interna do estuário, próximo à Ilha do Governador (profundidade: 7 m – 694412,53 L e 7484110,80 N). As coordenadas dos pontos de coleta estão em UTM, DATUM SAD 69 – MC 45°W.

A figura 2 resume as etapas do processamento do sedimento em laboratório para melhor visualização dos testes realizados. Após a coleta das amostras, ambas foram analisadas segundo o método do metanol. A amostra PQ foi utilizada nos testes preliminares que precederam a análise das duas amostras pelo método do pirofosfato. Após os testes metodológicos, as amostras coletadas na Baía de Guanabara foram analisadas pelo método do pirofosfato.

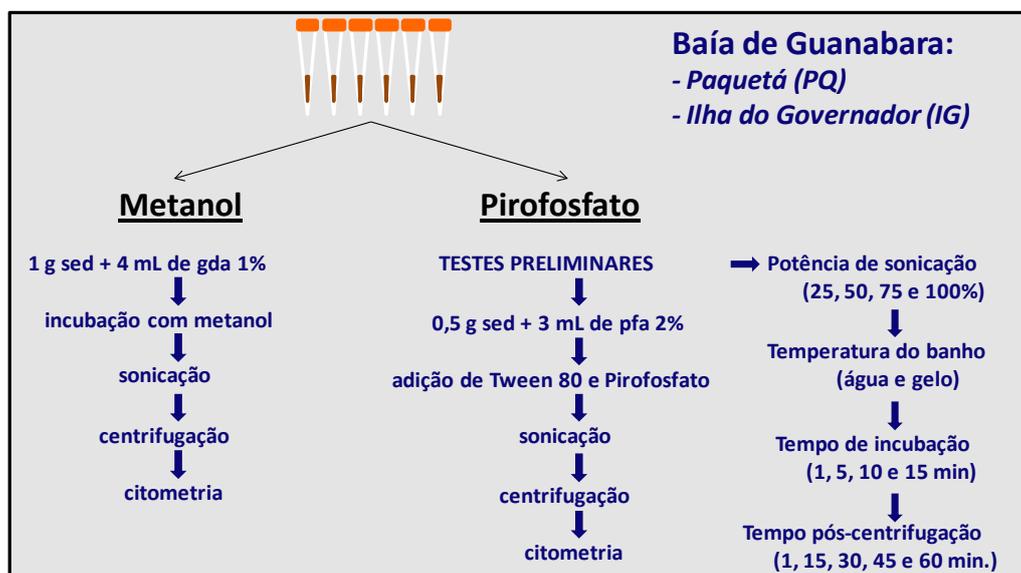


Figura 2. Resumo esquemático do processamento das amostras em laboratório.

Cada uma das etapas mencionadas no esquema da Figura2 será detalhada mais adiante. Alíquotas de sedimento foram pesadas com o auxílio de uma balança analítica Ohaus®, com precisão de quatro casas decimais (0,1 mg), em tubos de ensaio de polipropileno estéreis. A massa de sedimento utilizada e o processo de fixação realizado seguiram a descrição de cada método, conforme ilustrados na Figura 3.

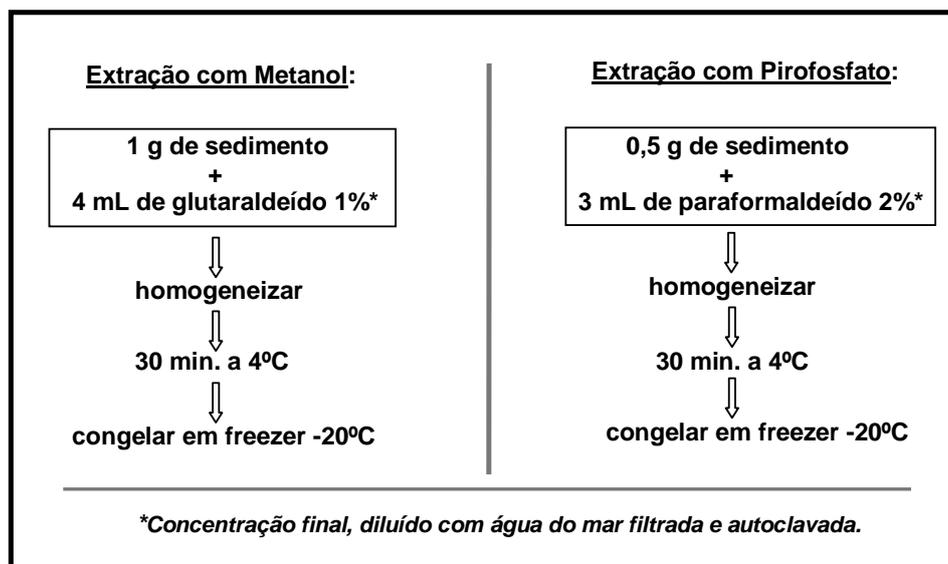


Figura 3. Esquema do procedimento de fixação das amostras.

Para o método de extração com metanol, 1 g de sedimento foi pesado em triplicata. As amostras foram transferidas para tubos de centrífuga de polipropileno de 15 mL e a fixação das amostras foi realizada com a adição de 4 mL de glutaraldeído (concentração final 1%), diluído em água do mar livre de partículas (previamente filtrada em 0,22 µm e autoclavada). Os tubos foram agitados manualmente e as amostras ficaram sob refrigeração durante 30 minutos, para completar o processo de fixação das amostras. Após este período as amostras foram congeladas em freezer -20°C.

Para o método de separação com pirofosfato de sódio, foram utilizadas alíquotas de 0,5 g de sedimento, em triplicata, e foram utilizados 3 mL de formol (concentração final 2%) na fixação das amostras. Os tubos contendo amostra fixada foram homogeneizados manualmente, refrigerados por 30 minutos e posteriormente congelados em freezer -20°C.

Todas as alíquotas utilizadas nos testes foram pesadas e fixadas no dia da coleta permanecendo congeladas até o momento da análise. Em todos os testes foram

utilizadas pipetas automáticas calibradas, membranas filtrantes estéreis e tubos e ponteiros previamente esterilizados em autoclave.

3.2.2. Método de Separação com Metanol

As amostras de sedimento fixadas foram descongeladas em água (6 subamostras de cada amostra). Após as amostras terem atingido a temperatura ambiente foram processadas de acordo com o esquema da Figura 4. A amostra de sedimento fixada foi homogeneizada e uma alíquota de 100 μL foi transferida para microtubo de polipropileno de 2 mL onde foi adicionado 900 μL de metanol 30% (preparado minutos antes da utilização). Os microtubos foram fechados e incubados em homogeneizador rotativo (FINEPCR[®] – HAG), durante 4 horas.

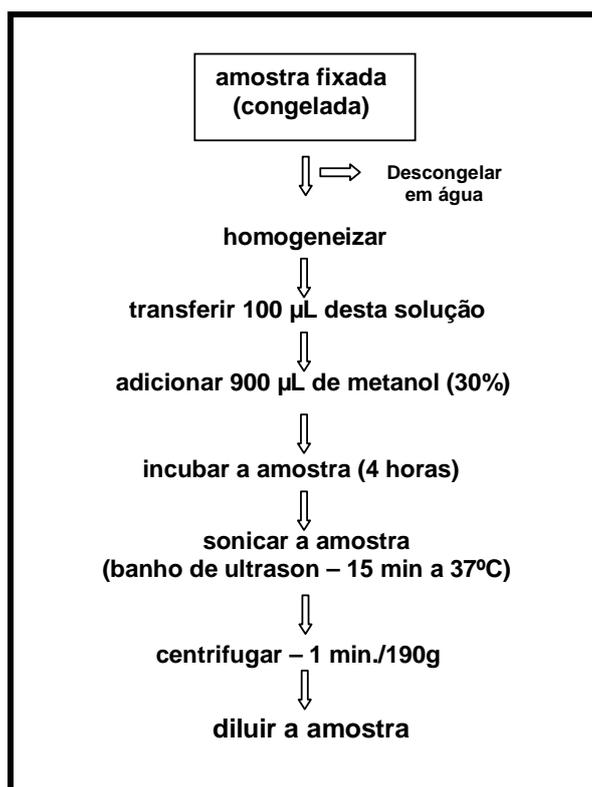


Figura 4. Esquema do procedimento de extração bacteriana utilizando metanol.

Terminado o tempo de incubação as amostras foram sonicadas durante 15 minutos em banho de ultrassom (Branson 1510R-MT, 70W, 40 kHz) a $35\pm 1^\circ\text{C}$. A temperatura do banho foi mantida pela adição de gelo, durante o tempo de sonicação.

Após a sonicação as amostras foram centrifugadas (1 min. / 190 g). Alíquotas de 10 µL foram transferidas para tubos de polipropileno estéreis de 1 mL e diluídas 25 vezes com tampão fosfato (PBS) livre de partículas. As amostras diluídas foram coradas com Syto13 e as células bacterianas separadas do sedimento foram contadas em citômetro de fluxo, conforme descrito posteriormente (subitem 3.2.4).

3.2.3. Método de Separação com Pirofosfato de Sódio

3.2.3.1. Testes Preliminares

Com o objetivo de esclarecer algumas dúvidas relacionadas à metodologia descrita para extração com pirofosfato foram realizados testes preliminares para avaliar: 1) a potência ideal do sonicador utilizado; 2) o efeito do banho de gelo durante a incubação das amostras após a sonicação; 3) o tempo ideal de incubação da amostra após a sonicação; 4) o efeito do tempo sobre amostras centrifugadas (antes de serem coradas). Estes testes foram realizados com a amostra coletada próximo ao canal central da Baía de Guanabara (amostra PQ).

Teste da potência do sonicador

Para avaliar a potência ideal a ser aplicada na extração das amostras foram testadas as seguintes porcentagens em relação à potência nominal do equipamento – 25%, 50%, 75% e 100%. Neste teste e em todos os demais em que se utilizou sonicador com sonda foi utilizado um processador ultrasônico GEX 130PB, equipado com sonda de 3 mm – 130 W de potência nominal.

As réplicas da amostra destinada ao teste com pirofosfato de sódio, congeladas na etapa anterior de fixação, foram descongeladas sobre a bancada até atingirem temperatura ambiente. Aos tubos contendo amostra de sedimento foi adicionado 5 µL de Tween 80 (10%) (diluído com água ultra pura), 1 mL de pirofosfato de sódio 10 mM e 4 mL de água do ambiente em que foram coletados os sedimentos (filtrada em membrana 0,22 µm e autoclavada). Os tubos foram agitados manualmente e em seguida sonicados durante 3 minutos, com interrupção de 30 segundos a cada minuto. Durante o intervalo entre os tempos de sonicação as amostras foram homogeneizadas manualmente. Este procedimento, ilustrado na Figura 5, foi repetido para todas as

réplicas, variando apenas a potência do sonicador aplicada. Para cada potência testada foram utilizadas quatro réplicas.

Após a sonicação, as amostras foram incubadas em banho de gelo, conforme sugerido por DUHAMEL & JACQUET (2006), durante 15 minutos. Terminado o tempo de incubação as amostras foram agitadas manualmente por 1 minuto, centrifugadas por igual período de tempo a 800 g e diluídas 25 vezes em tampão fosfato (PBS) filtrado em membrana 0,22 μm . As amostras diluídas foram coradas com Syto13 e as células bacterianas separadas do sedimento foram contadas em citômetro de fluxo.

Os resultados deste teste serão discutidos detalhadamente mais adiante, entretanto é importante ressaltar que a proporção de 75% (em relação à potência nominal do sonicador) foi a que apresentou melhor desempenho na extração bacteriana e por esta razão foi utilizada nos demais testes preliminares e na análise das amostras da Baía de Guanabara para comparação com o método do metanol.

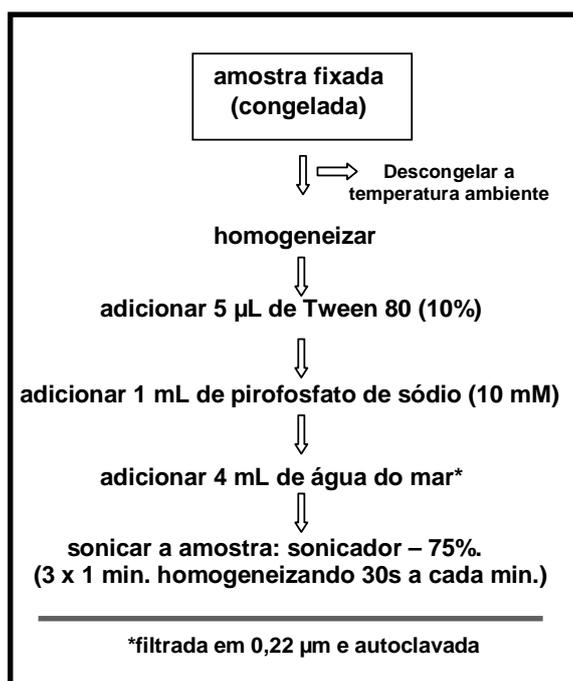


Figura 5. Esquema da parte inicial do procedimento de extração bacteriana utilizando pirofosfato de sódio.

Influência da temperatura do banho durante a incubação das amostras

Uma vez determinada a potência ideal de sonicação das amostras foi realizado um teste para avaliar o efeito do banho de gelo sobre a abundância bacteriana final. O

banho de gelo era aplicado depois da sonicação, na incubação das amostras e tinha por finalidade acelerar o resfriamento da amostra após a etapa de sonicação. DUHAMEL & JACQUET (2006) observaram que a adição de gelo ao banho ao qual a amostra é submetida, durante a sonicação, reduz a abundância bacteriana final em cerca de 29%. A partir disto foram realizados testes para avaliar o efeito da adição de gelo ao banho depois da sonicação.

Para a realização deste teste oito réplicas foram processadas de acordo com o esquema da Figura 5, até a etapa de sonicação das amostras. Após a sonicação, as réplicas foram separadas em dois grupos de quatro tubos. O primeiro grupo, foi incubado durante 15 minutos em água contendo gelo e o segundo grupo de tubos, foi incubado por 15 minutos em recipiente contendo água a temperatura ambiente. Passada a incubação, todas as amostras foram agitadas manualmente por 1 minuto, centrifugadas (800 g / 1 min) e diluídas 25x com PBS previamente filtrado (0,22 µm). A enumeração das células procarióticas foi realizada por citometria em fluxo.

Tempo de incubação da amostra após a sonicação

Este teste foi realizado com o objetivo de reduzir o tempo despendido no processo de extração das amostras, visando otimizar o processo de análise de abundância bacteriana em amostras de sedimento. Para avaliar o tempo mínimo de incubação necessário foram testados 1, 5, 10 e 15 minutos de incubação, com a utilização de cinco réplicas para cada intervalo de tempo. As amostras utilizadas neste teste foram processadas de acordo com o método de extração com pirofosfato (Figura 5). Após a sonicação (75%), as amostras foram incubadas em recipiente contendo água. Terminado o tempo de incubação, cada amostra foi agitada manualmente por 1 minuto, centrifugada (800g / 1 min.) e diluída 25x em tampão fosfato (livre de partículas) e quantificadas por citometria em fluxo.

Efeito do tempo sobre a abundância final após a centrifugação

Após a incubação, realizada depois da etapa de sonicação, segue-se a centrifugação das amostras para posterior diluição para quantificação por citometria. Este teste foi realizado objetivando-se verificar o possível decaimento da abundância bacteriana caso ocorra demora entre o processo de centrifugação e a quantificação por citometria. Além disso, não há qualquer informação na literatura sobre esta questão.

Para avaliar o fator tempo nesta etapa da extração com pirofosfato, foram analisadas amostras tratadas que após a centrifugação ficaram a temperatura ambiente por 1, 15, 30, 45 e 60 minutos, sendo utilizadas cinco réplicas para cada intervalo de tempo. As réplicas foram processadas de acordo com o procedimento descrito na Figura 5, com potência de 75% na sonicação das amostras. Em seguida, todas as réplicas foram incubadas durante 5 minutos em banho contendo apenas água. Após a incubação, todos os tubos foram agitados manualmente durante 1 minuto e em seguida centrifugados (800 g – 1 min.).

Uma vez centrifugados as réplicas relativas a cada tempo de espera foram separados e finalizados os respectivos tempos, as amostras foram diluídas 25x com PBS e analisadas por citometria em fluxo.

3.2.3.2. Extração com uso de Pirofosfato de Sódio

Uma vez determinadas as condições ideais da metodologia de extração com pirofosfato de sódio foram analisadas as amostras destinadas a comparar os métodos de extração. O diagrama esquemático da metodologia de análise utilizado está ilustrado na Figura 6. Seis alíquotas da amostra congelada na etapa de fixação foram descongeladas sobre a bancada até atingirem temperatura ambiente. Aos tubos contendo amostra de sedimento adicionou-se 5 µL de Tween 80 10% (diluído com água ultra pura), 1 mL de pirofosfato de sódio 10 mM e 4 mL de água da estação de coleta em que foi obtido o sedimento (filtrada em membrana 0,22 µm e autoclavada). Os tubos foram agitados manualmente e em seguida sonicados durante 3 minutos (potência de 75%), com interrupção de 30 segundos a cada minuto. Durante o intervalo entre os tempos de sonicação as amostras foram homogeneizadas manualmente.

Após a sonicação as amostras foram incubadas em recipiente contendo água durante 5 minutos. Finalizada a incubação as amostras foram homogeneizadas manualmente por 1 minuto e centrifugadas (800g/1 min.). As amostras centrifugadas foram imediatamente diluídas 25x em tampão fosfato livre de partículas e coradas com Syto 13. A enumeração das células procarióticas em suspensão presente nas amostras tratadas foi realizada por citometria em fluxo.

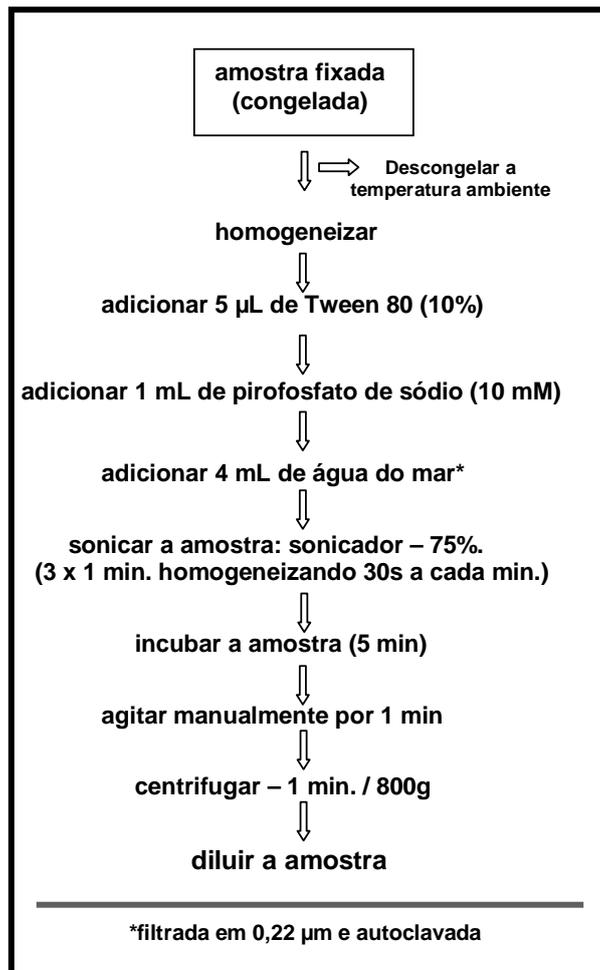


Figura 6. Esquema do procedimento completo de extração bacteriana utilizando pirofosfato de sódio.

3.2.4. Determinação da Abundância por Citometria em Fluxo

A abundância bacteriana total nos sedimentos tratados foi determinada após a coloração do ácido nucléico com o fluorocromo Syto13 (Molecular Probes, ref. S-7575) a 2.5 µM. Este procedimento é baseado nos trabalhos de DEL GIORGIO *et al.* (1996) e GASOL & DEL GIOGIO (2000) e tem sido utilizado rotineiramente no laboratório de Hidrobiologia do Instituto de Biologia - UFRJ para análise de abundância bacteriana em amostras de água (ANDRADE *et al.*, 2003). Com o desenvolvimento do presente trabalho, a metodologia de determinação da abundância bacteriana por citometria em fluxo foi validada também para amostras de sedimento.

