

ANÁLISE DE ABUNDÂNCIA BACTERIANA NO ESTUDO DA ECOLOGIA MICROBIANA DE SEDIMENTOS MARINHOS

Karla Danila Coloia de Carvalho^{1*} & *Rodolfo Paranhos*¹

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Inst. de Biologia, Depto. Biologia Marinha, Laboratório de Hidrobiologia, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brasil. CEP. 21941-590.

E-mails: karvalho@biologia.ufrj.br, rodolfo@biologia.ufrj.br

RESUMO

Os ecossistemas de mar profundo representam cerca de 65% da superfície do planeta e desempenham um papel importante na produção de biomassa e nos ciclos biogeoquímicos em uma escala global. Estes processos são amplamente mediados por procariotos bentônicos, os quais utilizam detritos orgânicos para a produção de biomassa e respiração. Por este motivo, os sedimentos marinhos se configuram como importante matriz biológica e tem grande relevância na ecologia do sistema de mar profundo. No tempo geológico, eventos que ocorrem neste compartimento, como a degradação de matéria orgânica, afetam profundamente a composição química do oceano e da atmosfera. Devido à sua importância e complexidade, o sistema de mar profundo e a sua microbiota associada têm sido objeto de inúmeros estudos ao longo dos últimos 50 anos, especialmente na última década. Os parâmetros mais comumente analisados nos sedimentos são abundância bacteriana, biomassa e atividade metabólica. Diversas metodologias podem ser utilizadas na análise da atividade microbiana em sedimentos, entre elas a incorporação de aminoácidos marcados com ¹⁴C ou ³H e a medida da respiração bacteriana. A análise de biomassa frequentemente exige a determinação prévia da abundância bacteriana, tornando imprescindível que a quantificação da microbiota do sedimento seja realizada de forma correta. A separação das células das partículas de sedimento e sua apropriada desagregação são necessárias para aplicações de microscopia de epifluorescência e para a análise por citometria em fluxo. O uso otimizado das técnicas de extração e análise e sua avaliação de modo combinado com outros parâmetros microbianos possibilitará um maior entendimento do papel desenvolvido pelos organismos procariotos nos oceanos do mundo.

Palavras-chave: Bactérias de mar profundo; abundância; biomassa; matéria orgânica; métodos de extração de bactérias.

ABSTRACT

ANALYSIS OF BACTERIAL ABUNDANCE IN THE STUDY OF MICROBIAL ECOLOGY OF MARINE SEDIMENTS. Deep-sea ecosystems cover about 65% of the Earth's surface and play an important part in biomass production and biogeochemical cycles on a global scale. These processes are largely mediated by benthic prokaryotes which use organic detritus for biomass production and respiration. Therefore marine sediments are configured as important biological matrix and play a prominent role in the ecology of the system of the deep sea. Events that occur in this compartment as organic matter degradation profoundly affect the chemical composition of the ocean and atmosphere in geological time. Due to its importance and complexity, the system of deep sea and its associated microorganisms have been the object of numerous studies in the last 50 years, especially in the last decade. Bacterial abundance, biomass and metabolic activity are the parameters most commonly measured in the sediments. Several methodologies can be used in microbial activity analysis of sediments, including the amino acids labeled with ¹⁴C or ³H incorporation and the measurement of bacterial respiration. The biomass analysis often requires previous determination of bacterial abundance making it imperative that the quantification of sediment microorganisms is performed correctly. The separation of cells from sediment particles and their proper detachment are necessary for epifluorescence microscopy applications

and flow cytometry analysis. The optimal use of extraction and analysis techniques and combined evaluation with other microbial parameters enable a greater understanding of the role played by prokaryotic organisms in world oceans.

Keywords: Deep sea bacteria; abundance; biomass; organic matter; detachment procedures.

RESUMEN

ANÁLISIS DE ABUNDANCIA BACTERIANA EN EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA MICROBIANA DE SEDIMENTOS MARINOS. Los ecosistemas de mar profundo representan cerca de 65% de la superficie del planeta y desempeñan un papel importante en la producción de biomasa y en los ciclos biogeoquímicos en una escala global. Estos procesos son ampliamente mediados por procariotes bentónicos, los cuales utilizan detritos orgánicos para la producción de biomasa y respiración. Por este motivo, los sedimentos marinos se configuran como una importante matriz biológica y tienen gran relevancia en la ecología del sistema de mar profundo. Los eventos que ocurren en tiempo geológico, como la degradación de materia orgánica, afectan profundamente la composición química del océano y de la atmósfera. Debido a la importancia y complejidad, el sistema de mar profundo y la microbiota asociada ha sido objeto de diversos estudios a lo largo de los últimos 50 años, especialmente en la última década. Los parámetros más comúnmente analizados en los sedimentos son: abundancia bacteriana, biomasa y actividad metabólica. Diversas metodologías pueden ser utilizadas en el análisis de la actividad microbiana en sedimentos, entre ellas la incorporación de aminoácidos marcados con ^{14}C o ^3H y la medida de la respiración bacteriana. El análisis de biomasa frecuentemente exige la determinación previa de la abundancia bacteriana, tornando imprescindible que la cuantificación de la microbiota del sedimento sea realizada de forma correcta. La separación de las células de las partículas de sedimento y su apropiada desagregación son necesarias para aplicaciones de microscopía de epifluorescencia y para el análisis por citometría de flujo. El uso optimizado de las técnicas de extracción el análisis y su evaluación de modo combinado con otros parámetros microbianos posibilitará un mayor entendimiento del papel desarrollado por los organismos procariotes en los océanos del mundo.