Para cada 250 µL de amostra de sedimento tratada e já diluída, foram utilizados 10 µL da solução de trabalho de Syto13. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 15 segundos e incubadas no escuro por 15 minutos. Após este período, esferas

fluorescentes de látex foram adicionadas em abundância conhecida a cada amostra para calibração do espalhamento lateral e dos sinais de fluorescência verde, e como padrão interno para as contagens e medidas citométricas. A concentração da solução padrão de esferas foi determinada por microscopia de epifluorescência, de acordo com LEBARON *et al.* (1994). Em seguida à adição da solução de esferas as amostras foram mantidas em recipiente protegido de luz até o momento da leitura no citômetro (entre 20 e 40 minutos).

Para detecção foi usado um citômetro CyAn ADP (DakoCytomation), equipado com um laser de estado sólido (488 nm, 25 mW) e com modificações no filtros (verde FL1 em 510 ± 15 nm, e vermelho FL4 em 650 ± 10 nm). Para aquisição e processamento dos dados foi empregado o programa Summit versão 4.3 (DakoCytomation). Vale ressaltar que todos os dados de abundância obtidos neste trabalho foram dimensionados como número de células ou bactérias (bact) por massa úmida de sedimento (padronizada como 1 g PU).

3.2.5. Análises Estatísticas

Na análise dos dados foi empregada estatística descritiva básica e foram calculados valores médios, desvios padrão, coeficientes de variação e valores mínimos e máximos para todas as variáveis analisadas, tanto entre as estações quanto entre as condições testadas. Os dados de abundância obtidos nos testes foram analisados primeiramente em relação à parametricidade, através dos testes de Kolmogorov-Smirnov (normalidade), como proposto por ZAR (1999). As análises inferenciais e análises de variância foram efetuadas utilizando-se o programa Statistica[®] 7.0.

As análises de variância foram utilizadas a fim de comparar a abundância bacteriana entre: (1) condições específicas de cada procedimento avaliado; (2) resultados encontrados na análise das amostras com uma mesma técnica; (3) dados obtidos na análise das amostras com diferentes metodologias. De acordo com a característica do conjunto de dados avaliado foram realizadas análises de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (dados não paramétricos) ou ANOVA *one way* e teste T (dados paramétricos). O teste de Tukey (dados paramétricos) foi utilizado para discriminar as diferenças significativas apontadas pela análise de variância.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Método do Metanol

Os resultados de abundância bacteriana observados para as duas amostras de sedimento testadas com metanol (Tabela III) foram significativamente diferentes (Mann-Whitney, $U=0$, $p<0,005$), conforme ilustrado na Figura 7. Este era um panorama esperado uma vez que os pontos de coleta selecionados apresentam características locais bastante peculiares. Os dados obtidos para a estação IG estiveram entre $0,06$ e $0,16 \times 10^9$ bactérias.g⁻¹ e foram, em média, $0,11 \times 10^9$ bactérias.g⁻¹. Para a amostra PQ, as contagens bacterianas variaram de $1,17$ a $1,95 \times 10^9$ bactérias.g⁻¹, e o valor médio observado foi $1,50 \times 10^9$ bactérias.g⁻¹. Todos os valores estão dimensionados por peso úmido (PU) de sedimento.

Tabela III. Dados de abundância bacteriana obtidos da extração com metanol.

Amostra	Abundância (x 10 ⁹ bactérias.g ⁻¹ PU)	Média(x 10 ⁹)	dp (x 10 ⁹)
PQ	1,95	1,50	0,30
	1,17		
	1,38		
	1,75		
	1,28		
	1,49		
IG	0,11	0,11	0,03
	0,06		
	0,16		
	0,11		
	0,09		
	0,13		

(PU) Peso Úmido

Embora as contagens da extração com metanol observadas neste trabalho sejam coerentes com dados descritos na literatura (p.ex. DANOVARO *et al.*, 2002b; LUNA *et al.*, 2002), para regiões de profundidade semelhantes, os perfis citométricos apresentados pelas amostras não foi satisfatório. Para ambas as amostras analisadas foi observada a presença de intenso ruído, representado pelos pontos pretos localizados acima e à esquerda da área colorida na Figura 8. O ruído mencionado corresponde a partículas fluorescentes presentes na amostra que se distribuem fora da área de contagem das células procarióticas (SHAPIRO, 2003).

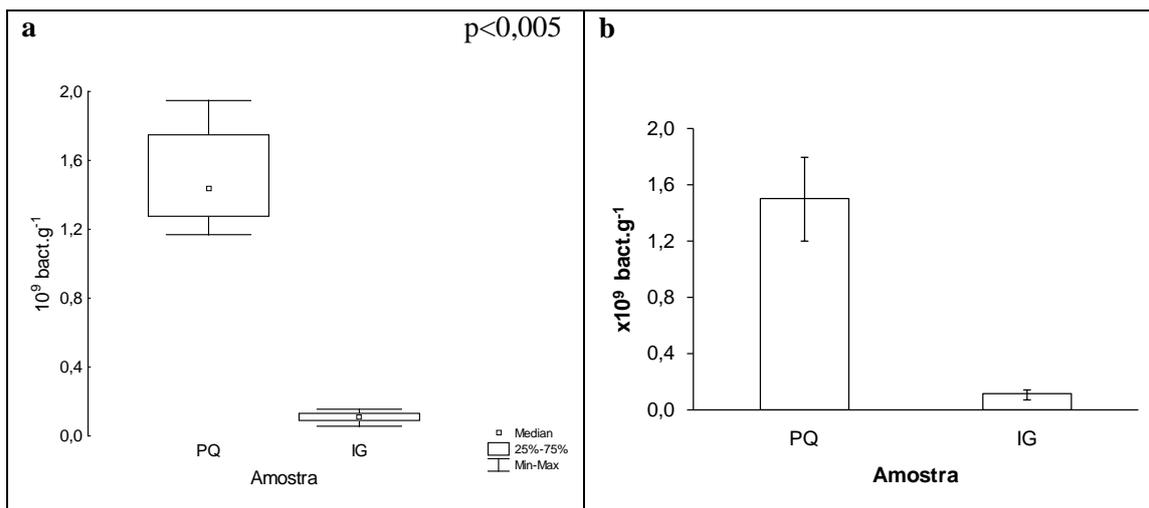


Figura 7. Resultados obtidos após extração com metanol. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^9$ bactérias.g⁻¹ PU) das amostras analisadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.

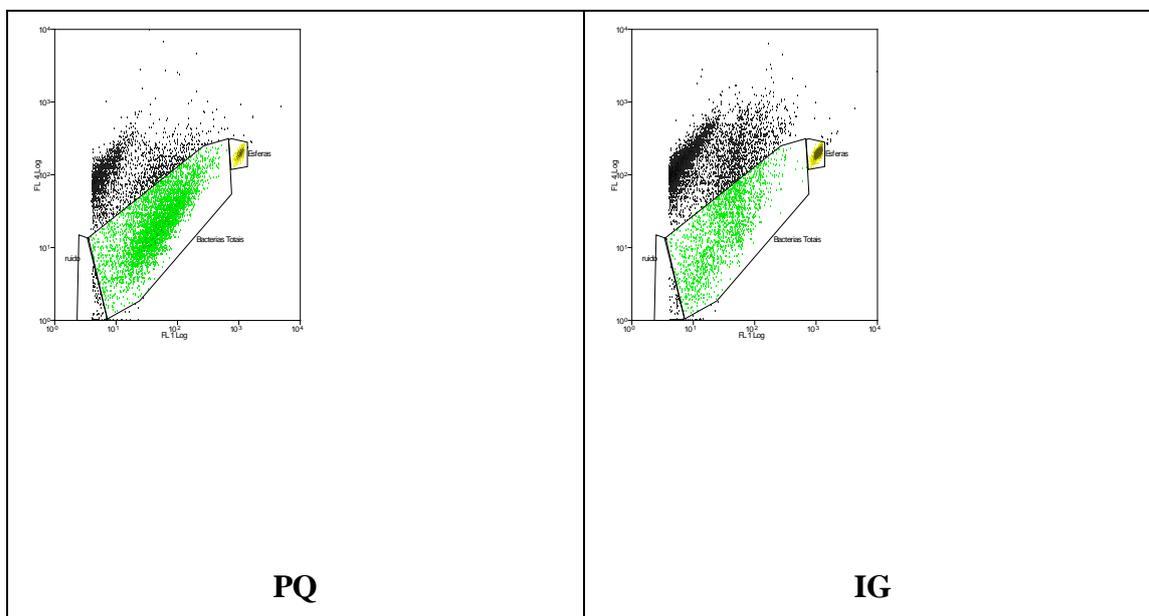


Figura 8. Perfis citométricos obtidos após extração com metanol para cada amostra de sedimento testada. Em amarelo podem ser observadas as esferas fluorescentes utilizadas para aferição, em preto o ruído e em verde estão as células procaríóticas enumeradas.

3.3.2. Método do Pirofosfato

3.3.2.1. Testes Preliminares

Teste da potência do sonicador

Neste teste foram avaliadas as proporções 25, 50, 75 e 100%, relativas a potencia nominal do processador ultrasônico (130 W). Esta avaliação foi de extrema importância,

pois a utilização deste tipo de equipamento em potências acima da ideal para esta aplicação pode resultar em considerável diminuição da abundância devido à ocorrência de lise celular. Entre as condições testadas, a potência de 75% foi a que apresentou os maiores valores (Figura 9), com valor médio igual a $1,07 \times 10^9$ bactérias.g⁻¹ e coeficiente de variação de 5%. De acordo com o teste de Tukey (utilizado para discriminar a diferença apontada pela análise de variância) foi possível observar dois grupos de dados estatisticamente homogêneos (Tabela IV). A potência de sonicação de 75% (grupo b) apresentou resultados que diferiram das demais potências – 25, 50 e 100% (grupo a).

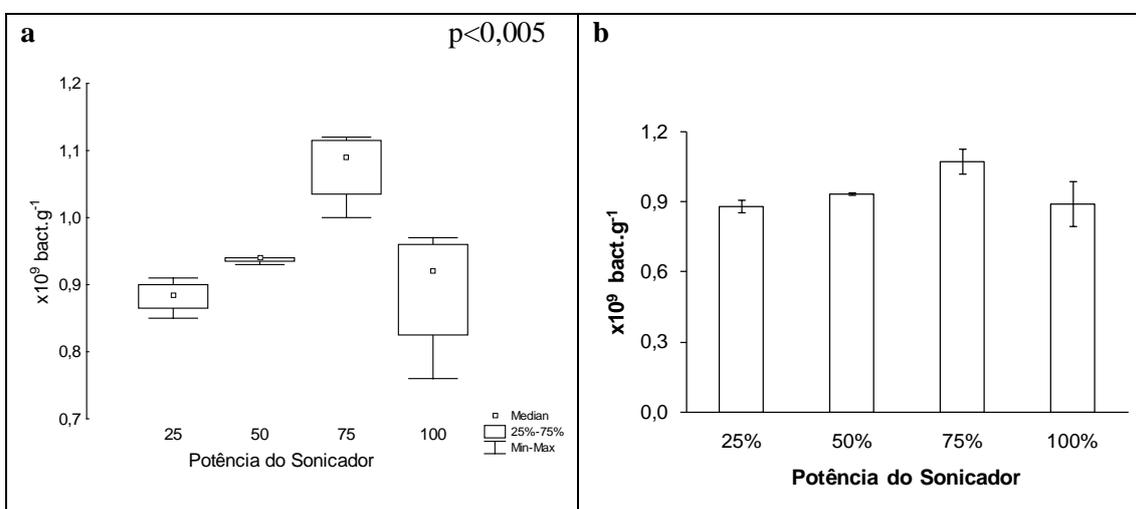


Figura 9. Resultados do teste da potência do sonicador. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($x10^9$ bactérias.g⁻¹ PU) para as potências testadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.

As abundâncias finais observadas após tratamento com as diferentes potências foram significativamente diferentes (ANOVA; $F = 9,64$; $p < 0,005$). A potência de 50% foi a que apresentou a menor variação entre os resultados ($CV < 1\%$), com abundância média de $0,94 \times 10^9$ bactérias.g⁻¹. As menores contagens foram obtidas utilizando-se a potência de 100%, que apresentou valor médio de $0,89 \times 10^9$ bactérias.g⁻¹ e a maior variação de dados ($CV = 11\%$) considerando-se as potências testadas. Os valores médios e coeficiente de variação para a potência de 25% foram $0,88 \times 10^9$ bactérias.g⁻¹ e 3%, respectivamente.

Tabela IV. Agrupamento dos dados de abundância bacteriana obtidos no teste da potência do sonicador. Agrupamento realizado de acordo com o Teste de Tukey.

Potência de Sonicação	Média (x10 ⁹ bactérias.g ⁻¹)	Grupos Homogêneos	
		Grupo 1	Grupo 2
25	0,88	a	
50	0,94	a	
75	1,07		b
100	0,89	a	

Influencia da temperatura do banho de incubação das amostras

Entre as condições testadas, o banho de incubação contendo apenas água apresentou abundâncias superiores às observadas para o banho de incubação contendo gelo, conforme ilustrado na Figura 10. A diferença observada, entretanto, não foi significativa (Teste T; $t = 1,58$; $p=0,1661$). O valor médio encontrado para a incubação com água e com gelo foi de $2,71$ e $2,28 \times 10^9$ bactérias.g⁻¹, respectivamente.

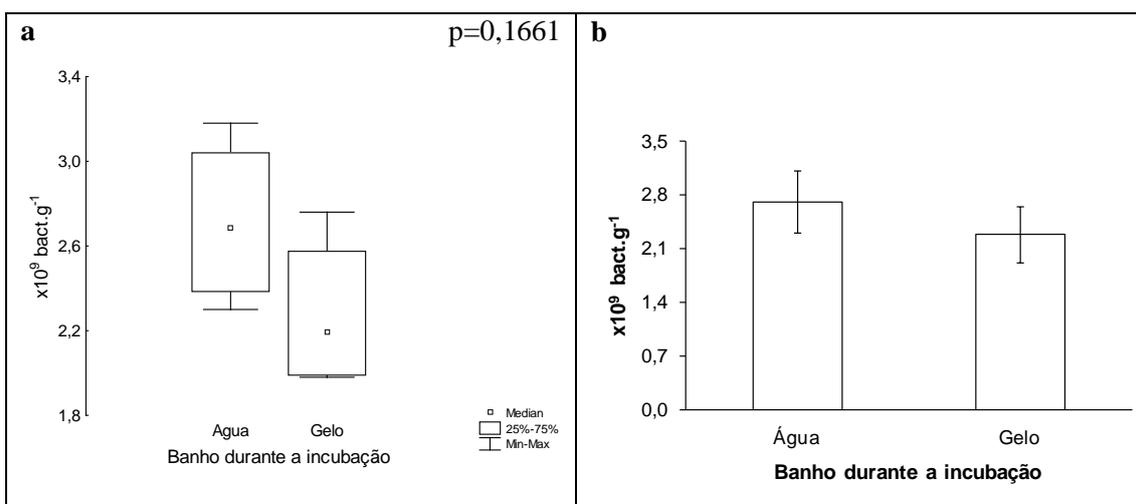


Figura 10. Resultados do teste da temperatura do banho de incubação das amostras. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana (x10⁹ bactérias.g⁻¹ PU) para as condições testadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.

O processo de extração das bactérias compreende, entre outras etapas, a adição de substâncias químicas com o objetivo de não somente separar as bactérias das partículas do sedimento, mas também impedir que as células se liguem novamente ao substrato (FRY, 1990). Durante o processo de extração, a adição de gelo ao banho de incubação pareceu ser um procedimento com chance de permitir adsorção das bactérias

já separadas. Isto foi observado pela redução da abundância bacteriana quando aplicado o banho de gelo.

A referência utilizada para a metodologia de extração com uso de pirofosfato (DUHAMEL & JACQUET, 2006) recomenda o banho de incubação com gelo. Apesar da diferença de valores observada no teste não ser significativa, nos testes seguintes e na análise das amostras para comparação entre as metodologias de extração foi utilizado apenas água (sem gelo) no banho de incubação das amostras (após a etapa de sonicação).

Tempo de incubação da amostra após a sonicação

Os resultados de abundância bacteriana de acordo com o tempo de incubação podem ser observados na Figura 11. Entre os tempos testados foi observada diferença significativa (ANOVA; $F = 3,40$; $p < 0,05$) e esta diferença foi atribuída provavelmente aos resultados observados para a incubação de 5 minutos.

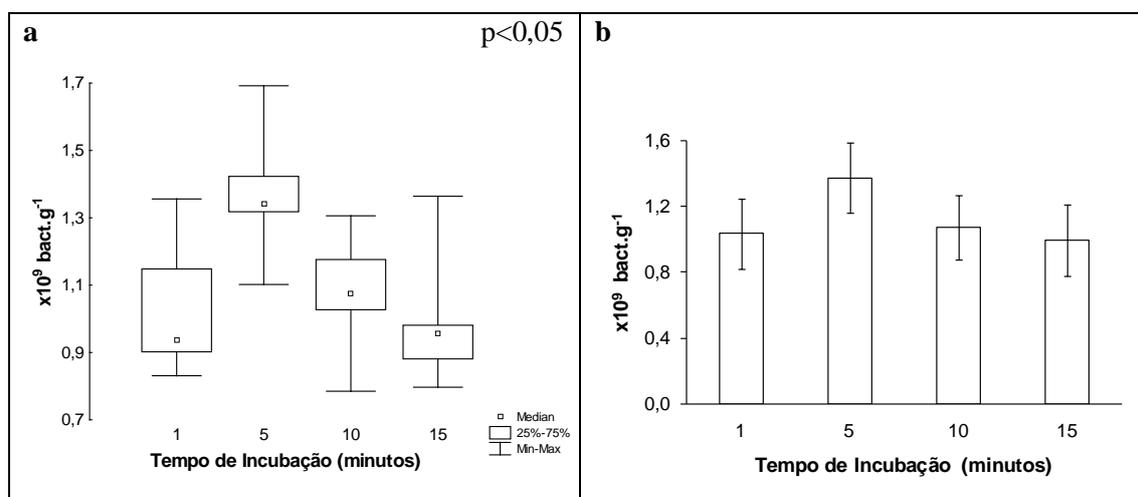


Figura 11. Resultados do teste do tempo de incubação das amostras. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^9$ bactérias.g⁻¹ PU) para os tempos testados. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.

Entre os tempos de incubação testados para depois da etapa de sonicação, cinco minutos em banho contendo apenas água foi o que apresentou melhor resultado, com abundâncias variando entre 1,10 e 1,69 $\times 10^9$ bactérias.g⁻¹. Este foi um resultado importante, pois contribuiu para reduzir o tempo gasto no processo de separação das bactérias da matriz do sedimento. DUHAMEL & JACQUET (2006) sugeriram

15 minutos de incubação em banho de gelo após a etapa de sonicação das amostras, entretanto, baseado nos resultados obtidos no presente estudo, foi comprovado que a melhor condição para a incubação pós-sonicação consiste de 5 minutos em banho contendo água a temperatura ambiente. A condição ótima obtida para esta etapa do processo de extração foi utilizada no teste seguinte e também na análise das amostras para comparação entre os métodos de separação testados.

Efeito do tempo sobre a abundância final após a centrifugação

Após a incubação, realizada depois da etapa de sonicação, foi realizada a centrifugação das amostras para posterior diluição e contagem. A distribuição da abundância em função da espera após a centrifugação está ilustrada na Figura 12. As maiores abundâncias foram obtidas preparando-se as amostras 1 e 15 minutos depois da centrifugação e os valores médios encontrados sob estas condições foram respectivamente $2,71$ e $2,18 \times 10^9$ bactérias.g⁻¹. A espera de 15 minutos após a centrifugação reduziu a abundância final em cerca de 20%. Esta redução alcançou 48% nas amostras preparadas para quantificação 60 minutos depois da centrifugação.

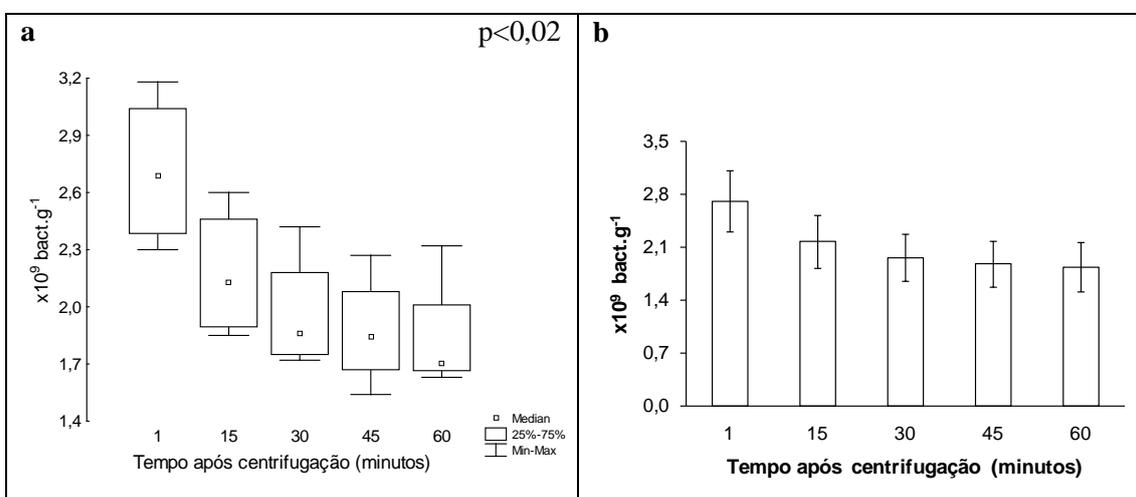


Figura 12. Resultados do teste do tempo de espera após a centrifugação das amostras. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^9$ bactérias.g⁻¹ PU) para os tempos testados. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.

Foi observada evidente diminuição da abundância com o aumento do tempo de espera e a diferença de valores entre os tempos testados foi significativa (ANOVA; $F = 4,50$; $p < 0,02$). De acordo com o teste de Tukey (utilizado para discriminar a

diferença apontada pela análise de variância) foi possível observar dois grupos de dados estatisticamente homogêneos (Tabela V). O tempo de espera de 15 minutos apresentou resultados intermediários entre o tempo 1 minuto (grupo a) e os tempos 30, 45 e 60 minutos (grupo b) e por este motivo foi considerado, dentro da análise estatística, nos dois grupos de dados.

A partir dos dados obtidos com este teste foi possível concluir que as amostras tratadas devem ser preparadas para quantificação por citometria imediatamente após a centrifugação (cerca de 1 minuto), para que a abundância final não seja subestimada. Este foi o procedimento adotado posteriormente na análise das amostras de sedimento destinadas à comparação entre os métodos de extração testados.

Tabela V. Agrupamento dos dados de abundância bacteriana obtidos no teste do tempo de espera após centrifugação das amostras. Agrupamento realizado de acordo com o Teste de Tukey.

Tempo de Centrifugação	Média (x10 ⁹ bactérias.g ⁻¹)	Grupos Homogêneos	
		Grupo 1	Grupo 2
1	2,71	a	
15	2,18	a	b
30	1,97		b
45	1,88		b
60	1,84		b

3.3.2.2. Extração Bacteriana com uso de Pirofosfato de Sódio

Os dados individuais de abundância bacteriana, obtidos após extração com pirofosfato de sódio, estão descritos na Tabela VI. Conforme representação gráfica dos resultados, ilustrada na Figura 13, foi possível observar diferença de valores bastante significativa entre as duas amostras testadas (Mann-Whitney, U=0; p<0,005). A amostra PQ apresentou valores distribuídos entre 2,68 e 3,15 x 10⁹ bactérias.g⁻¹, com média igual a 2,93 x 10⁹ bactérias.g⁻¹. Para a amostra IG, foram observadas abundâncias variando de 1,19 a 1,64 x 10⁹ bactérias.g⁻¹ com valor médio 1,44 x 10⁹ bactérias.g⁻¹.

Devido à insuficiência de dados de abundância bacteriana em baías, os dados obtidos nos testes do presente trabalho foram comparados com resultados de amostras de outros locais, com profundidades semelhantes. LUNA *et al.* (2002) encontrou valores de abundância entre 0,15 e 5,3 x 10⁹ bactérias.g⁻¹ (peso seco) para amostras do Mar Adriático com profundidades entre 9 e 12 m. Os dados observados por este

pesquisadores estiveram em uma ampla faixa de valores, dentro da qual poderiam ser incluídos os resultados aqui apresentados para as amostras da Baía de Guanabara.

Tabela VI. Dados de abundância bacteriana obtidos da extração com pirofosfato.

Amostra	Abundância (x 10 ⁹ bactérias.g ⁻¹ PU)	Média (x 10 ⁹)	dp (x 10 ⁹)
PQ	3,07	2,93	0,21
	3,13		
	2,79		
	2,68		
	3,15		
	2,78		
IG	1,30	1,44	0,18
	1,39		
	1,19		
	1,58		
	1,64		
	1,55		

(PU) Peso Úmido

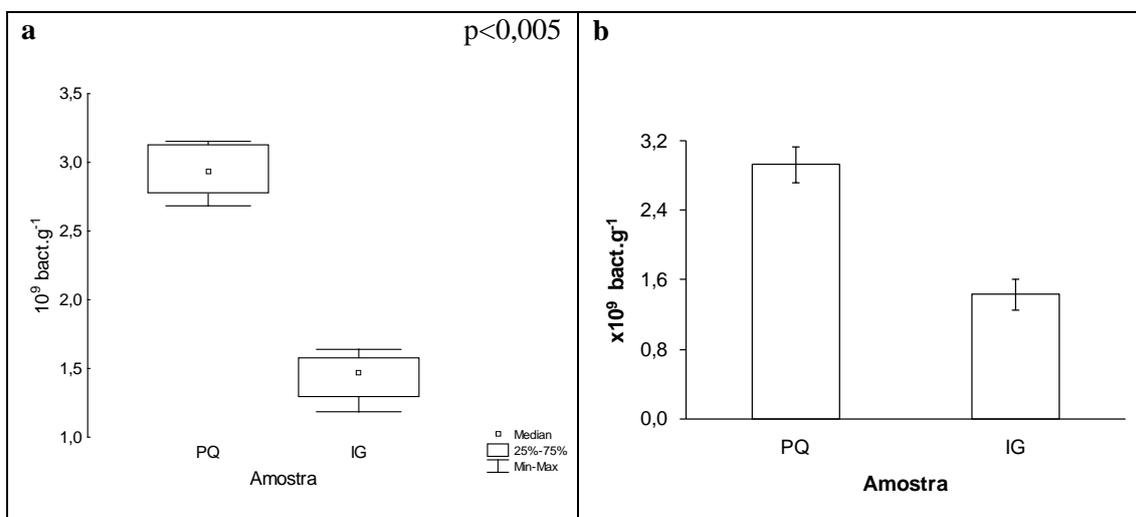


Figura 13. Resultados obtidos após extração com pirofosfato de sódio. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana (x10⁹ bactérias.g⁻¹ PU) das amostras analisadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.

Além da produção de dados comparáveis com a literatura, para profundidades semelhantes (p.ex. LUNA *et al.*, 2002; DANOVARO *et al.*, 2002b), a extração com pirofosfato possibilitou a obtenção de amostras com perfis citométricos bastante satisfatórios. Conforme ilustrado na Figura 14, baixa quantidade de ruído ao redor da

área de contagem foi observada para ambas as amostras. A presença de pouco ruído (representado pelos pontos pretos localizados acima e à esquerda da área colorida demarcada na Figura) indicou elevada eficiência de separação das células bacterianas (pontos representados em verde) a partir de amostras de sedimento.

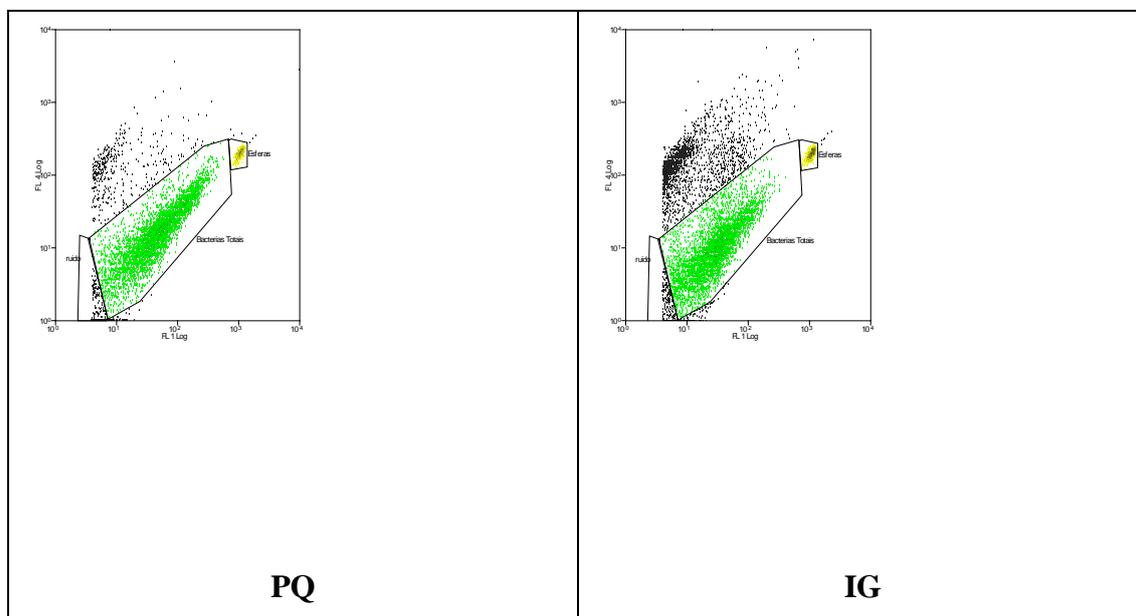


Figura 14. Perfis citométricos obtidos após extração com pirofosfato para cada amostra de sedimento testada. Em amarelo podem ser observadas as esferas fluorescentes utilizadas para aferição, em preto o ruído e em verde estão as células procaríóticas enumeradas.

3.3.3. Comparação entre os Métodos – Metanol x Pirofosfato

A comparação entre os métodos foi realizada a partir da análise das duas amostras coletadas na Baía de Guanabara. Na análise das amostras foram utilizados os procedimentos otimizados dos métodos de extração com pirofosfato e metanol.

Os parâmetros utilizados para avaliar a eficiência e aplicabilidade dos métodos de extração testados indicaram o método baseado no uso de pirofosfato como o mais adequado para utilização em amostras de sedimento. Conforme ilustrado na Figura 15, as maiores abundâncias, para as duas amostras testadas, foram obtidas após extração com pirofosfato e a diferença de valores observada foi significativa (ANOVA; $F = 196,37$; $p < 0,001$).

Analisando os valores médios encontrados para as duas amostras (Tabela VII) foi observado que quando extraída com metanol a amostra IG apresentou a menor abundância ($0,11 \pm 0,03 \times 10^9$ bactérias.g⁻¹) e esta foi bastante inferior à observada para a

mesma amostra extraída com pirofosfato de sódio ($1,44 \pm 0,18 \times 10^9$ bactérias.g⁻¹). Enquanto a extração com pirofosfato apresentou para a amostra IG, resultados cerca de 50% inferiores aos da amostra PQ ($2,93 \pm 0,21 \times 10^9$ bactérias.g⁻¹), o método de extração com metanol obteve resultados para a amostra PQ ($1,50 \pm 0,30 \times 10^9$ bactérias.g⁻¹) mais de dez vezes superior aos encontrados para a amostra IG. Deste modo, se observou que as abundâncias obtidas após extração com metanol foram bastante subestimadas, em especial para a amostra IG. É possível que esta metodologia de extração seja mais adequada a outros tipos de amostra com composição química e de partículas diferentes, como por ex. águas turvas e biofilmes (LUNAU *et al.* 2005).

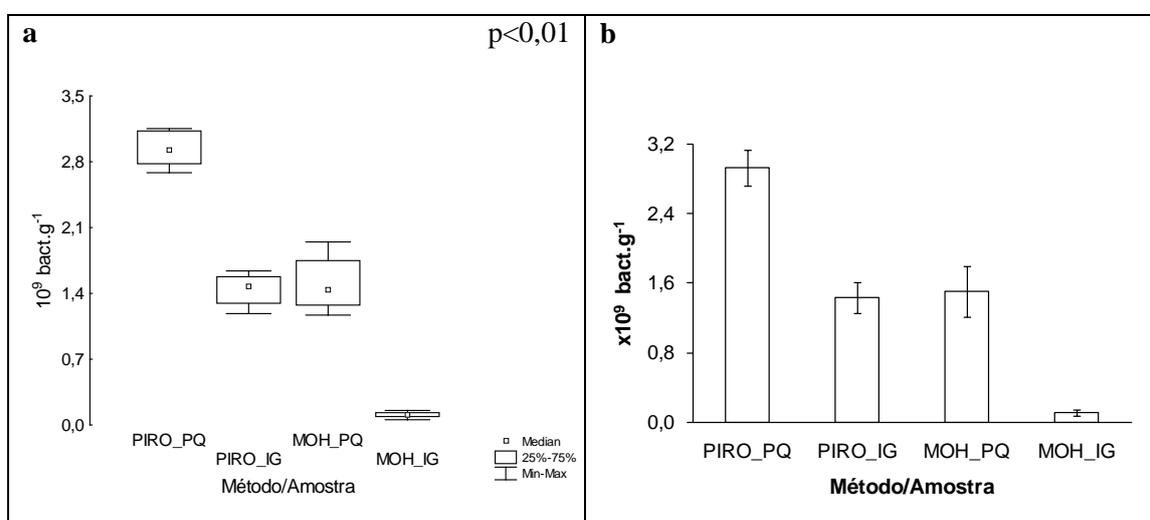


Figura 15. Resultados obtidos após extração com pirofosfato de sódio (PIRO) e metanol (MOH) para as duas amostras analisadas. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^9$ bactérias.g⁻¹). As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.

Tabela VII. Dados de abundância bacteriana obtidos da extração com metanol e pirofosfato.

Método	Amostra	Média ($\times 10^9$ bact.g ⁻¹)	dp ($\times 10^9$ bact.g ⁻¹)	CV%
Metanol	PQ	1,50	0,30	20
	IG	0,11	0,03	31
Pirofosfato	PQ	2,93	0,21	7
	IG	1,44	0,18	12

A reprodutibilidade observada para a extração com pirofosfato também foi superior à obtida após extração com metanol. Isto foi observado comparando-se os coeficientes de variação obtidos entre as réplicas das amostras testadas, analisadas por

cada um dos métodos (Tabela VII) – 7 e 12% após extração com pirofosfato e 20 e 31% para extração com metanol. Além disso, quando comparados aos citogramas obtidos após extração com metanol (Figura 8), os perfis citométricos encontrados para a extração com pirofosfato (Figura 14) exibiram maior separação entre as células procarióticas extraídas e as partículas presentes na amostra.

Outro fator considerado importante foi a maior “limpeza” e menor quantidade de ruído observada nos citogramas produzidos pelo método do pirofosfato. Conforme mencionado anteriormente, o ruído é causado por partículas fluorescentes (SHAPIRO, 2003) que devem ser eliminadas durante o processo de extração, sendo considerado mais eficiente o método que removeu a maior proporção destas partículas.

3.4. CONCLUSÃO

O método baseado no uso do metanol é um método relativamente recente (LUNAU *et al.*, 2005) e possivelmente devido a este fato não existem muitos trabalhos publicados que mencionam seu uso. Por este motivo, os dados obtidos a partir desta metodologia são de difícil comparação com os demais existentes na literatura. Já o uso de pirofosfato está amplamente difundido na literatura desde a década de 70 (MEYER-REIL *et al.*, 1978; VELJI & ALBRIGHT, 1986a e 1986b; BOTT & KAPLAN, 1990; FRY, 1990; PARKES *et al.*, 1994; EPSTEIN & ROSSEL, 1995; WIT *et al.*, 1997; DUHAMEL & JACQUET, 2006; AMALFITANO & FAZI, 2008; AMALFITANO *et al.*, 2009).

No presente trabalho, testes preliminares realizados para eliminar incertezas metodológicas possibilitaram a otimização do procedimento descrito por DUHAMEL & JACQUET (2006). As modificações do método original foram validadas após terem sido obtidos valores de abundância superiores às observadas com o procedimento original. O protocolo otimizado de extração bacteriana com pirofosfato de sódio está ilustrado na Figura 6. A citometria em fluxo, utilizada na quantificação da abundância para todas as amostras testadas, possibilitou a rápida contagem das amostras, contribuindo para um maior desempenho e reprodutibilidade nos testes realizados. Em face de todos os dados propostos, o método de extração baseado no uso de pirofosfato de sódio se mostrou mais eficiente para extração bacteriana em amostras de sedimento que o método que utiliza o metanol.

A enumeração é uma das etapas importante no estudo dos microrganismos em amostras naturais, podendo ser utilizada como um índice geral de atividade e como uma medida de biomassa (JANNASCH & JONES, 1959). O presente estudo é uma contribuição para as pesquisas de ecologia microbiana em sedimentos, em função de apresentar uma otimização dos protocolos existentes para a extração de células procarióticas deste tipo de matriz.

Capítulo 3

4. ABUNDÂNCIA BACTERIANA NOS SEDIMENTOS DA BACIA DE CAMPOS

4.1. INTRODUÇÃO

A presença de bactérias na água e no sedimento de oceanos profundos foi uma das primeiras descobertas em microbiologia marinha, descrita no final do século XIX por CERTES (1884) e referenciada por GAGE & TYLER (1991) e PATCHING & EARDLY (1997). Porém, por muito tempo a importância dos microrganismos no metabolismo de sedimentos profundos permaneceu desconhecida. No final da década de 60, o incidente ocorrido com o submersível Alvin (JANNASCH *et al.*, 1971) teve grande repercussão após seu resgate depois de mais de 10 meses de uma profundidade de 1.540 m. A caixa de lanches que afundou a bordo do submersível continha sanduíches e maçãs em estado de conservação surpreendente, sem indícios aparentes de degradação microbiana, o que reforçou ainda mais a visão do fundo oceânico como ambiente empobrecido (PATCHING & EARDLY, 1997; MASCARELLI, 2009).

Estudos subsequentes desenvolvidos *in situ* ou sob condições *in situ* simuladas indicaram que populações bacterianas de oceano profundo eram relativamente inativas e não adaptadas ao seu ambiente (JANNASCH & TAYLOR, 1984). Tais investigações se concentraram na medida de taxas metabólicas relativas a substratos orgânicos específicos, e as atividades medidas sob pressões *in situ* foram consideravelmente menores que as observadas em amostras controle mantidas sob pressão atmosférica. Deste modo, comunidades bacterianas de sedimentos profundos pareciam se comportar de modo semelhante às comunidades de superfície (JANNASCH & TAYLOR, 1984; PATCHING & EARDLY, 1997). Desde então, os microrganismos marinhos têm sido alvo de inúmeros estudos, proporcionando assim avanços importantes no campo da ecologia microbiana (EPSTEIN & ROSSEL, 1995) e do estudo do mar profundo de modo geral (JØRGENSEN & BOETIUS, 2007).

Atualmente se sabe que o fundo oceânico é altamente dinâmico (JØRGENSEN & BOETIUS, 2007) e que os microrganismos são os principais componentes do material orgânico particulado na zona oceânica afótica (PATCHING & EARDLY, 1997), chegando a contribuir com até 90% da biomassa bentônica de sedimentos profundos (Quéric *et al.*, 2004). As bactérias desempenham um papel chave em todos os principais ciclos biogeoquímicos nos sedimentos profundos (TURLEY & DIXON, 2002; QUÉRIC *et al.*, 2004). O ciclo global do carbono é, sem dúvida, o mais afetado

pela ação dos microrganismos (REX *et al.*, 2006), os quais também influenciam os ciclos do fósforo, nitrogênio, enxofre, ferro, manganês e silício (ZOBELL & MORITA, 1959; JØRGENSEN & BOETIUS, 2007).