Palabras clave: Bacterias de mar profundo; abundancia; biomasa; materia orgánica; métodos de extracción de bacterias.

INTRODUÇÃO

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 200m e é continuada pelo talude continental, que apresenta declive acentuado até cerca de 4km de profundidade, onde encontra a planície abissal. As planícies abissais são regiões relativamente planas, apresentam profundidades de 4-6km 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, localizadas 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 10.900m de profundidade, na Fossa das Marianas.

Compreendendo a maior parte das áreas oceânicas, a região profunda dos oceanos tem início na quebra da plataforma, a cerca de 200m 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 os amostradores mais utilizados estão *box corers e multi-corers* (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 0-20cm) 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 e 1.626m abaixo dos sedimentos de superfície, respectivamente. Particularmente para este propósito de coleta em subsuperfície são utilizados equipamentos e navios de 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, 2000, Wellsbury *et al.* 1997, 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.

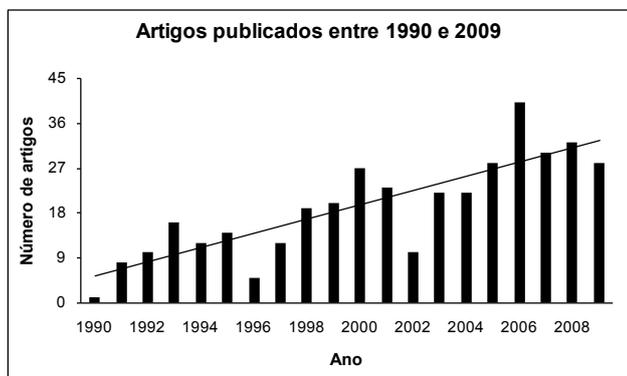


Figura 1. Número de artigos publicados entre 1990 e setembro de 2009 presentes na base de dados da Web of Science. A busca utilizou a combinação das palavras-chave “bacteria”, “sediment” e “ocean”.

Figure 1. Number of articles published between 1990 and September 2009, present in Web of Science database. The search used the combination of key-words “bacteria”, “sediment” and “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 – 10km de profundidade). Antes desta

data, 5.942m 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 (10km). ZoBelle e 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).

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 fontes 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 (~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 ³H-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*, 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. Wirsén & 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 fitodetrítos 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. Em tese, a quantidade de matéria orgânica presente no sedimento deveria fornecer uma aproximação razoável da quantidade de substrato potencial aos microrganismos depositivos. Porém, quando se relaciona o número de organismos por m² como carbono orgânico disponível 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). 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 1000atm 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, na medida em que consomem cerca de $2,22 \times 10^{11}$ bactérias.cm⁻².ano⁻¹ (Bott & Kaplan 1990). Entre os membros dominantes de muitas comunidades bentônicas profundas podemos ressaltar as holotúrias depositívoras, representantes da megafauna, que consomem a matéria depositada no fundo oceânico de modo intermitente, misturando e revirando o sedimento numa escala considerável (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 certas 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 10cm do fundo oceânico. Como o oxigênio é esgotado em estratos profundos, os processos que empregam outros aceptores de elétrons, tais como NO₃⁻, {Mnox}, Feox} e SO₄²⁻, 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 10cm (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 8cm de profundidade (Bolliger *et al.* 1991). Esta também é a profundidade na qual

se encontra 85% da biomassa bacteriana total viável presente nos primeiros 20cm 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 & 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 15cm 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 500m 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 europeias estabelecidas há muitos anos. O Atlântico Sul ocidental e grande parte do Oceano Indo-Pacífico, particularmente o Hemisfério Sul, são atualmente sub-representados 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.