Nos sedimentos marinhos profundos, localizados distante da zona fótica, a dinâmica microbiana e o metabolismo bacteriano são limitados (PATCHING & EARDLY, 1997; GAGE & TYLER, 1991). O assoalho marinho e a camada de água imediatamente superior constituem um ecossistema quase que totalmente heterotrófico onde o metabolismo da biota dependente da quebra de moléculas orgânicas complexas provenientes da zona fótica (exceto em fontes hidrotermais, e em fontes frias) (GAGE, 2003). Entre os fatores que podem controlar a dinâmica bacteriana em sedimentos profundos estão incluídos: 1) características físicas, tais como temperatura e tipo de sedimento; 2) características químicas, tais como conteúdo de matéria orgânica, concentração de compostos lábeis e concentração de compostos tóxicos; e 3) processos biológicos tais como predação e mortalidade por infecção viral (MONTAGNA, 1984; MEYER-REIL, 1987; DANOVARO & FABIANO, 1995; DANOVARO & SERRESI, 2000). Considerando que a distribuição bacteriana é estreitamente relacionada às propriedades do sedimento (DANOVARO & FABIANO, 1995), a abundância bacteriana pode ser utilizada como um forte indicativo de mudanças no fluxo de nutrientes ao fundo oceânico, resultante de variações sazonais e interanuais (DANOVARO *et al.*, 1999) e de outras mudanças ambientais (PFANNKUCHE *et al.*, 1999; TURLEY & DIXON, 2002)

Neste contexto, o presente estudo tem por objetivo avaliar a distribuição das bactérias nos sedimentos da Bacia de Campos compreendida entre 21°50' e 22°50'S, e 39°30' e 40°30'W, fornecendo assim dados pioneiros de abundância bacteriana nesta região. Além disso, objetiva-se correlacionar esta distribuição com características ambientais, como a profundidade local, e com os parâmetros abióticos analisados nestes sedimentos. Este trabalho faz parte do projeto de Caracterização Ambiental do Oceano Profundo da Bacia de Campos (OCEANPROF), projeto interdisciplinar, que envolveu pesquisadores da UFRJ, UERJ, PUC, UENF, USP e INPE. Financiado pelo CENPES-PETROBRAS foi composto de quatro operações ou campanhas: operação Roncador, realizada em outubro de 2001, operação ALBACAR, em maio de 2002, operação OCEANPROF I, em novembro de 2002, e operação OCEANPROF II, em junho de 2003. No presente estudo foram apresentados apenas os dados obtidos nas operações OCEANPROF I e OCEANPROF II.

4.2. ÁREA DE ESTUDO

A Bacia de Campos está localizada na margem sudoeste do Oceano Atlântico Sul e ocupa uma porção da margem continental do Brasil entre 20,5°S (cidade de Vitória) e 24°S (Arraial do Cabo) em uma área de mais de 100 mil quilômetros quadrados (VIANA *et al.*, 1998). Considerada a maior reserva petrolífera do Brasil, a Bacia de Campos atualmente é responsável por aproximadamente 84% da produção nacional de petróleo, com uma produção diária de cerca de 1,49 milhões de barris de óleo e 22 milhões de metros cúbicos de gás (PETROBRAS, 2001 e 2010).

Mais de 70% da Bacia de Campos é de águas profundas, superiores a 200 m. A plataforma continental tem uma largura média de 100 km e a quebra da plataforma varia de 80m de coluna d'água, ao norte, a 130 m de coluna d'água, no sul, com uma profundidade média de 110 m. O talude se estende por 40 km com gradiente médio de 2,5° (VIANA *et al.*, 1998).

As amostras de sedimento analisadas foram coletadas nos anos de 2002 e 2003, em cruzeiros oceanográficos da campanha OceanProf. A área estudada foi dividida em Norte e Sul. A delimitação da área Norte consistiu da porção do litoral brasileiro limitada entre 21°52' e 22°37'S e 39°30' e 39°57'O. Já a área Sul ficou distribuída entre 22°40' e 22°50'S e 39°57' e 40°30'O.

4.3. HIPÓTESES

Com base nas informações disponíveis na literatura e considerando os fatores que podem influenciar a abundância bacteriana nos sedimentos marinhos, as seguintes hipóteses de trabalho foram levantadas:

- A distribuição das bactérias nos sedimentos marinhos está associada à distribuição da matéria orgânica nestes sedimentos.
- A abundância bacteriana na área de estudo diminui com o aumento da profundidade local.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1. Coleta das Amostras

As estações de coleta ($n = 44$) foram distribuídas sobre as isóbatas de 750, 1050, 1350, 1650 e 1950 m de profundidade, nas áreas Norte e Sul da Bacia de Campos (Figura 16). A mesma malha amostral praticada na campanha de verão, realizada em novembro de 2002, foi adotada para a campanha de inverno que ocorreu em junho de 2003.

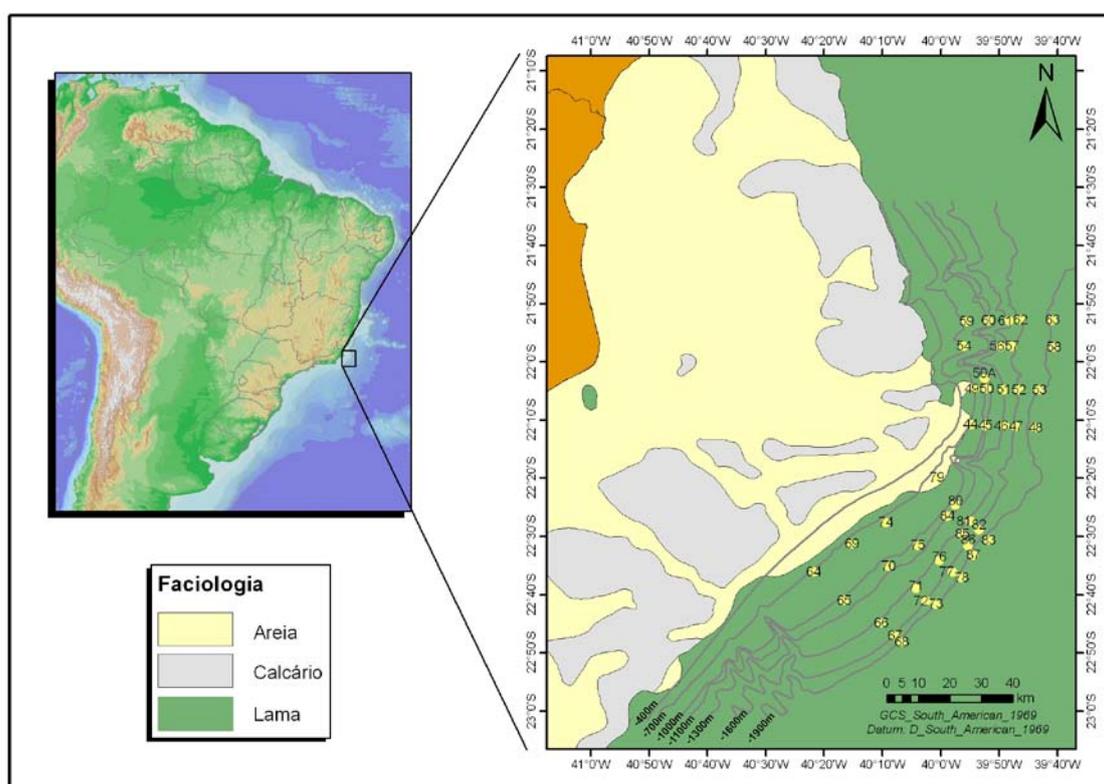


Figura 16. Mapa da Bacia de Campos com as estações de coleta (Fonte: CENPES/PETROBRAS).

As coordenadas de cada uma das estações de coleta estão descritas na Tabela VIII. As coletas foram realizadas a bordo do N/RB. Astro Garoupa e em ambas as campanhas foi adotado o mesmo procedimento de coleta e preservação das amostras de sedimento para a análise de abundância bacteriana. As coordenadas dos pontos de coleta estão em UTM (DATUM SAD – 69).

Tabela VIII. Área, profundidade da isóbata e coordenadas (DATUM SAD – 69) das estações de coleta visitadas nas campanhas de verão (2002) e inverno (2003).

Área	Prof. Isóbata	Estação	Latitude (L) UTM	Longitude (N) UTM
Norte	750	44	405893	7547079
		49	406972	7558419
		54	403604	7571854
		59	404405	7579772
	1050	45	410106	7546764
		50	410441	7558463
		50A*	409873	7561629
	1350	60	410960	7580095
		46	415788	7546760
		51	415506	7558200
		56	414600	7571966
	1650	61	417010	7580105
		47	419110	7546506
		52	419999	7558198
		57	417865	7571980
	1950	62	420290	7580410
48		424825	7546159	
53		426004	7558168	
58		430195	7571697	
Sul	750	63	429813	7580374
		64	359936	7499994
		69	371121	7509028
		74	381008	7515900
	1050	79	396008	7530200
		65	369010	7491006
		70	381974	7501978
		75	390572	7508692
	1350	80	401414	7521580
		84	399047	7517993
		66	379987	7483999
		71	389992	7494991
	1650	76	396892	7503893
		81	405951	7516461
		85	403486	7512296
		67	383961	7480018
1950	72	393005	7491009	
	77	400790	7500302	
	82	408430	7513693	
	86	405309	7508554	
	68	385995	7477996	
	73	395980	7490064	
	78	403490	7498501	
	83	411275	7510453	
		87	406831	7505695

*substituiu a estação 55

Amostras de sedimento foram coletadas nas 44 estações com o auxílio de um box-corer da *Ocean Instruments*, do tipo USNEL SPADE CORER MK I (50 x 50 cm)

(Figura 17). Em cada lançamento, após o recolhimento do equipamento a bordo, a água da interface com o sedimento foi cuidadosamente retirada com um sifão e passada por uma peneira de 300 μm para evitar perda de material que eventualmente seja sugado pelo sifão (Figura 18). Após este procedimento, testemunhos do tipo “*vegematic*” (colméia), foram inseridos na região central do box-corer para posterior estratificação do sedimento (Figura 19), sendo apenas 1 testemunho utilizado para a análise de abundância bacteriana.



Figura 17. Coletor de fundo do tipo box-corer utilizado na coleta das amostras.

Para análise do material, cada testemunho foi estratificado no mínimo em: 0.2 cm da camada superficial; 2-5 cm e de 5-10 cm, totalizando três estratos por cada testemunho. Para os três estratos obtidos foram realizadas as seguintes análises: granulometria, carbonato, matéria orgânica, carbono orgânico e inorgânico, nitrogênio total, fósforo e metais. Para a análise de abundância bacteriana, alíquotas da camada

superior do sedimento (0.2 cm) foram transferidas para tubos criogênicos de 2 mL estéreis com o auxílio de espátulas de madeira (previamente esterilizadas em autoclave). Imediatamente após a coleta as amostras foram preservadas em nitrogênio líquido, onde permaneceram até o processamento das amostras em laboratório. Durante todo o procedimento foram utilizadas luvas de procedimento estéreis.



Figura 18. Retirada da água de interface com o sedimento.



Figura 19. Amostra de sedimento após inserção das colméias.

4.4.2. Análise em Laboratório

Em laboratório as amostras de sedimento foram descongeladas e fixadas com paraformaldeído (concentração final 2%), conforme ilustrado na Figura 20. Aliquotas de 0,5 g de sedimento foram pesadas com o auxílio de uma balança analítica certificada Ohaus[®], com precisão de quatro casas decimais, em tubos de ensaio de polipropileno estéreis. Aos sedimentos pesados foram adicionados 3 mL de formol (concentração final 2%) e os tubos foram homogeneizados manualmente, refrigerados por 30 minutos e posteriormente congelados em freezer -20°C. As amostras fixadas permaneceram congeladas até o momento da análise.

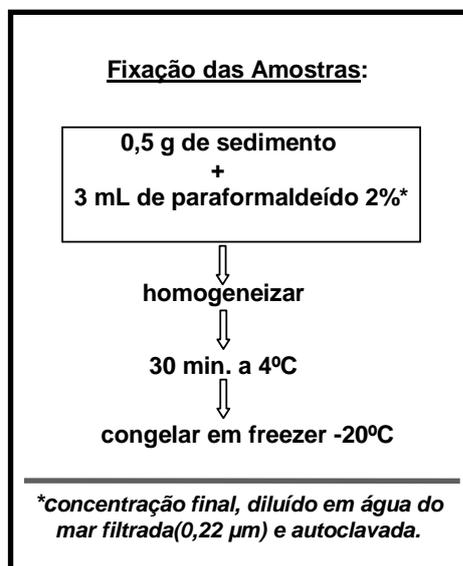


Figura 20. Esquema do procedimento de fixação das amostras.

A análise de abundância bacteriana nas amostras de sedimento coletadas foi precedida pela extração com pirofosfato de sódio. Esta metodologia de extração proposta por DANOVARO *et al.* (2001) e DUHAMEL & JACQUET (2006) teve alguns procedimentos testados e modificados (ver capítulo 2). O diagrama esquemático da metodologia de extração utilizada na análise das amostras coletadas na Bacia de Campos está ilustrado na Figura 21.

As amostras congeladas na etapa de fixação foram descongeladas sobre a bancada até atingirem temperatura ambiente. Aos tubos contendo amostra de sedimento adicionou-se 5 µL de Tween 80 10% (diluído com água ultra pura), 1 mL de pirofosfato de sódio 10 mM e 4 mL de água do mar estéril (filtrada em membrana 0,22 µm e

autoclavada). Os tubos foram agitados manualmente e em seguida sonicados durante 3 minutos (potência de 75%; $\cong 58$ W), com interrupção de 30 segundos a cada minuto. Durante o intervalo entre os tempos de sonicação as amostras foram homogeneizadas manualmente.

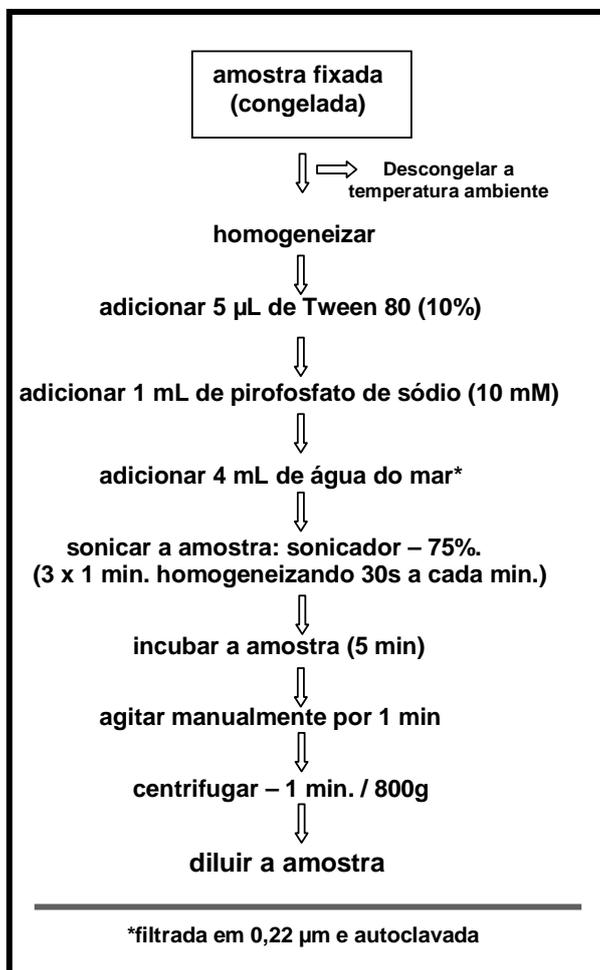


Figura 21. Esquema do procedimento de extração bacteriana com pirofosfato de sódio.

Após a sonicação as amostras foram incubadas em recipiente contendo água durante 5 minutos. Finalizada a incubação as amostras foram homogeneizadas manualmente por 1 minuto e centrifugadas (800g/1 min.). As amostras centrifugadas foram imediatamente diluídas 25x em tampão fosfato livre de partículas (filtrado com membrana 0,22 µm) e coradas com Syto 13. As células procarióticas em suspensão presentes nas amostras tratadas foram enumeradas por citometria em fluxo, conforme descrito mais adiante (subitem 4.4.3). Em todos os procedimentos foram utilizadas pipetas automáticas calibradas, membranas filtrantes estéreis e tubos e ponteiros previamente esterilizados em autoclave.

4.4.3. Determinação da Abundância por Citometria em Fluxo

A abundância bacteriana total nos sedimentos tratados foi determinada após a coloração dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) com o fluorocromo Syto13 (Molecular Probes, ref. S-7575) a 2.5 μM . Este procedimento é baseado nos trabalhos de DEL GIORGIO *et al.* (1996) e GASOL & DEL GIOGIO (2000) e tem sido utilizado rotineiramente no laboratório de Hidrobiologia do Instituto de Biologia - UFRJ para análise de abundância bacteriana em amostras de água (ANDRADE *et al.*, 2003). Com o desenvolvimento do presente trabalho, a metodologia de determinação da abundância bacteriana por citometria em fluxo foi validada também para amostras de sedimento.

Para cada 250 μL de amostra de sedimento tratada e já diluída, foram utilizados 10 μL da solução de trabalho de Syto13. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 15 segundos e incubadas no escuro por 15 minutos. Após este período, esferas fluorescentes de látex foram adicionadas em abundância conhecida a cada amostra para calibração do espalhamento lateral e dos sinais de fluorescência verde, e como padrão interno para as contagens e medidas citométricas. A concentração da solução padrão de esferas foi determinada por microscopia de epifluorescência, de acordo com LEBARON *et al.* (1994). Em seguida à adição da solução de esferas as amostras foram mantidas em recipiente protegido de luz até o momento da leitura no citômetro (entre 20 e 40 minutos).

Para detecção foi usado um citômetro CyAn ADP (DakoCytomation), equipado com um laser de estado sólido (488 nm, 25 mW) e com modificações no filtros (verde FL1 em 510 ± 15 nm, e vermelho FL4 em 650 ± 10 nm). Para aquisição e processamento dos dados foi empregado o programa Summit versão 4.3 (DakoCytomation). Vale ressaltar que todos os dados de abundância obtidos neste trabalho foram dimensionados como número de células ou bactérias (bact) por massa úmida de sedimento (padronizada como 1 g).

A abundância total de células procarióticas baseada na contagem de células coradas e esferas fluorescentes foi determinada pela fórmula: [(bactéria/ esferas { ambas contadas por citometria}) x esferas/ml {contadas por microscopia}] (DEL GIORGIO *et al.*, 1996; GASOL *et al.*, 1999).

4.4.4. Análises Estatísticas

Na análise dos dados foi empregada estatística descritiva básica e foram calculados valores médios, desvios padrão, coeficientes de variação e valores mínimos e máximos para as variáveis analisadas. Os dados de abundância obtidos nos testes foram analisados primeiramente em relação à parametricidade, através dos testes de Kolmogorov-Smirnov (normalidade), como proposto por ZAR (1999).

As análises de variância foram utilizadas a fim de comparar a significância dos valores de abundância bacteriana entre: (1) as diferentes profundidades de coleta, (2) as áreas de amostragem – norte e sul e (3) as duas campanhas realizadas – verão e inverno. De acordo com a característica do conjunto de dados avaliado foram realizadas análises não paramétricas. Para as comparações dos valores médios entre as áreas e campanhas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Nas comparações entre as profundidades foi aplicada a análise de Kruskal-Wallis e para discriminar as diferenças significativas apontadas pela análise de variância foi utilizada uma Comparação Múltipla de Médias (Kruskal-Wallis).

Correlações de Spearman foram utilizadas para estabelecer quais fatores ambientais (dados físico-químicos do sedimento) estiveram mais relacionados aos parâmetros bacterianos. As correlações foram consideradas significativas quando o nível de significância de 95% ($p < 0,05$) foi alcançado. As análises inferenciais, análises de variância e correlações foram efetuadas utilizando-se o programa Statistica[®] 7.0.

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1. Dados de Abundância Bacteriana

4.5.1.1. Campanha de Verão – 2002

Os dados de abundância bacteriana total obtidos na campanha de verão variaram entre $1,06$ e $5,88 \times 10^7$ bactérias.g⁻¹ (Tabela IX). Os valores médios obtidos para as áreas norte e sul foram respectivamente $2,89 \pm 1,27$ e $2,51 \pm 1,13 \times 10^7$ bactérias.g⁻¹. Foi observada grande homogeneidade espacial para toda a região de estudo, de modo que entre as áreas norte e sul não se observou diferença na abundância bacteriana (Mann-Whitney; $U = 146$; $p=0,2041$; Figura 22). A Figura 23 ilustra a distribuição dos dados agrupando-se os resultados das áreas norte e sul em função da profundidade de obtenção da amostra.

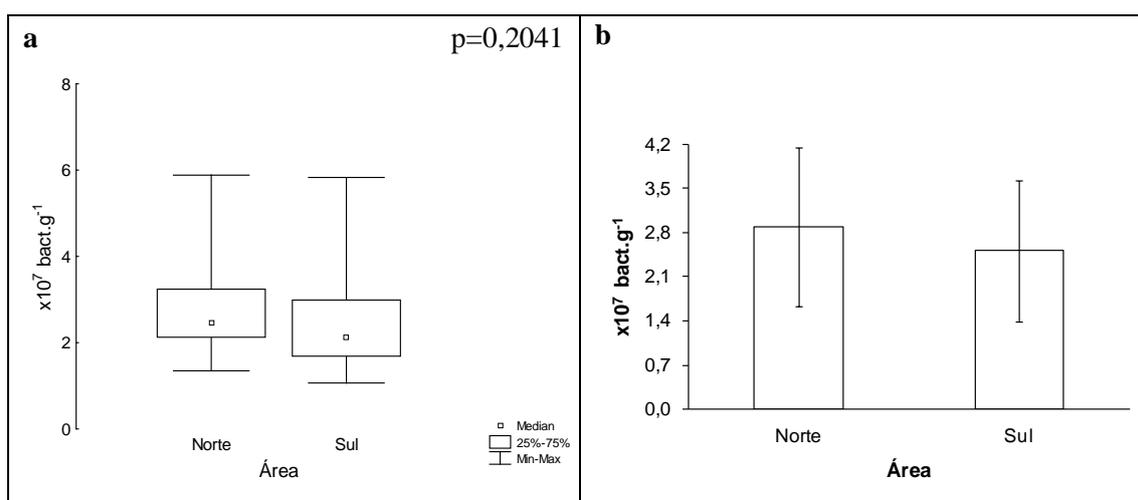


Figura 22. Resultados da campanha de verão obtidos para as áreas Norte e Sul. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^7$ bactérias.g⁻¹) das amostras analisadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.

A diferença de abundância observada entre as profundidades de coleta não foi significativa (Kruskal-Wallis; $H=4,83$; $p=0,3047$). Dentre todas as profundidades de coleta, 750 e 1050 m foram as que apresentaram os valores mais elevados (em média $3,65 \pm 1,63$ e $2,80 \pm 0,83 \times 10^7$ bactérias.g⁻¹, respectivamente). Já nas profundidades superiores a 1000 m (1350, 1650 e 1950 m) foram registrados os valores de abundância mais reduzidos, variando de 2,31 a $2,54 \times 10^7$ bactérias.g⁻¹. Além da estreita faixa de abundância, foi observada grande proximidade entre os valores de mediana para as

profundidades de 1350, 1650 e 1950 m (Figura 23), que foram respectivamente 1,89, 2,33 e $2,08 \times 10^7$ bactérias.g⁻¹.

Tabela IX. Dados de abundância bacteriana, valores médios e coeficientes de variação (por profundidade de coleta) obtidos na campanha de verão realizada em novembro de 2002.

Área	Prof.	Amostra	Abundância (x10 ⁷ bact.g ⁻¹)	Média (x10 ⁷ bact.g ⁻¹)	CV%
Norte	750	44	2,40	2,40	-
		49	*		
		54	*		
		59	*		
	1050	45	3,80	3,13	16
		50	3,07		
		50 A	3,00		
		60	2,63		
	1350	46	1,35	3,10	60
		51	2,04		
		56	5,59		
		61	3,41		
	1650	47	1,79	2,15	16
		52	2,21		
		57	2,46		
		62	*		
1950	48	5,88	3,13	59	
	53	2,48			
	58	2,35			
	63	1,82			
Sul	750	64	3,80	3,96	43
		69	1,74		
		74	4,46		
		79	5,83		
	1050	65	1,62	2,54	40
		70	2,37		
		75	4,23		
		80	2,53		
	1350	84	1,96	2,09	34
		66	3,35		
		71	1,65		
		76	1,87		
	1650	81	1,69	2,40	24
		85	1,89		
		67	2,54		
		72	2,46		
1950	77	1,62	1,83	34	
	82	2,17			
	86	3,24			
	68	2,08			
		73	2,74		
		78	1,69		
		83	1,06		
		87	1,60		

*Amostra perdida

A distribuição da abundância bacteriana em função da profundidade de origem dos sedimentos foi observada previamente por DANOVARO *et al.* (1998), para o Mediterrâneo Oriental, e por QUÉRIC *et al.* (2004), para o Oceano Ártico. Em ambos os casos foram considerados dados de abundância da camada superficial do sedimento (0-2 cm), a mesma fração utilizada no presente estudo.

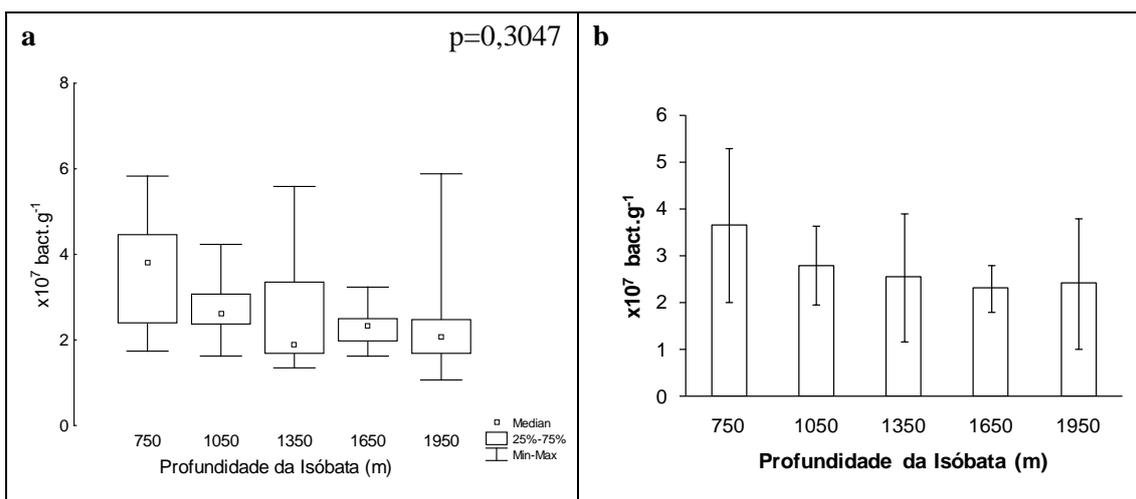


Figura 23. Resultados da campanha de verão obtidos para as profundidades de coleta. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($x10^7$ bactérias.g⁻¹) das amostras analisadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.

4.5.1.2. Campanha de Inverno – 2003

Para a campanha de inverno foram observados valores de abundância variando de 1,36 a 8,65 x 10⁷ bactérias.g⁻¹ (Tabela X). Conforme ilustrado na Figura 24, os dados obtidos para a região norte da Bacia de Campos (4,92±2,06 x 10⁷ bactérias.g⁻¹) foram superiores (Mann-Whitney; U = 103; p<0,005) aos observados para a área sul (3,06±1,46 x 10⁷ bactérias.g⁻¹). Esta diferença pode estar associada a alguma peculiaridade local relacionada à época em que foi realizada a coleta, sugerindo que no período de inverno a Bacia de Campos pode se configurar como um ambiente heterogêneo em relação à abundância bacteriana nos sedimentos.

Foi possível observar certa tendência de redução de valores em função da profundidade de origem das amostras (Figura 25), entretanto, a diferença observada entre as profundidades não foi significativa (Kruskal-Wallis; H=5,84; p=0,2118). Entre

as profundidades de coleta, 750 m foi a que apresentou os maiores resultados de abundância ($5,19 \pm 1,93 \times 10^7$ bactérias.g⁻¹). Já os valores mais reduzidos foram obtidos nas regiões mais profundas, localizadas sobre a isóbata de 1950 m ($2,89 \pm 1,54 \times 10^7$ bactérias.g⁻¹).

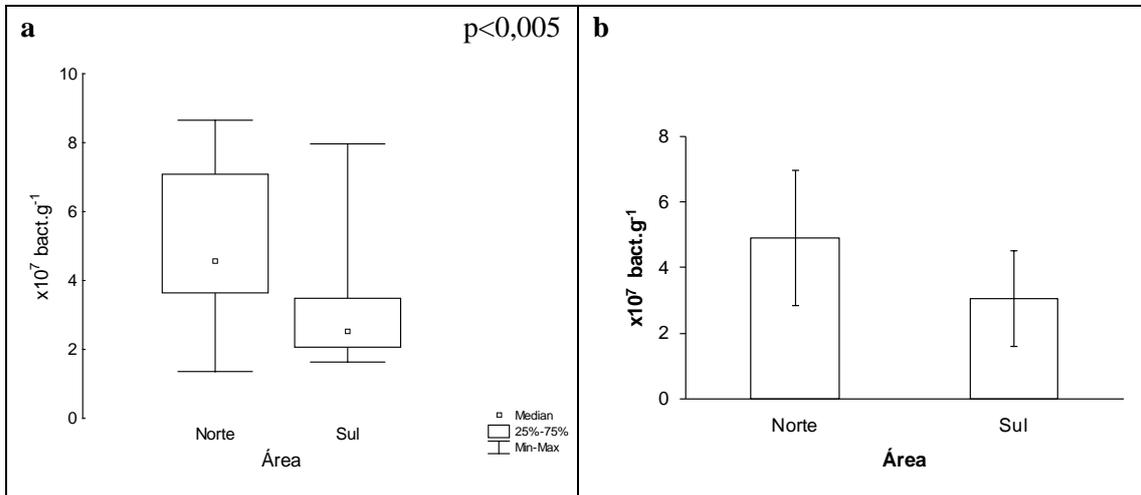


Figura 24. Resultados da campanha de inverno obtidos para as áreas Norte e Sul. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^7$ bactérias.g⁻¹) das amostras analisadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.

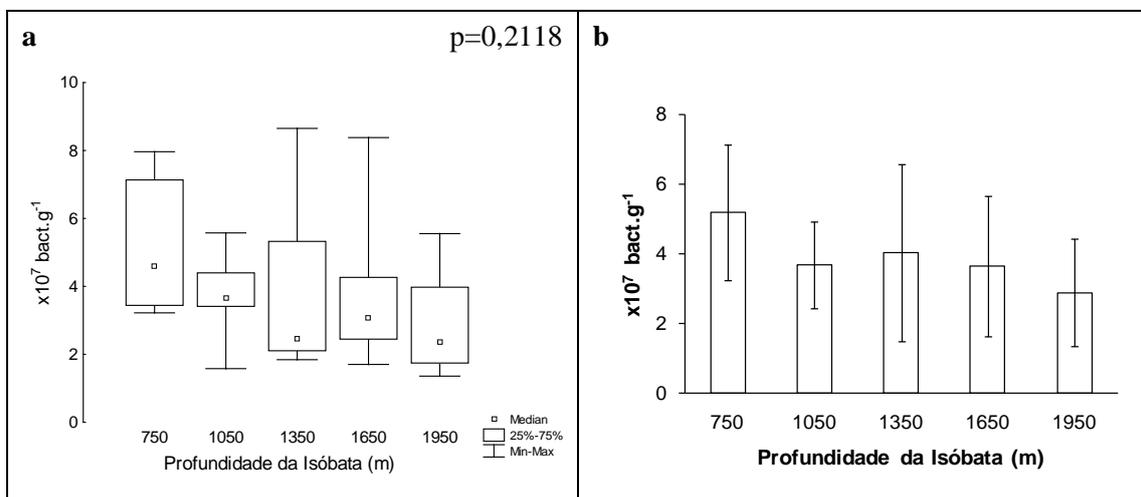


Figura 25. Resultados da campanha de inverno obtidos para as profundidades de coleta. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^7$ bactérias.g⁻¹) das amostras analisadas. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.

Tabela X. Dados de abundância bacteriana, valores médios e coeficientes de variação (por profundidade de coleta) obtidos na campanha de inverno realizada em junho de 2003.

Área	Prof.	Amostra	Abundância (x10 ⁷ bact.g ⁻¹)	Média (x10 ⁷ bact.g ⁻¹)	CV%
Norte	750	44	7,18	5,48	36
		49	4,26		
		54	7,08		
		59	3,38		
	1050	45	3,71	3,63	45
		50	3,64		
		50 A	5,57		
		60	1,58		
	1350	46	4,58	6,44	29
		51	7,19		
		56	8,65		
		61	5,33		
	1650	47	3,86	4,90	49
		52	8,38		
		57	4,27		
		62	3,08		
1950	48	5,55	3,91	57	
	53	*			
	58	4,81			
	63	1,36			
Sul	750	64	3,51	4,91	44
		69	4,94		
		74	3,22		
		79	7,96		
	1050	65	2,34	3,72	27
		70	4,99		
		75	3,41		
		80	3,46		
	1350	84	4,40	2,11	12
		66	2,21		
		71	1,90		
		76	2,47		
	1650	81	1,84	2,67	40
		85	2,11		
		67	2,03		
		72	1,70		
1950	77	2,77	2,27	27	
	82	4,42			
	86	2,45			
	68	2,59			
		73	2,14		
		78	3,14		
		83	1,64		
		87	1,85		

*Amostra perdida

4.5.1.3. Campanhas de Verão e Inverno

Os valores médios de abundância bacteriana obtidos nas campanhas de verão e inverno estão sintetizados na Tabela XI. A campanha de inverno apresentou valores de abundância bacteriana superiores aos encontrados para a campanha de verão (Mann-Whitney; $U = 524$; $p < 0,005$; Figura 26). Isto pode estar associado a um maior suprimento de partículas orgânicas ao fundo no período do inverno, uma vez que as bactérias, assim como os demais organismos presentes em sedimentos profundos, dependem do carbono orgânico proveniente da zona fótica (DANOVARO & FABIANO, 1995; PFANNKUCHE *et al.*, 1999; DANOVARO *et al.*, 1999).

Tabela XI. Valores médios de abundância bacteriana obtidos nas campanhas de verão e inverno.

Campanha	Área	Profundidade	Média ($\times 10^7$ bact.g ⁻¹)	CV%
Verão	Norte	750	2,40	*
		1050	3,13	16
		1350	3,10	60
		1650	2,15	16
		1950	3,13	59
	Sul	750	3,96	43
		1050	2,54	40
		1350	2,09	34
		1650	2,40	24
		1950	1,83	34
Inverno	Norte	750	5,48	36
		1050	3,63	45
		1350	6,44	29
		1650	4,90	49
		1950	3,91	57
	Sul	750	4,91	44
		1050	3,72	27
		1350	2,11	12
		1650	2,67	40
		1950	2,27	27

*não calculado por insuficiência de dados

Estimativas de biomassa fitoplactônica (clorofila *a*), entre outros parâmetros, foram obtidas na mesma época e para a mesma região da Bacia de Campos estudada no presente trabalho (dados não publicados). Tais estimativas, obtidas a partir de amostras de água coletadas até 200 m de profundidade, foram mais elevadas no período de

inverno que no verão. O mesmo foi observado em estudos anteriores realizados na Bacia de Campos, que mostraram estimativas de biomassa fitoplanctônica (clorofila *a*) mais elevadas no período de inverno que no verão (PETROBRAS, 2001). A maior produção de biomassa fitoplanctônica no período do inverno pode estar associada a uma maior concentração de elementos nutrientes (fosfatos e nitratos) na camada superficial da coluna d'água neste período do ano (NIENCHESKI *et al.*, 1999). Deste modo, a produção primária na zona fótica pode estar fornecendo um suprimento adicional de material orgânico para o fundo oceânico no período do inverno, favorecendo o aumento da abundância bacteriana no sedimento neste período do ano.

Em escalas locais o fluxo de carbono ao fundo oceânico e sua utilização pelos organismos bentônicos podem ser estimados diretamente por meio da implantação de 'armadilhas de sedimentos' (*sediment traps*) e determinando o consumo de oxigênio pela comunidade do sedimento (Smith *et al.*, 2001). Atualmente não existe qualquer trabalho publicado sobre fluxo de carbono na Bacia de Campos. Em escala global existem muito poucas medidas deste tipo para fornecer uma figura razoável da disponibilidade de alimento em grandes escalas geográficas, medidas estas essenciais para a compreensão do ciclo global do carbono (Rex *et al.* 2006).

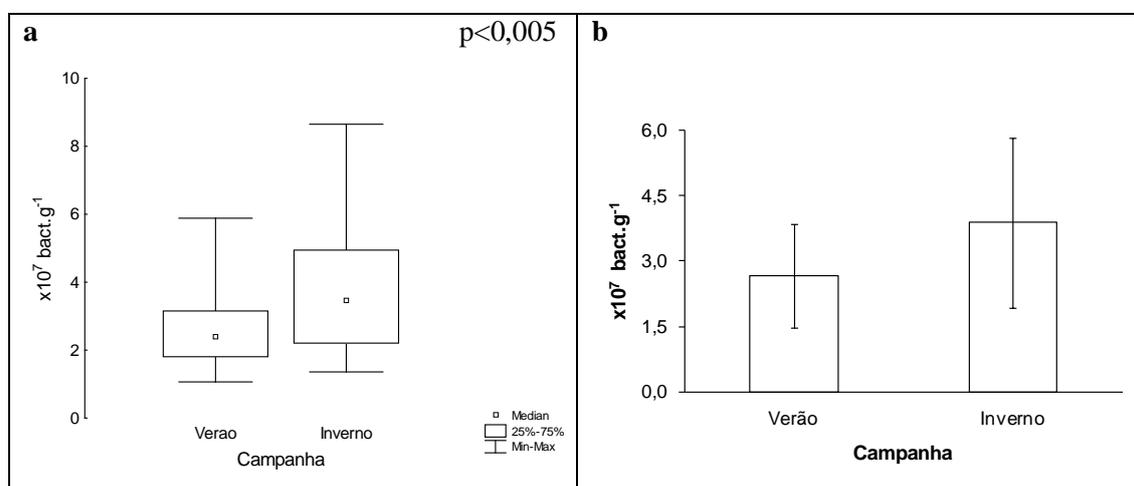


Figura 26. Resultados das campanhas de verão e inverno. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^7$ bactérias.g⁻¹) de todas amostras analisadas por campanha. As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.

A definição de disponibilidade de matéria orgânica para bactérias bentônicas é complexa, se comparada aos níveis tróficos superiores. Isto porque as bactérias apresentam vantagens por sua habilidade de crescer usando uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos, incluindo compostos orgânicos refratários (DANOVARO

et al., 2000). Entretanto, o efeito combinado de temperaturas permanentemente frias, pressões elevadas e fluxo vertical de material particulado variável sazonalmente têm implicações importantes para a sobrevivência e atividade metabólica de comunidades bacterianas no fundo dos oceanos (TURLEY, 2000; QUÉRIC *et al.*, 2004).

Considerando-se todos os dados das campanhas de verão e inverno realizadas na Bacia de Campos, foi observada diferença significativa na abundância bacteriana entre as áreas norte e sul (Mann-Whitney; $U = 525$; $p < 0,005$; Figura 27). Esta diferença, entretanto, ocorreu devido aos resultados obtidos para a área norte na campanha de inverno ($4,92 \pm 2,06 \times 10^7$ bactérias.g⁻¹; Figura 28 e Tabela XII) que foram muito superiores aos demais resultados observados nas duas campanhas (Kruskal-Wallis; $H=18,43$; $p < 0,001$). Os valores de abundância mais reduzidos foram encontrados na área sul, na campanha de verão e foram em média $2,51 \pm 1,13 \times 10^7$ bactérias.g⁻¹.

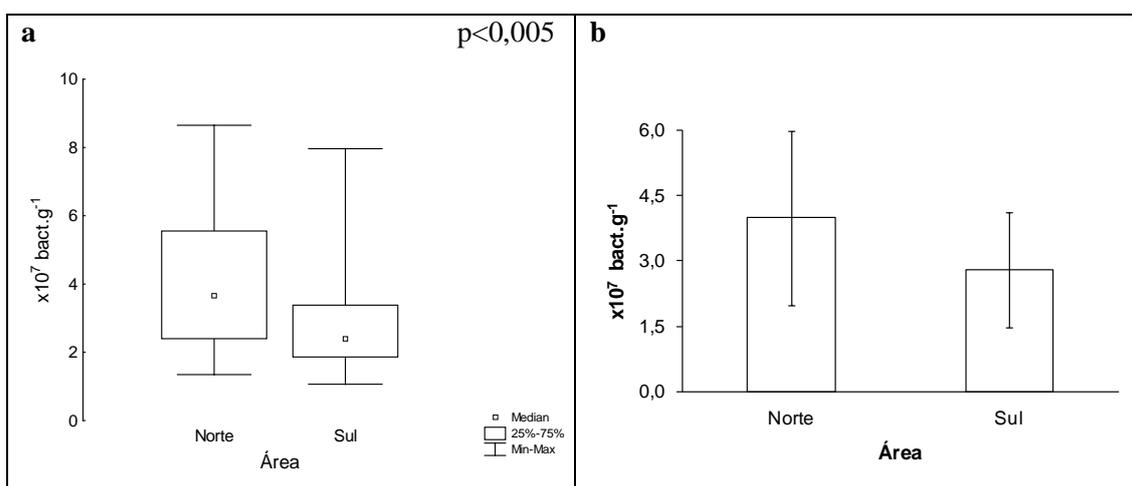


Figura 27. Resultados obtidos para as áreas norte e sul. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^7$ bactérias.g⁻¹) de todas amostras analisadas nas duas campanhas (verão e inverno). As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.