PARÂMETROS MICROBIANOS COMUMENTE ANALISADOS NOS SEDIMENTOS

ATIVIDADE MICROBIANA

A avaliação da atividade metabólica microbiana mede, 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, 1985), 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, sendo que 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 incluem a oxidação de sulfeto, ferro e manganês presentes no sedimento, ou se fornecem uma medida exclusiva da oxidação do carbono pelos microrganismos (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 2.700m apresentavam taxas de atividade quase equivalentes 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 reportam 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.

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 & 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 lipopolissacarídeo (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 1).

Para a utilização de fatores de conversão previamente estabelecidos na literatura para no cálculo da biomassa bacteriana se faz necessário considerar o tipo de amostra em questão, a faixa de profundidade de origem das amostras e ter informações sobre os tipos celulares presentes. Sedimentos mais profundos geralmente contêm células menores e a biomassa de sedimentos rasos pode ser subestimada quando calculada a partir da conversão direta dos números bacterianos (Deming & Carpenter 2008). Ainda segundo estes autores, sedimentos rasos têm maior diversidade de tamanhos celulares quando comparados a sedimentos profundos, de modo que o cálculo da biomassa diretamente da abundância (sem informação do tamanho celular) pode ser adequada somente para estimar biomassa bacteriana em sedimentos abissais.

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.

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 estreitamente relacionada às propriedades do sedimento (Danovaro & Fabiano 1995), a abundância bacteriana pode ser utilizada como um forte indicativo de mudanças no fluxo de

Tabela 1. Principais fatores de conversão de abundância bacteriana e volume celular em biomassa de carbono.

Table 1. Main factors for conversion bacterial abundance and cell volume to biomass carbon.

| Referência | Amostra | Descrição do Cálculo |
|-----------------------------|-----------|-------------------------------|
| ZoBell & Morita 1959 | Sedimento | 200 fg C.célula ⁻¹ |
| Williams & Carlucci 1976 | Água | 10 fg C.célula ⁻¹ |
| Nagata 1986 | Água | 106 fg C.µm ⁻³ |
| Lee & Fuhrman 1987 | Água | 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 |
| Bjornsen & Kuparinen 1991 | Água | 390 fg C.µm ⁻³ |

(fg) fentograma = 10⁻¹⁵g

nutrientes no fundo oceânico, resultante de variações sazonais e interanuais (Danovaro *et al.* 1999) e de outras mudanças ambientais.

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, 1985, Rowe & Deming 1985, Velji & Albright 1986a,b, Bott & Kaplan 1990, Parkes *et al.* 1994, Epstein & Rossel 1995, Relexans *et al.* 1996, Wit *et al.* 1997, Danovaro *et al.* 1998, 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 que a fixação com paraformaldeído minimiza a perda celular no processo de sonicação das amostras durante o processo de extração. 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. Das substâncias em questão o formol (ou paraformaldeído) parece ser o mais indicado para a preservação de células bacterianas destinadas à análise de abundância.

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 no método da diluição mínima.

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, 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, muitas vezes as células bacterianas não ficam distribuídas de maneira uniforme e estão aderidas aos fragmentos (Furtado & Casper 2000). Assim, a contagem das bactérias do sedimento exige a tarefa de separá-las das partículas do sedimento 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 (mais veja Duhamel & Jacquet 2006, Amalfitano & Fazi 2008, Amalfitano *et al.* 2009).

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, 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 do que contar como bactéria, pois amostras bentônicas, ricas em material detritico, produzem uma quantidade considerável de partículas autofluorescentes de tamanho aproximado aos das bactérias (Epstein & Rossel 1995). A concentração de material detritico em amostras naturais frequentemente excede a concentração de bactérias. Uma vez que grande parte do material detritico é similar em tamanho e forma às bactérias, a correta identificação de uma bactéria é frequentemente difícil de ser realizada (Watson *et al.* 1977).

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 (Epstein & Rossel 1995, Furtado & Casper 2000, Danovaro *et al.* 2001, Buesing & Gessner 2002, Lunau *et al.* 2005, Duhamel & Jacquet 2006) com o objetivo de testar a eficiência destes métodos físicos de separação, associados ou não a métodos químicos. 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 60s). 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 utilizaram apenas banho de ultrassom para separar as bactérias da matriz do sedimento (Relexans *et al.* 1996, Danovaro *et al.* 1998, 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 (Meyer-Reil *et al.* 1978, Velji & Albright 1986a,b, 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) 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. De acordo com Duhamel & Jacquet (2006), a sonicação, realizada após a adição de pirofosfato, é considerada uma das primeiras etapas da extração das bactérias. Segundo estes autores, diferentes estudos que utilizam a sonicação concordam que 3 minutos são suficientes para separar bactérias do sedimento, mas nenhum trabalho deixa claro que a adição de gelo ao banho de ultrassom ocasiona redução de cerca de 29% na densidade bacteriana. 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.