O Oceano Atlântico Sudoeste é conhecido por sua oligotrofia (ANDRADE *et al.*, 2003). Nesta região, a Corrente do Brasil segue em direção ao sul levando a Água Tropical com elevada temperatura e salinidade (GAETA *et al.*, 1999). Movendo-se abaixo desta massa d'água, em direção oposta, existe a Água Central do Atlântico Sul, uma camada de água fria e rica em nutrientes. A Água Tropical oligotrófica é a massa d'água prevalecente na zona fótica desta região do Oceano Atlântico (PEDROSA *et al.*, 2006).

Os processos que ocorrem na zona fótica têm influência direta sobre os sedimentos profundos, visto que afetam o fluxo de matéria orgânica particulado ao fundo oceânico. Devido à oligotrofia da Bacia de Campos seria esperada grande homogeneidade espacial da abundância bacteriana, padrão observado na campanha de verão. Entretanto, no Oceano Atlântico Sudoeste diversos fenômenos físicos, a exemplo de ressurgências e vórtices, podem ocorrer sendo resultado de uma combinação de fatores tais como o fluxo de correntes diferentes e a topografia de fundo. Tais fatores possibilitam a fertilização das águas superficiais com nutrientes da Água Central do Atlântico Sul (GAETA *et al.*, 1999; SUSINI-RIBEIRO, 1999), aumentando localmente a produção fitoplanctônica e conseqüentemente um maior suprimento de material orgânico aos sedimentos profundos. A ocorrência de fenômenos físicos que favoreçam a produção fitoplanctônica poderia justificar a observação de dados elevados de abundância em determinada região da Bacia de Campos, como observado para a área norte na campanha de inverno.

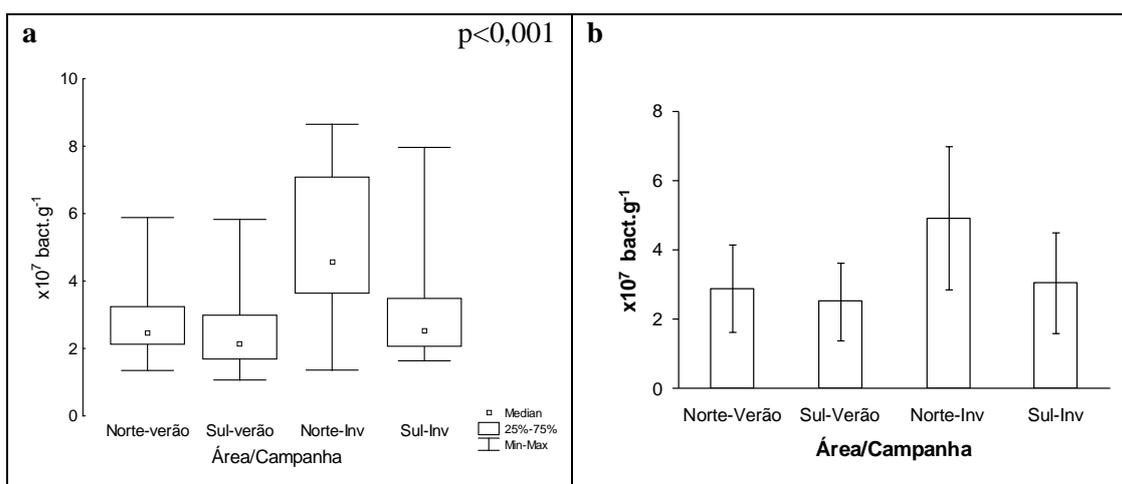


Figura 28. Resultados das campanhas de verão e inverno obtidos para as áreas norte e sul. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^7$ bactérias.g⁻¹) de todas amostras analisadas (por área em cada campanha). As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.

Tabela XII. Valores de “p” para Comparação Múltipla entre os dados de abundância bacteriana obtidos nas diferentes Áreas/Campanhas (Kruskal-Wallis; H=18,43). Em vermelho $p < 0,05$.

Área/Campanha	Norte-verão	Sul-verão	Norte-inverno	Sul-inverno
Norte-verão	-	1,0000	0,0319	1,0000
Sul-verão		-	0,0002	0,8157
Norte-inverno			-	0,0298
Sul-inverno				-

A distribuição da abundância bacteriana em função da profundidade de coleta está ilustrada na Figura 29. Considerando-se todos os dados obtidos nas duas campanhas foi observada clara tendência de diminuição dos valores com o aumento da profundidade e a diferença de valores encontrada foi significativa (Kruskal-Wallis; $H = 11,48$; $p < 0,05$). Apesar da diferença significativa, entre as profundidades consideradas apenas 750 m e 1950 m diferiram efetivamente (Kruskal-Wallis; $H = 11,48$; $p < 0,02$; Tabela XIII).

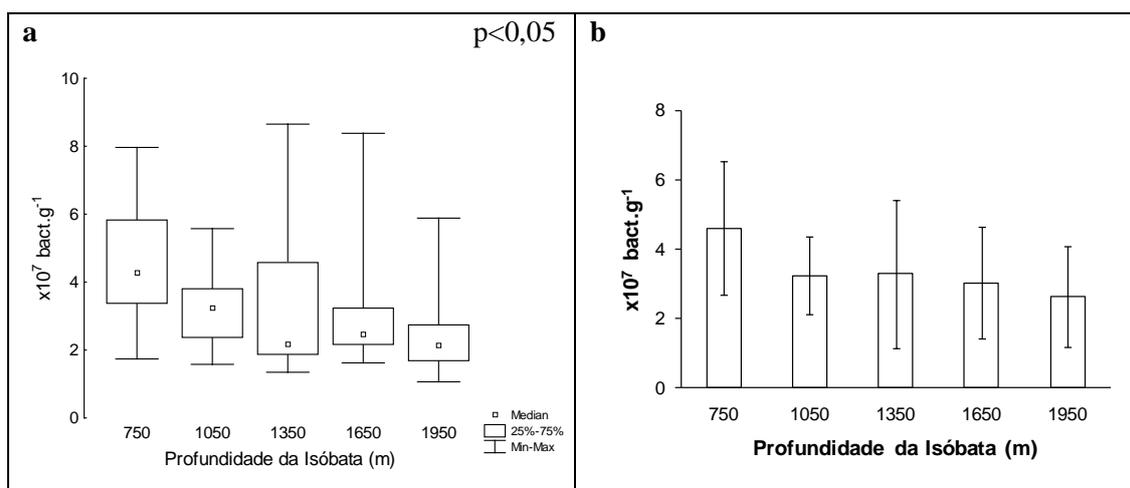


Figura 29. Resultados obtidos para as profundidades de coleta. Em (a) diagrama de caixa (box-plot) e (b) gráfico de barras dos valores médios de abundância bacteriana ($\times 10^7$ bactérias.g⁻¹) de todas amostras analisadas nas duas campanhas (verão e inverno). As barras de erro em (b) indicam o desvio padrão da média.

Tabela XIII. Valores de “p” para Comparação Múltipla entre os dados de abundância bacteriana obtidos nas diferentes Profundidades (Kruskal-Wallis; $H=18,43$). Em vermelho $p < 0,05$.

Profundidade (m)	750	1050	1350	1650	1950
750	-	1,0000	0,1465	0,2201	0,0132
1050		-	1,0000	1,0000	0,7548
1350			-	1,0000	1,0000
1650				-	1,0000
1950					-

Embora tenha sido observada relação negativa entre a abundância bacteriana e a profundidade e este seja um padrão comumente observado para regiões oceânicas (DANOVARO *et al.*, 1998; QUÉRIC *et al.*, 2004) é provável que a relação não seja devido à profundidade em si, mas possivelmente à diminuição no fluxo de carbono orgânico particulado que ocorre com o aumento da profundidade do oceano

(JØRGENSEN & BOETIUS, 2007). Segundo DEMING & CARPENTER (2008), o fluxo descendente de carbono orgânico particulado prediz claramente a abundância bacteriana, sendo o número de microrganismos no sedimento baseado principalmente no suprimento de recursos orgânicos ao fundo do mar e não na profundidade.

A Tabela XIV apresenta uma síntese dos dados de abundância bacteriana de diversas áreas oceânicas do mundo, com suas respectivas referências e métodos de análise empregados. A variação de valores observada nesta Tabela para áreas de mesma profundidade pode estar associada a diversos fatores, tais como, metodologia de coleta e análise, fatores ambientais e unidade utilizada para expressar os resultados. Cada unidade utilizada contém uma informação variada sobre o ambiente físico, de modo que relações ecológicas podem ser mascaradas ou falsamente quantificadas quando uma escala imprópria é usada (SCHMIDT *et al.* 1998). Além disso, a utilização de unidades diversas dificulta a comparação de resultados entre diferentes publicações, visto que a maioria dos trabalhos não contém informações, tais como a densidade do sedimento (massa de sedimento seco/volume de sedimento úmido – BOWERS *et al.*, 2009), que possibilitem a conversão de uma unidade em outra.

Alguns trabalhos como o de ZOBELL & MORITA (1959) e de GOUDA *et al.* (2006), realizados respectivamente no Oceano Índico e no Mar Mediterrâneo, apresentaram valores de abundância cerca de duas a três ordens de magnitude inferiores aos descritos neste estudo para a Bacia de Campos. Tais resultados podem estar associados ao uso de técnicas de cultivo na análise das amostras de sedimento. Sabe-se que os métodos de cultivo limitam a estimativa de abundância, pois não é possível fornecer um meio com os requisitos nutricionais e condições ambientais essenciais para o crescimento de todas as bactérias ao mesmo tempo (WATSON *et al.*, 1977; KIRCHMAN & WILLIAMS, 2000). Como consequência, as técnicas de cultivo favorecem apenas uma pequena fração das bactérias vivas presentes no ambiente (JANNASCH & JONES, 1959; GEWIN, 2006), subestimando as estimativas de abundância de uma a três ordens de grandeza. Outros trabalhos (BOETIUS *et al.*, 1996 e 2000; DEMING & CARPENTER, 2008) registraram dados de abundância mais elevados, da ordem de 10^9 células.cm⁻³. Vale ressaltar que nestes artigos os valores de abundância foram dimensionados por unidades de área (cm³) ou volume (mL) e não por massa de sedimento como a maior parte dos demais trabalhos (ROWE & DEMING, 1985; WIT *et al.*, 1997; DANOVARO *et al.*, 1998 e 2002a; LUNA *et al.*, 2002; LUNAU *et al.*, 2005; RAGHUKUMAR *et al.*, 2006).

Tabela XIV. Médias de Abundância Bacteriana em amostras de sedimento de diversos locais do mundo.

Estudo	Amostragem		Análise			Abundância Bacteriana x 10 ⁸ células.g ⁻¹ *
	Localização	Profundidade	Extração	Coloração	Deteção	
ZoBell & Morita 1959	Fossa das Filipinas ¹	10.000 m 1.000 m	**	**	Cultivo	0,002 – 0,04 (PU) 0,005 – 0,02 (PU)
ZoBell & Morita 1959	Oceano Índico	7.000 m	**	**	Cultivo	0,01 – 0,02 (PU)
Deming & Colwell 1982	Planície Abissal Demerara ²	4.500 - 4.800 m	**	Acridine Orange	Epif.	4,4 – 10,7 (PS)
Rowe & Deming 1985	Planície Abissal Demerara ²	4.500 - 4.800 m	**	Acridine Orange	Epif.	3,1 – 4,7 (PS)
Rowe & Deming 1985	Baía de Biscay ³	4.000 - 4.700 m	**	Acridine Orange	Epif.	2,0 – 4,3 (PS)
Boetius <i>et al.</i> 1996	Mediterraneo Oriental	200 – 4.600 m	Pirofosfato e sonicação	Acridine Orange	Epif.	15,5 – 39,4 células.cm ⁻³
Wit <i>et al.</i> 1997	Oceano Índico	4.200 – 4.800 m	Pirofosfato e sonicação	DAPI	Epif.	8,6 – 96,9 (PS)
Danovaro <i>et al.</i> 1998	Mediterraneo Oriental	40 - 1.500 m	Sonicação	Acridine Orange	Epif.	1,0 – 3,5 (PS)
Boetius <i>et al.</i> 2000	Mar Arábico	1.900 - 4.400 m	Sonicação	Acridine Orange	Epif.	6,0 – 40,0 células.cm ⁻³
Danovaro & Serresi 2000	Mediterraneo Oriental	1.200 - 4.200 m	Pirofosfato e sonicação	SYBR-1	Epif.	4,0 – 11,0 (PS)
Dixon & Turley 2000	Atlântico Nordeste	1.100 – 3.600 m	Sonicação	Acridine Orange	Epif.	1,1 – 12,0 (PS)

(*) Unidade diferente quando especificada, (**) Não realizado, (PU) peso úmido, (PS) peso seco, (Epif.) Microscopia de Epifluorescência, (Cel.) Células, ¹Oceano Pacífico, ²Atlântico Norte, ³Costa Oeste da França, ⁴Itália, ⁵ Alexandria – Egito.

Tabela XIV. Continuação.

Estudo	Amostragem			Análise		Abundância Bacteriana
	Localização	Profundidade	Extração	Coloração	Deteccção	
Danovaro <i>et al.</i> 2002a	Mar Mediterrâneo	1.300 – 4.000 m	Pirofosfato e sonicação	Acridine Orange	Epif.	1,8 – 6,5 (PS)
Danovaro <i>et al.</i> 2002b	Mar Adriático ⁴	15 – 50 m	Sonicação	Acridine Orange	Epif.	1,4 – 36,5 (PS)
Luna <i>et al.</i> 2002	Mar Adriático ⁴	9 – 12 m	Sonicação	Acridine Orange	Epif.	1,5 – 53,1 (PS)
Turley & Dixon 2002	Atlântico Nordeste	1.100 - 3.600 m	Sonicação	Acridine Orange	Epif.	0,6 – 5,3 células.mL ⁻¹
Quéric <i>et al.</i> 2004	Oceano Ártico	1.200 – 5.600 m	Pirofosfato e Homogeneização	Iodeto de Propídio e Syto 9	Epif.	0,8 – 5,4 células.cm ⁻³
Lunau <i>et al.</i> 2005	Mar do Norte	2 m	Metanol	SYBR Green I	Epif.	0,05 células.mg ⁻¹ (PU)
			Pirofosfato	SYBR Green I	Epif.	0,04 células.mg ⁻¹ (PU)
			Tween 80	SYBR Green I	Epif.	0,03 células.mg ⁻¹ (PU)
	Mar Báltico	405 m	Metanol	SYBR Green I	Epif.	9,0 células.mg ⁻¹ (PU)
			Pirofosfato	SYBR Green I	Epif.	7,0 células.mg ⁻¹ (PU)
			Tween 80	SYBR Green I	Epif.	5,8 células.mg ⁻¹ (PU)
Gouda <i>et al.</i> 2006	Eastern Harbour ⁵	1,5 – 13 m	**	**	Cultivo	0,0001 – 0,1 CFU.g ⁻¹ (PS)
Raghukumar <i>et al.</i> 2006	Bacia Indiana Central	5.000 m	Sonicação	Acridine Orange	Epif.	20,0 (PS)
Hewson & Fuhrman 2007	Oceano Pacífico	20 – 900 m	Pirofosfato e homogeneização	SYBR Green I	Epif.	0,7 – 1,6 células.mL ⁻¹
Deming & Carpenter 2008	Golfo do México	212 – 3.732 m	Triton-X	Acridine Orange e DAPI	Epif.	1,0 – 18,9 células.cm ⁻³

(*) Unidade diferente quando especificada, (**) Não realizado, (PU) peso úmido, (PS) peso seco, (Epif.) Microscopia de Epifluorescência, (Cel.) Células,

¹Oceano Pacífico, ²Atlântico Norte, ³Costa Oeste da França, ⁴Itália, ⁵Alexandria – Egito.

Considerando a unidade utilizada no presente trabalho (células.g⁻¹ PU), a profundidade de origem dos sedimentos e a metodologia de separação das bactérias do sedimento (pirofosfato de sódio e/ou sonicação), se observou que a abundância bacteriana aqui descrita para os sedimentos da Baía de Campos foi de uma a duas ordens de grandeza inferior à descrita na literatura para outras regiões oceânicas (DANOVARO & SERRESI, 2000; DIXON & TURLEY, 2000; DANOVARO *et al.* 2002a). Isto pode estar associado à característica oligotrófica das águas superficiais (zona fótica) da Baía de Campos (ANDRADE *et al.*, 2003; PEDROSA *et al.*, 2006). Tal característica possivelmente limitaria a produção fitoplanctônica na superfície, fornecendo pouca quantidade de material orgânico para o fundo oceânico quando comparado aos ambientes em que foram encontrados dados de abundância mais elevados (Tabela XIII). A região nordeste do Oceano Atlântico, por exemplo, estudado por DIXON & TURLEY (2000) é conhecido por sua variação sazonal no fluxo de carbono orgânico particulado ao sedimento, que tem seu máximo no verão após os blooms fitoplanctônicos que ocorrem na primavera (LEVIN & GOODAY, 2003). Deste modo, admite-se que peculiaridades regionais podem afetar o fluxo descendente de material orgânico e a disponibilidade de recursos alimentares nos sedimentos profundos, possivelmente influenciando a abundância bacteriana nestes sedimentos.

4.5.2. Correlação com Parâmetros abióticos do sedimento

Os resultados das análises físico-químicas (matéria orgânica, carbonatos, carbono e nitrogênio) e de granulometria (porcentagem de areia, silte e argila) do sedimento, utilizados neste trabalho, foram obtidos no âmbito do projeto OCEANPROF e gentilmente cedidos pelo Laboratório de Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Norte Fluminense (LCA / UENF). As correlações foram realizadas utilizando-se todos os dados de abundância bacteriana obtidos nas duas campanhas realizadas (verão e inverno, n = 88, Tabela XV).

Foi observada correlação negativa entre a abundância bacteriana e a porcentagem de silte nas amostras de sedimento (n=88; p<0,05). Já em relação à porcentagem de areia fina a correlação observada foi positiva (n=88; p<0,05). Embora em ambos os casos a correlação tenha sido significativa, o r_s foi baixo (r_s=-0,25 para a porcentagem de silte e r_s=0,22 para a porcentagem de areia fina), sugerindo fraca influência da

granulometria da amostra sobre a abundância de bactérias nos sedimentos analisados. SCHMIDT *et al.* (1998) identificaram forte correlação entre a área superficial do grão de sedimento e a abundância bacteriana em sedimentos costeiros superficiais. Segundo estes autores a relação pode não ser devido à simples limitação por espaço, visto que as bactérias habitam somente 0,05-5% da área superficial disponível. A dependência foi atribuída ao substrato ao qual estavam adsorvidas, hábitat de proteção, ou inversamente aos grãos de argila acumulados em exudatos bacterianos.

Tabela XV. Coeficiente de correlação (r_s) entre os dados de abundância bacteriana e os parâmetros físico-químicos analisados no sedimento (Correlação de Spearman, valores em vermelho $p < 0,05$).

Parâmetro	r_s
%Argila	-0,11
%Silte	-0,25
%Silte+Argila	-0,10
%Areia Fina	0,22
%Areia Média	0,14
%Areia Grossa	-0,09
%Matéria Orgânica	-0,45
%Carbonatos	-0,25
Carbono Total	-0,22
Carbono Orgânico	-0,16
Carbono Inorgânico	-0,20
Nitrogênio Total	0,06

Também foi observada correlação negativa ($n=88$; $r_s=-0,45$; $p < 0,05$) entre a abundância bacteriana e a proporção de matéria orgânica nos sedimentos analisados. O mesmo foi observado entre a concentração de carbono total e a abundância bacteriana $n=88$; $r_s=-0,22$; $p < 0,05$). Já entre a concentração de carbono orgânico no sedimento e a abundância bacteriana não foi possível obter qualquer tipo de correlação (Tabela XV). Para a região nordeste do Atlântico foi relatada relação exponencial positiva ($p < 0,05$) entre abundância bacteriana e concentração de carbono orgânico particulado (TURLEY & DIXON, 2002). Padrão semelhante foi descrito por DANOVARO *et al.*, (2000), os quais observaram abundância bacteriana com distribuição sensível a mudanças na disponibilidade de compostos orgânicos nos sedimentos. Entretanto, este não é um padrão constante, existindo relatos de padrões de abundância bacteriana insensíveis às variáveis indicadoras de disponibilidade alimentar (BOETIUS *et al.*, 1996).

Historicamente, a abundância de vida sobre o fundo do mar foi imaginada como sendo uma função da concentração de matéria orgânica nos sedimentos. Entretanto, isto não tem sido demonstrado na literatura. A quantidade de matéria orgânica presente no sedimento deveria fornecer uma aproximação razoável da quantidade de alimento potencial aos microrganismos detritívoros. Porém, quando se relaciona o número de organismos por m² com o carbono orgânico disponível não se observa nenhum padrão consistente (ROWE *et al.*, 1991). Isto ocorre possivelmente devido à matéria orgânica em sedimentos de mar profundo ser altamente refratária, apenas uma pequena proporção do material orgânico que chega ao fundo oceânico é lábil e está disponível aos organismos para ser rapidamente utilizado (ROWE *et al.*, 1991; JØRGENSEN & BOETIUS, 2007).

Após anos de estudos por diversos grupos de pesquisa espalhados pelo mundo, pouco se sabe sobre a fração do material orgânico sedimentar que está acessível à degradação microbiana e em que escala de tempo esta fração será digerida, oxidada e assimilada (Jørgensen & Boetius, 2007). As substâncias refratárias podem ser resistentes a enzimas hidrolíticas, e seu uso como recurso energético e nutricional parece depender de uma série de fatores físico-químicos e biológicos, tais como a adsorção da matéria orgânica a partículas minerais ou a digestão prévia por animais (BURDIGE, 2007). Além disso, a relação entre a produção de biomassa bacteriana e a disponibilidade de substrato (carbono orgânico particulado e nitrogênio) em sedimentos profundos ainda não é bem compreendida (TURLEY & DIXON, 2002).

Além da quantidade de matéria orgânica lábil, a disponibilidade de nitrogênio no sedimento é considerada como fator limitante para o crescimento bacteriano (TURLEY & DIXON, 2002). Apesar disso, não se observou correlação significativa entre a concentração de nitrogênio total e a abundância bacteriana dos sedimentos da Bacia de Campos nas campanhas realizadas em 2002 e 2003 (Tabela XV). De fato um conjunto extenso de fatores em cada ambiente atua na determinação do número de bactérias nos sedimentos. Desta forma a abundância bacteriana reflete o balanço entre processos de crescimento (via indução/produção de enzimas, hidrólise de substratos, captação, respiração e conversão em abundância) e mortalidade (predação e lise celular) (DANOVARO & SERRESI, 2000; TURLEY & DIXON, 2002) não sendo, portanto uma função direta da disponibilidade de recursos no meio.

As bactérias podem desempenhar um papel importante na cadeia alimentar e o estudo dos microrganismos é considerado um desafio para ecologia microbiana marinha

(PASCAL *et al.*, 2009). A distribuição das bactérias nos sedimentos marinhos tem sido utilizada como forte indicativo de mudanças no fluxo de nutrientes ao fundo oceânico (TURLEY & DIXON, 2002; QUÉRIC *et al.*, 2004), visto que a abundância microbiana é estreitamente relacionada às propriedades dos sedimentos (DANOVARO & FABIANO, 1995; DANOVARO *et al.*, 1998). Por esta razão, a enumeração é uma das etapas importante no estudo dos microrganismos em amostras naturais, podendo ser utilizada como um índice geral de atividade e como uma medida de biomassa (JANNASCH & JONES, 1959). Neste sentido é essencial que sejam desenvolvidos mais estudos visando uma maior compreensão da dinâmica microbiana nos sedimentos marinhos da região estudada.

4.6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

1. Na área da Bacia de Campos estudada, a abundância bacteriana tem relação com a profundidade local, com as características físico-químicas dos sedimentos e com as diferentes épocas do ano.

2. A distribuição das bactérias na região de estudo não é influenciada pela quantidade total de matéria orgânica nos sedimentos.

3. O gradiente de profundidade exerce significativa influência na distribuição das bactérias no sedimento.

Portanto, a hipótese de trabalho “A distribuição das bactérias nos sedimentos marinhos está associada à distribuição da matéria orgânica nestes sedimentos” foi rejeitada e a hipótese “A abundância bacteriana na área de estudo diminui com o aumento da profundidade local” foi confirmada pelo conjunto de dados.

Conclusão Final

5. CONCLUSÃO FINAL

As bactérias constituem o fundamento de todos os ecossistemas do planeta através da degradação da matéria orgânica e da regeneração de nutrientes. As duas fontes mais importantes de matéria orgânica lábil nos oceanos profundos são a ‘chuva’ de carbono orgânico particulado da superfície e a transformação bacteriana de matéria orgânica refratária em compostos mais rapidamente assimiláveis no fundo do mar (Richardson & Young, 1987). A transformação da matéria orgânica realizada pelos organismos procariotos presentes nos sedimentos marinhos tem importância fundamental na produção de biomassa e nos ciclos biogeoquímicos em uma escala global (Danovaro *et al.*, 2008). Além disso, a distribuição destes organismos pode ser utilizada como forte indicativo de mudanças no fluxo de nutrientes ao fundo oceânico visto que a abundância microbiana é estreitamente relacionada às propriedades dos sedimentos (Danovaro & Fabiano 1995, Danovaro *et al.* 1998).

Na análise de abundância bacteriana em amostras de sedimento o processo de separação ou extração é o principal desafio e visa a otimização das contagens bacterianas, aumentando a proporção de células separadas das partículas e minimizando a perda de organismos (AMALFITANO & FAZI, 2008). De acordo com os testes realizados, a sonicação da amostra em presença de pirofosfato de sódio (DANOVARO *et al.*, 2001; DUHAMEL & JACQUET, 2006) se mostrou mais adequada em comparação ao uso de metanol (LUNAU *et al.*, 2005). O protocolo gerado a partir dos testes metodológicos descreveu a extração das amostras seguida pela contagem das células por citometria em fluxo, configurando rapidez e precisão na análise das bactérias em sedimentos marinhos. A utilização de metodologias de análise otimizadas confere confiabilidade dos dados de abundância gerados, evitando que relações ecológicas sejam mascaradas ou falsamente dimensionadas.

Utilizando-se a metodologia descrita no capítulo 2, foram analisadas as amostras de sedimento da Bacia de Campos coletadas nos anos de 2002 e 2003. Tanto a sazonalidade quanto a batimetria possuem relação com o fluxo de carbono orgânico particulado ao fundo oceânico e especificamente na área estudada podem estar associadas a características locais e fenômenos físicos ocorrentes na coluna d’água da Bacia de Campos. Em última instância, a produção primária na zona fótica controla o fluxo descendente de material orgânico, podendo afetar a disponibilidade deste material para as bactérias. A partir dos dados de abundância obtidos foi possível observar um

padrão sazonal de distribuição dos microrganismos no sedimento, com valores mais elevados no período do inverno. Além disso, foi observada diminuição da abundância em função do aumento da profundidade. Quanto à distribuição espacial foi observada grande homogeneidade da abundância bacteriana nos sedimentos da Bacia de Campos no período do verão. Já no inverno, foi possível observar diferença de valores entre as áreas amostradas, com valores mais elevados na área norte.

A oceanografia microbiana é uma área de estudo que abrange diferentes escalas. Processos microbianos devem ser entendidos à escala do microrganismo individual, entretanto é necessário compreender o efeito acumulativo dos processos microbianos sobre a biogeoquímica dos oceanos (AZAM & MALFATTI, 2009). A determinação da abundância bacteriana e de outros parâmetros microbianos, como a biomassa, são importantes ferramentas em estudos com estimativas de fluxo de carbono ao fundo oceânico e sua utilização pelos organismos bentônicos, contribuindo para uma melhor compreensão do ciclo global do carbono. O uso de parâmetros microbianos associado à obtenção de dados físico-químicos nos sedimentos marinhos possibilitará um maior entendimento do papel desenvolvido pelos organismos procariotos nos oceanos.

Bibliografia

6. BIBLIOGRAFIA

- AMALFITANO, S. & FAZI, S., 2008, "Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments", *Journal of Microbiological Methods*, v. 75, pp. 237-243.
- AMALFITANO, S.; FAZI, S. & PUDDU, A., 2009, "Flow cytometric analysis of benthic prokaryotes attached to sediment particles", *Journal of Microbiological Methods*, v. 79, pp. 246-249.
- ANDRADE, L.; GONZALEZ, A.M.; ARAUJO, F.V. & PARANHOS, R., 2003, "Flow cytometry assessment of bacterioplankton in tropical marine environments", *Journal of Microbiological Methods*, v. 55, pp. 841-850.
- AUGUET, J.C.; MONTANIÉ, H.; HARTMANN, H.J.; LEBARON, P.; CASAMAYOR, E.O.; CATALA, P. & DELMAS, D., 2009, "Potential effect of freshwater virus on the structure and activity of bacterial communities in the Marennes-Oléron Bay (France)", *Microbial Ecology*, v. 57, pp. 295-306.
- AZAM, F. & MALFATTI, F., 2007, "Microbial structuring of marine ecosystems", *Nature Reviews*, v. 5, pp. 782-791.
- BJORNSEN, P.K. & KUPARINEN, J., 1991, "Determination of bacterioplankton biomass, net production and growth efficiency in the Southern Ocean", *Marine Ecology Progress Series*, v. 71, pp. 185-194.
- BLACKBURN, T.H., 1987, "Microbial food webs in sediments". In: Sleigh, M.A. (ed), *Microbes in the Sea*, New York, USA, John Wiley & Sons, Inc.
- BOETIUS, A.; SCHEIBE, S.; TSELEPIDES, A. & THIEL, H., 1996, "Microbial biomass and activities in deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean: trenches are benthic hotspots", *Deep-Sea Research*, v. 43, pp. 1439-1460.
- BOETIUS, A.; FERDELMAN, T. & LOCHTE, K., 2000, "Bacterial activity in sediments of the deep Arabian Sea in relation to vertical flux", *Deep-Sea Research*, v. 47, pp. 2835-2875.
- BOLLIGER, R.; HANSELMANN, K.W. & BACHOFEN, R., 1991, "Microbial potential in deep-sea sediments", *Experientia*, v. 47, pp. 517-523.
- BØRSHEIM, K.Y.; BRATBAK G. & HELDAL, M., 1990, "Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy", *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, pp. 352-356.
- BOTT, T.L. & KAPLAN, L.A., 1990, "Potential for protozoan grazing of bacteria in streambed sediments", *Journal of the North American Benthological Society*, v. 9, pp. 336-345.
- BOWERS, D.G.; BRAITHWAITE, K.M.; NIMMO-SMITH, W.A.M. & GRAHAM, G.W., 2009, "Light scattering by particles suspended in the sea: The role of particle size and density", *Continental Shelf Research*, v. 29, pp. 1748-1755.
- BRATBAK, G. 1985. "Bacterial biovolume and biomass estimations". *Applied and Environmental Microbiology*, v. 49, pp. 1488-1493.
- BRATBAK, G. & DUNDAS, I. 1984. "Bacterial dry matter content and biomass estimations". *Applied and Environmental Microbiology*, v. 48, pp. 755-757.

- BRUSSAARD, C.P.D.; TIMMERMANS, K.R.; UITZ, J. & VELDHUIS, M.J.W., 2008, "Viriplankton dynamics and virally induced phytoplankton lysis versus microzooplankton grazing southeast of the Kerguelen (Southern Ocean)", *Deep-Sea Research*, v. 55, pp. 752-765.
- BUESING, N. & GESSNER, M.O., 2002, "Comparison of detachment procedures for direct counts of bacteria associated with sediment particles, plant litter and epiphytic biofilms", *Aquatic Microbial Ecology*, v. 27, pp. 29-36.
- BURDIGE, D.J., 2007, "Preservation of organic matter in marine sediments: controls, mechanisms, and an imbalance in sediment organic carbon budgets" *Chemical Reviews*, v. 107, pp.467-485.
- CAI, W.-J. & SAYLES, F.L., 1996, "Oxygen penetration depths and fluxes in marine sediments" *Marine Chemistry*, v. 52, pp. 123-131.
- CERTES, A., 1884, "Sur la culture, à labrides germes atmosphériques, des eaux et des sédiments rapportés par les expéditions du Travailleur et Talisman", *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris*, v. 98, pp. 690-693.
- COLOMBET, J.; ROBIN, A.; LAVIE, L.; BETTAREL, Y.; CAUCHIE, H.M. & SIMEN-NGANDO, T., 2007, "Viriplankton 'pegylation': Use of PEG (polyethylene glycol) to concentrate and purify viruses in pelagic ecosystems", *Journal of Microbiological Methods*, v. 71, pp. 212-219.
- DANOVARO, R. & FABIANO, M., 1995, "Seasonal and inter-annual variation of bacteria in a seagrass bed of the Mediterranean Sea: relationship with labile organic compounds and other environmental factors", *Aquatic Microbial Ecology*, v. 9, pp. 17-26.
- DANOVARO, R.; MARRALE, D.; DELLA CROCE, N.; DELL'ANNO, A. & FABIANO, M., 1998, "Heterotrophic nanoflagellates, bacteria and labile organic compounds in continental shelf and deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean", *Microbial Ecology*, v. 35, pp. 244-255.
- DANOVARO, R.; DINET, A.; DUINEVELD, G. & TSELEPIDES, A., 1999, "Benthic response to particulate fluxes in different trophic environments: a comparison between Gulf of Lions–Catalan Sea (Western-Mediterranean) and the Cretan Sea (Eastern-Mediterranean)", *Progress in Oceanography*, v. 44, pp. 287-312.
- DANOVARO, R. & SERRESI, M., 2000, "Viral density and virus-to-bacterium ratio in deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, pp. 1857-1861.
- DANOVARO, R.; DELL'ANNO, A.; TRUCCO, A.; SERRESI, M. & VANUCCI, S., 2001, "Determination of virus abundance in marine sediments", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, pp. 1384-1387.
- DANOVARO, R.; MANINI, E. & DELL'ANNO, A., 2002a, "Higher abundance of bacteria than of viruses in deep Mediterranean sediments", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, pp. 1468-1472.
- DANOVARO, R.; MANINI, E. & FABIANO, M., 2002b, "Exo-enzymatic activity and organic matter composition in sediments of the Northern Adriatic Sea: response to a river plume", *Microbial Ecology*, v. 44, pp. 235-251.

- DANOVARO, R.; DELL'ANNO, A.; CORINALDESI, C.; MAGAGNINI, M.; NOBLE, R.; TAMBURINI, C. & WEINBAUER, M., 2008, "Major viral impact on the functioning of benthic deep-sea ecosystems", *Nature*, v. 454, pp. 1084-1088.
- DEFLAUN, M.E & MAYER, L.M., 1983, "Relationships between bacteria and grain surfaces in intertidal sediments", *Limnology and Oceanography*, v. 28, pp. 873-881.
- DEL GIORGIO, P.A.; BIRD, D.F.; PRAIRIE, Y.T. & PLANAS, D., 1996, "Flow cytometric determination of bacterial abundance in lake plankton with the green stain SYTO 13", *Limnology and Oceanography*, v.41, pp. 783-789.
- DEL GIORGIO, P.A. & BOUVIER, T., 2002, "Linking the physiologic and phylogenetic successions in free-living bacterial communities along an estuarine salinity gradient", *Limnology and Oceanography*, v. 47, pp. 471-486.
- DEMING, J.W. & COLWELL, R.R., 1982, "Barophilic bacteria associated with digestive tracts of abyssal holothurians", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 44, pp. 1222-1230.
- DEMING, J.W. & COLWELL, R. R., 1985, "Observations of barophilic microbial activity in samples of sediment and intercepted particles from Demara Abyssal Plain", *Applied Environmental Microbiology*, v. 50, pp. 1001-1006.
- DEMING, J.W. & CARPENTER S.D., 2008, "Factors influencing benthic bacterial abundance, biomass, and activity on the northern continental margin and deep basin of the Gulf of Mexico". *Deep-Sea Research*, v. 55, pp. 2597-2606.
- D'HONDT, S.; RUTHERFORD, S. & SPIVACK, A.J., 2002, "Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments", *Science*, v. 295, pp. 2067-2070.
- DIXON, J.L. & TURLEY, C.M., 2000, "The effect of water depth on bacterial numbers, thymidine incorporation rates and C:N ratios in northeast Atlantic surficial sediments", *Hydrobiologia*, v. 440, pp. 217-225.
- DRAKE, L.A.; CHOI, K.H.; HASKELL, A.G.E & DOBBS, F.C., 1998, "Vertical profiles of virus-like particles and bacteria in the water column and sediments of Chesapeake Bay, USA", *Aquatic Microbial Ecology*, v. 16, pp. 17-25.
- DUHAMEL, S. & JACQUET, S., 2006, "Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments", *Journal of Microbiological Methods*, v. 64, pp. 316-332.
- EPSTEIN, S.S. & ROSSEL, J., 1995, "Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol", *Marine Ecology Progress Series*, v. 117, pp. 289-298.
- FERGUSON, R.L. & RUBLEE, P. 1976. "Contribution of bacteria to standing crop of coastal plankton". *Limnology and Oceanography*, v. 21, pp. 141-145.
- FRY, J.C., 1990, "Direct methods and biomass estimation". In: Grigorova, R., Norris, J.R. (eds), *Techniques in Microbial Ecology*, chapter 2, San Diego, USA, Academic Press Limited.
- FURTADO, A.L.S. & CASPER, P., 2000, "Different methods for extracting bacteria from freshwater sediment and a simple method to measure bacterial production in sediment samples", *Journal of Microbiological Methods*, v. 41, pp. 249-257.
- GAETA, S.A.; LORENZETTI, J.A.; MIRANDA, L.B.; SUSINI-RIBEIRO, S.M.M.; POMPEU, M. & ARAÚJO, C.E.S., 1999, "The Vitória Eddy and its relation to the

- phytoplankton biomass and primary productivity during the austral fall of 1995”, *Archive of Fishery and Marine Research*, v.47, pp. 253-270.
- GAGE, J.D. & TYLER, P.A., 1991, *Deep-Sea Biology: A Natural History of Organisms at the Deep Sea Floor*. 1 ed. Cambridge, Cambridge University Press.
- GAGE, J.D., 2003, “Food inputs, utilization, carbon flow and energetic”. In: Tyler, P.A. (ed), *Ecosystems of the deep oceans*, 1 ed., chapter 11, Amsterdam, SA, Elsevier.
- GASOL, J.M.; ZWEIFEL, U-L.; PETERS, F.; FURHMAN, J.A. & HAGSTRÖM, Å., 1999, “Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as assessed by flow cytometry in natural planktonic bacteria”, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, pp. 4475-4483.
- GASOL, J.M. & DEL GIORGIO, P.A., 2000, “Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities”, *Scientia Marina*, v. 64, pp. 197-224.
- GEWIN, V., 2006, “Discovery in the dirt”. *Nature*, v.439, pp. 384-386.
- GOUDA, M.K.; JAMMO, K.M. & AWAD, H.E., 2006, “Distribution of heterotrophic aerobic marine bacteria in sediment in Eastern Harbour of Alexandria”, *Annals of Microbiology*, v. 56, pp. 295-304.
- GOODAY, A.J.; UEMATSU, K.; KITAZATO, H.; TOYOFUKU, T. & YOUNG, J.R., 2010, “Traces of dissolved particles, including coccoliths, in the tests of agglutinated foraminifera from the Challenger Deep (10,897 m water depth, western equatorial Pacific)”, *Deep Sea Research*, v. 57, pp. 239-247.
- GOUGH, H.L. & STAHL, D.A., 2003, “Optimization of direct cell counting in sediment”, *Journal of Microbiological Methods*, v. 52, pp. 39-46.
- HERRING, P., 2002, *The Biology of the Deep Ocean*. 1 ed. New York, USA, Oxford University Press Inc.
- HEWSON, I. & FUHRMAN, J.A., 2007, “Covariation of viral parameters with bacterial assemblage richness and diversity in the water column and sediments”. *Deep-Sea Research*, v. 54, pp. 811-830.
- HOBBIE, J.E.; DALEY, R.J. & JASPER, S., 1977, “Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy”, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 33, pp. 1224-1228.
- HOLM-HANSEN, O. & BOOTH C.R., 1966, “The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance”. *Limnology and Oceanography*, v. 11, pp. 510-519.
- JANNASCH, H.W. & JONES, G.E., 1959, “Bacterial populations in seawater as determined by different methods of enumeration”, *Limnology and Oceanography*, v. 4, pp. 128-139.
- JANNASCH, H.W.; EIMHJELLEN, K.; WIRSEN, C.O. & FARMANFARMAIAN, A., 1971, “Microbial degradation of organic matter in the deep sea”, *Science*, v. 171, pp. 672-675.
- JANNASCH, H.W. & TAYLOR, C.D., 1984, “Deep-sea microbiology”. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 38, pp. 487-514.

- JØRGENSEN, B.B. & BOETIUS, A., 2007, "Feast and famine – microbial life in the deep-sea bed", *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, pp. 770-781.
- KARL, D.M., 2007, "Plastics-irradiated-etched: the Nuclepore[®] filter turns 45 years old", *Limnology and Oceanography Bulletin*, v. 16, pp. 49-54.
- KIRCHMAN, D.L. & WILLIAMS, P.J.B., 2000, "Introduction". In: KIRCHMAN, D.L. (ed), *Microbial Ecology of the Oceans*, 1 ed., chapter 1, New York, USA, John Wiley & Sons, Inc.
- LA FERLA, R.; LO GIUDICE, A. & MAIMONE, G., 2004, "Morphology and LPS content for the estimation of marine bacterioplankton biomass in the Ionian Sea", *Scientia Marina*, v. 68, pp. 23-31.
- LEBARON, P.; TROUSSELLIER, M. & GOT, P., 1994, Accuracy and precision of epifluorescence microscopy counts for direct estimates of bacterial numbers, *Journal of Microbiological Methods*, v. 19, pp. 89-94.
- LEBARON, P.; PARTHUISOT, N. & CATALA, P., 1998, "Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, pp. 1725-1730.
- LEE, S. & FUHRMAN, J. A., 1987, "Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, pp. 1298-1303.
- LESEN, A.E., 2005, "Relationship between benthic foraminifera and food resources in South San Francisco Bay, California, USA", *Marine Ecology Progress Series*, v. 297, pp. 131-145.
- LEVIN, L.A. & GOODAY, A.J., 2003, "The deep Atlantic Ocean". In: Tyler, P.A. (ed), *Ecosystems of the deep oceans*, 1 ed., chapter 5, Amsterdam, SA, Elsevier.
- LIPP, J.S.; MORONO, Y.; INAGAKI, F. & HINRICHS, K.-U., 2008, "Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments". *Nature*, v. 54, pp. 991-994.
- LOCHTE, K & TURLEY C.M., 1988, "Bacteria and cyanobacteria associated with phytodetritus in the deep sea", *Nature*, v. 333, pp. 67-69.
- LUNA, G.M.; MANINI, E. & DANOVARO, R., 2002, "Large fraction of dead and inactive bacteria in coastal marine sediments: comparison of protocols for determination and ecological significance", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, pp. 3509-3513.
- LUNAU, M.; LEMKE, A.; WALTHER, K.; MARTENS-HABBENA, W. & SIMON, M., 2005, "An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy". *Environmental Microbiology*, v. 7, pp. 961-968.
- MAEDA, M.; LEE, W.J. & TAGA, N., 1983, "Distribution of lipopolysaccharide, an indicator of bacterial biomass, in subtropical areas of the sea", *Marine Biology*, v. 76, pp. 257-262.
- MANINI, E.; LUNA, G.M. & DANOVARO, R., 2004, "Benthic bacterial response to variable estuarine water inputs", *FEMS Microbial Ecology*, v. 50, pp. 185-194.
- MARANGER, R. & BIRD, D.F., 1996, "High concentrations of viruses in the sediments of Lac Gilbert, Quebec", *Microbial Ecology*, v. 31, pp. 141-151.

- MARIE, D.; PARTENSKY, F.; JACQUET, S. & VAULOT, D., 1997, "Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid dye SYBRGreen I", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, pp. 186-193.
- MARIE, D.; BRUSSAARD, C.P.D.; THYRHAUG, R.; BRATBAK, G. & VAULOT, D., 1999, "Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by Flow Cytometry", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, pp. 45-52.
- MASCARELLI, A.L., 2009, "Geomicrobiology: Low life", *Nature*, v. 459, pp. 770-773.
- MEYER-REIL, L.A.; DAWSON, R.; LIEBEZEIT, G. & TIEDGE, H., 1978, "Fluctuations and interactions of bacterial activity in sandy beach sediments and overlying waters", *Marine Biology*, v. 48, pp. 161-171.
- MEYER-REIL, L.A., 1987, "Seasonal and spatial distribution of extracellular enzymatic activities and microbial incorporation of dissolved organic substrates in marine sediments", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, pp. 1748-1755.
- MONTAGNA, P.A., 1984, "In situ measurement of meiobenthic grazing rates on sediment bacteria and edaphic diatoms", *Marine Ecology Progress Series*, v. 18, pp. 119-130.
- MORONO, Y.; TERADA, T.; MASUI, N. & INAGAKI, F., 2009, "Discriminative detection and enumeration of microbial life in marine subsurface sediments", *ISME Journal*, v. 3, pp. 503-511.
- MOURET, A.; ANSCHUTZ, P.; LECROART, P.; CHAILLOU, G.; HYACINTHE, C.; DEBORDE, J.; JORISSEN, F.J.; DEFLANDRE, B.; SCHMIDT, S. & JOUANNEAU, J.-M., 2009, "Benthic geochemistry of manganese in the Bay of Biscay, and sediment mass accumulation rate", *Geo-Marine Letters*, v. 29, pp. 233-249.
- NAGATA, T., 1986, "Carbon and nitrogen content of natural planktonic bacteria", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 52, pp. 28-32.
- NAKAMURA, K. & TAKAYA, C., 2003, "Assay of phosphatase activity and ATP biomass in tideland sediments and classification of the intertidal area using chemical values", *Marine Pollution Bulletin*, v. 47, pp. 5-9.
- NIENCHESKI, L.F.; BAUMGARTEN, M.G.Z.; ROSO, R.H. & BASTOS, L.A.P., 1999, *Oceanografia química – levantamento bibliográfico e identificação do estado atual do conhecimento*. 1ed. Rio de Janeiro, FEMAR.
- NYBAKKEN, J. & BERTNESS, M.D., 2004, *Marine Biology: An Ecological Approach*. 6 ed. San Francisco, Pearson Education, Inc.
- PARKES, R.J.; CRAGG, B.A.; BALE, S.J.; GETLIFF, J.M.; GOODMAN, K.; ROCHELLE, P.A. FRY, J.C.; WEIGHTMAN, A.J. & HARVEY, S.M., 1994, "Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments", *Nature*, v. 371, pp. 410-413.
- PARKES, R.J.; CRAGG, B.A. & WELLSBURY, P., 2000, "Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: a review", *Hydrogeology Journal*, v. 8, pp. 11-28.
- PASCAL, P.-Y.; DUPUY, C.; MALLET, C.; RICHARD, P. & NIQUIL, N., 2008, "Bacterivory by benthic organisms in sediment: Quantification using ¹⁵N-enriched bacteria", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 355, pp. 18-26.

- PASCAL, P.-Y.; DUPUY, C.; RICHARD, P.; MALLET, C.; CHÂTELET, E.A. & NIQUIL, N., 2009, "Seasonal variation in consumption of benthic bacteria by meio- and macrofauna in an intertidal mudflat", *Limnology and Oceanography*, v. 54, pp. 1048-1059.
- PATCHING, J.W. & EARDLY, D., 1997, "Bacterial biomass and activity in the deep waters of the eastern Atlantic--evidence of a barophilic community", *Deep-Sea Research*, v. 44, pp. 1655-1670.
- PAUL K.L. & MORITA R.Y., 1971, "Effects of hydrostatic pressure and temperature on the uptake and respiration of amino acids by a facultatively psychrophilic marine bacterium", *Journal of Bacteriology*, v. 108, pp. 835-843.
- PAUL, J.H.; ROSE, J.B.; JIANG, S.C.; KELLOGG, C.A. & DICKSON, L., 1993, "Distribution of viral abundance in the reef environment of Key Largo, Florida", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, pp. 718-724.
- PEDROSA, P.; SUSUKI, M.S.; ANDRADE, L.; SILVEIRA, I.C.A.; SCHMIDT, A.C.K.; FALCAO, A.P.; LAVRADO, H.P.; REZENDE, C.E., 2006, "Hidroquímica de massas de água em regiões da margem continental brasileira, Bacia de Campos, Estado do Rio de Janeiro, RJ", *Geochimica Brasiliensis*, v. 20, pp. 104-122.
- PETROBRAS, 2001, *Monitoramento Ambiental da Atividade de Produção de Petróleo na Bacia de Campos – Etapa de Pré-Monitoramento – Relatório Final*, Rio de Janeiro CENPES-PETROBRAS.
- PETROBRAS, Disponível em: www.petrobras.com.br. Consultado em 22 de janeiro de 2010.
- PFANNKUCHE, O.; BOETIUS, A.; LOCHTE, K.; LUNDGREEN, U. & THIEL, H., 1999, "Responses of deep-sea benthos to sedimentation patterns in the North-East Atlantic in 1992", *Deep-Sea Research*, v. 46, pp. 573-596.
- QUÉRIC, N.-V.; SOLTWEDEL, T. & ARNTZ, W.E., 2004, "Application of a rapid direct viable count method to deep-sea sediment bacteria", *Journal of Microbiological Methods*, v. 57, pp. 351-367.
- RAGHUKUMAR, C.; NATH, B.N.; SHARMA, R.; BHARATHI, P.A.L. & DALAL, S.G., 2006, "Long-term changes in microbial and biochemical parameters in the Central Indian Basin", *Deep-Sea Research*, v. 53, pp. 1695-1717.
- RELEXANS, J.-C.; DEMING, J.; DINET, A.; GAILLARD, J.-F. & SIBUET, M., 1996, "Sedimentary organic matter and micro-meio-benthos with relation to trophic conditions in the tropical northeast Atlantic", *Deep-Sea Research*, v. 43, pp. 1343-1368.
- REX, M.A.; ETTER, R.J.; MORRIS, J.S.; CROUSE, J.; MCCLAIN, C.R.; JOHNSON, N.A.; STUART, C.T.; DEMING, J.W.; THIES, R. & AVERY, R., 2006, "Global bathymetric patterns of standing stock and body size in the deep-sea benthos", *Marine Ecology Progress Series*, v. 317, pp. 1-8.
- RICHARDSON, M.D. & YOUNG, D.K., 1987, "Abyssal benthos of the Venezuela Basin, Caribbean Sea: standing stock considerations", *Deep-Sea Research*, v. 34, pp. 145-164.
- RIIS, V.; LORBEER, H. & BABEL, W., 1998, "Extraction of microorganisms from soil: evaluation of the efficiency by counting methods and activity measurements", *Soil Biology and Biochemistry*, v. 30, pp. 1573-1581.

- ROBINSON, J.D.; MANN, K. H. & NOVITSKY, J. A. 1982. "Conversion of the particulate fraction of seaweed detritus to bacterial biomass". *Limnology and Oceanography*, v. 27, pp. 1072-1079.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.; DARDANELLI, M.S. & RUÍZ-SAÍNS, J.E., 2007, "Attachment of bacteria to the roots of higher plants", *FEMS Microbial Letters*, v. 272, pp. 127-136.
- ROUSSEL, E.G.; BONAVIDA, M.-A.C.; QUERELLOU, J.; CRAGG, B.A.; WEBSTER, G.; PRIEUR, D. & PARKES, R.J., 2008, "Extending the sub-sea-floor biosphere", *Science*, v. 320, pp.1046.
- ROWE, G.T. & DEMING, J.W., 1985, "The role of bacteria in the turnover of organic carbon in deep-sea sediments", *Journal of Marine Research*, v. 43, pp. 925-950.
- ROWE, G.; SIBUET, M.; DEMING, J.; KHRIPOUNOFF, A.; TIETJEN, J.; MACKO, S. & THEROUX, R., 1991, "'Total' sediment biomass and preliminary estimates of organic-carbon residence time in deep-sea benthos", *Marine Ecology-Progress Series*, v. 79, pp. 99-114.
- ROWE, G.T.; WEI, C.; NUNNALLY, C.; HAEDRICH, R.; MONTAGNA, P.; BAGULEY, J.G.; BERNHARD, J.M.; WICKSTEN, M.; AMMONS, A.; BRIONES, E.E.; SOLIMAN, Y. & DEMING, J.W., 2008, "Comparative biomass structure and estimated carbon flow in food web sin the deep Gulf of Mexico", *Deep-Sea Research*, v. 55, pp. 2699-2711.
- SCHIERMEIER, Q., 2009, "Experts draw up ocean-drilling wish list", *Nature*, v. 461, pp. 578-579.
- SCHIPPERS, A.; NERETIN, L.N.; KALLMEYER, J.; FERDELMAN, T.G.; CRAGG, B.A.; PARKES, R.J. & JØRGENSEN, B.B., 2005, "Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria", *Nature*, v. 433, pp. 861-864.
- SCHIPPERS, A. & NERETIN, L.N., 2006, "Quantification of microbial communities in near-surface and deeply buried marine sediments on the Peru continental margin using real-time PCR", *Environmental Microbiology*, v. 8, pp. 1251-1260.
- SCHMIDT, J.L.; DEMING, J.W.; JUMARS, P.A. & KEIL, R.G., 1998, "Constancy of bacterial abundance in surficial marine sediments", *Limnology and Oceanography*, v. 43, pp. 976-982.
- SCHWARZ, J. R. & COLWELL, R.R., 1975, "Heterotrophic activity of deep-sea sediment bacteria", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 30, pp. 639-649.
- SHAPIRO, H.M., 2003, *Practical Flow Cytometry*, 4 ed. New Jersey, USA, John Wiley & Sons, Inc.
- SMITH, K.L.JR.; KAUFMANN, R.S.; BALDWIN, R.J. & CARLUCCI, A.F., 2001, "Pelagic-benthic coupling in the abyssal eastern North Pacific: an 8-year time-series study of food supply and demand", *Limnology and Oceanography*, v. 46, pp. 543-556.
- SMITH, E.M. & DEL GIORGIO, P.A., 2003, "Low fractions of active bacteria in natural aquatic communities?" *Aquatic Microbial Ecology*, v. 31, pp. 203-208.
- STOECK, T.; DUINEVELD, G.C.A.; KOK, A. & ALBERS, B.P., 2000, "Nucleic acids and ATP to assess microbial biomass and activity in a marine biosedimentary system", *Marine Biology*, v. 137, pp. 1111-1123.

- SUSINI-RIBEIRO, S.M., 1999, "Biomass distribution of pico-, nano-and microplankton on the continental shelf of Abrolhos, East Brazil", *Archive of Fishery and Marine Research*, v. 47, pp. 271-284.
- TABOR, P.S.; DEMING, J.W.; OHWADA, K. & COLWELL R.R., 1982, "Activity and growth of microbial populations in pressurized deep-sea sediment and animal gut samples", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 44, pp. 413-422.
- TAMBURINI, C.; GARCIN, J.; RAGOT, M. & BIANCHI, A., 2002, "Biopolymer hydrolysis and bacterial production under ambient hydrostatic pressure through a 2000 m water column in the NW Mediterranean", *Deep-Sea Research*, v. 49, pp. 2109-2123
- TAMBURINI, C.; GAREL, M.; ALI, B.A.; MÉRIGOT, B.; KRIWY, P.; CHARRIÈRE, B. & BUDILLON, G., 2009, "Distribution and activity of Bacteria and Archaea in the different water masses of the Tyrrhenian Sea", *Deep-Sea Research*, v. 56, pp. 700-712.
- TAMMERT, H.; OLLI, K.; STURLUSON, M. & HODAL, H., 2008, "Bacterial biomass and activity in the marginal ice zone of the northern Barents Sea". *Deep-Sea Research*, v. 55, pp. 2199-2209.
- THISTLE, D., 2003, "The deep-sea floor: An overview". In: Tyler, P.A. (ed), *Ecosystems of the deep oceans*, 1 ed., chapter 2, Amsterdam, SA, Elsevier.
- TURLEY, C.M., 2000, "Bacteria in the cold deep-sea benthic boundary layer and sediment–water interface of the NE Atlantic". *FEMS Microbiology Ecology*, v. 33, pp. 89-99.
- TURLEY, C.M. & DIXON, J.L., 2002, "Bacterial numbers and growth in surficial deep-sea sediments and phytodetritus in the NE Atlantic: Relationships with particulate organic carbon and total nitrogen", *Deep-Sea Research*, v. 49, pp. 815-826.
- VELJI, M.I. & ALBRIGHT, L.J., 1986a, "Microscopic enumeration of attached marine bacteria of seawater, marine sediment, fecal matter, and kelp blade samples following pyrophosphate and ultrasound treatments", *Canadian Journal of Microbiology*, v. 32, pp. 121-126.
- VELJI, M. I. & ALBRIGHT, L. J., 1986b, "The dispersion of adhered marine bacteria by pyrophosphate and ultrasound prior to direct counting". *Actes de Colloques*, v. 3, pp. 249–259.
- VIANA, A.R.; FAUGÈRES, J.C.; KOWSMANN, R.O.; LIMA, J.A.M.; CADDAH, LFG. & RIZZO, J.G., 1998, "Hydrology, morphology and sedimentology of the Campos continental margin, offshore Brazil", *Sedimentary Geology*, v. 115, pp. 133-157.
- WATSON, S.W.; NOVITSKY, T.J.; QUINBY H.L.; & VALOIS, F.W., 1977, "Determination of bacterial number and biomass in marine-environment", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 33, pp. 940-946.
- WELLSBURY, P.; GOODMAN, K.; BARTH, T.; CRAGG, B.A.; BARNES, S.P. & PARKES, R.J., 1997, "Deep marine biosphere fuelled by increasing organic matter availability during burial and heating", *Nature*, v. 388, pp. 573-576.
- WELLSBURY, P.; MATHER, I. & PARKES, R.J., 2002, "Geomicrobiology of deep, low organic carbon sediments in the Woodlark Basin, Pacific Ocean". *FEMS Microbiology Ecology*, v. 42, pp. 59-70.

- WIELTSCHNIG, C.; FISCHER, U.R.; VELIMIROV, B. & KIRSCHNER, A.K.T., 2008, "Effects of deposit-feeding macrofauna on benthic bacteria, viruses, and protozoa in a silty freshwater sediment", *Microbial Ecology*, v. 56, pp. 1-12.
- WILLIAMS, P.M. & CARLUCCI, A.F., 1976, "Bacterial utilization of organic matter in the deep sea", *Nature*, v. 262, pp. 810-811.
- WIRSEN, C.O. & JANNASCH, H.W., 1975, "Activity of marine psychrophilic bacteria at elevated hydrostatic pressures and low temperatures", *Marine Biology*, v. 31, pp. 201-208.
- WIT, R.; RELEXANS, J.-C.; BOUVIER, T. & MORIARTY, D.J.W., 1997, "Microbial respiration and diffusive oxygen uptake of deep-sea sediments in the Southern Ocean (ANTARES-I cruise)", *Deep-Sea Research*, v. 44, pp. 1053-1068.
- ZAR, J. H., 1999, *Biostatistical Analysis*. 2 ed. New Jersey, Prentice-Hall.
- ZOBELL, C.E. & FELTHAM, C.B., 1942, "The Bacterial Flora of a Marine Mud Flat as an Ecological Factor" *Ecology*, v. 23, pp. 69-78.
- ZOBELL, C.E. & MORITA, R.Y., 1959, "Deep-sea bacteria", *Galathea Report*, v. 1, pp. 139-154.
- ZUBKOV, M.V.; SLEIGH, M.A.; TARRAN, G.A.; BURKILL, P.H. & LEAKEY, R.J.G. 1998. "Picoplanktonic community structure on an Atlantic transect from 50°N to 50°S". *Deep-Sea Research*, v. 45, pp. 1339-1355.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)