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 (ver Tabela 2), se mostrado 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 sonificador com sonda), tempos de incubação, concentrações de reagentes e soluções, entre outras.

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 nucleicos 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, algas pequenas, 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.

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 devido ser 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 ($r = 0,84$), 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.

Unidades utilizadas para expressar os resultados

A questão mais importante aqui 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). 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,b, Luna *et al.* 2002, Lunau *et al.* 2005, Gouda *et al.* 2006, Raghukumar *et al.* 2006). A análise deste parâmetro por massa de sedimento seco origina resultados com distribuição bacteriana variando amplamente de acordo com a profundidade de coleta. Uma vez dimensionada ao volume de sedimento, a abundância demonstra grande constância de resultados (Rex *et al.* 2006, Deming & Carpenter 2008).

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 6000m, Rex *et al.* (2006) concluíram que os sedimentos marinhos superficiais comportam uma densidade de bactérias notavelmente constante ($\sim 10^9$ 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*. A Tabela 2 apresenta dados de abundância bacteriana de diversos locais do mundo, bem como a profundidade de coleta e o método de análise utilizado.

Tabela 2. Médias de Abundância Bacteriana em amostras de sedimento de diversos locais do mundo.
Table 2. Bacterial Abundance averages in sediment samples from various locations around the world.

| Estudo | Amostragem | | | Análise | | | Abundância Bacteriana |
|------------------------------|--|-------------------|-------------------------|-----------------|---------|--|-----------------------|
| | Localização | Profundidade | Extração | Coloração | Deteção | | |
| ZoBell & Morita 1959 | Philippine Trench ¹ | 10.000m 1.000m | * | * | Cultivo | 0,21 – 3,5 x 10 ⁶ cel.g ⁻¹ PU 0,54 – 2,3 x 10 ⁶ cel.g ⁻¹ PU | |
| ZoBell & Morita 1959 | Oceano Índico | 7.000m | * | * | Cultivo | 1,05 – 2,3 x 10 ⁶ cel.g ⁻¹ PU | |
| Deming & Colwell 1982 | Planície Abissal Demerara ² | 4.500 - 4.800m | * | Acridine Orange | Epif. | 4,4 – 10,7 x 10 ⁸ cel.g ⁻¹ PS | |
| Rowe & Deming 1985 | Planície Abissal Demerara ² | 4.500 - 4.800m | * | Acridine Orange | Epif. | 3,08 - 4,65 x 10 ⁸ cel.g ⁻¹ PS | |
| Rowe & Deming 1985 | Baía de Biscay ³ | 4.000 - 4.700m | * | Acridine Orange | Epif. | 2,02 – 4,26 x 10 ⁸ cel.g ⁻¹ PS | |
| Boetius <i>et al.</i> 1996 | Ionian and Levantine Seas | 200 – 4.600m | Pirofosfato e sonicação | Acridine Orange | Epif. | 1,55 – 3,94 x 10 ⁹ cel.cm ⁻³ | |
| Wit <i>et al.</i> 1997 | Oceano Índico | 4.200 – 4.800m | Pirofosfato e sonicação | DAPI | Epif. | 8,6 – 96,9 x 10 ⁸ cel.g ⁻¹ PS | |
| Danovaro <i>et al.</i> 1998 | Mediterraneo Oriental | 40 - 1.500m | Sonicação | Acridine Orange | Epif. | 1,02 - 3,48 x 10 ⁸ cel.g ⁻¹ PS | |
| Boetius <i>et al.</i> 2000 | Arabian Sea | 1.900 - 4.400m | Sonicação | Acridine Orange | Epif. | 0,6 – 4,0 x 10 ⁹ cel.cm ⁻³ | |
| Danovaro & Serresi 2000 | Mediterraneo Oriental | 1.200 - 4.200m | Pirofosfato e sonicação | SYBR-1 | Epif. | 4,0 - 11 x 10 ⁸ cel.g ⁻¹ PS | |
| Dixon & Turley 2000 | Atlântico Nordeste | 1.100 – 3.600m | Sonicação | Acridine Orange | Epif. | 1,09 – 11,96 x 10 ⁸ cel.g ⁻¹ PS | |
| Danovaro <i>et al.</i> 2002a | Mar Mediterrâneo | 1.300 – 4.000m | Pirofosfato e sonicação | Acridine Orange | Epif. | 1,84 – 6,54 x 10 ⁸ cel.g ⁻¹ PS | |

Continuação Tabela 2.

| Estudo | Amostragem | | Análise | | | Abundância Bacteriana |
|-------------------------------|------------------------------|----------------|------------------------------|-----------------------------|---------|---|
| | Localização | Profundidade | Extração | Coloração | Deteção | |
| Danovaro <i>et al.</i> 2002b | Northern Adriatic Sea | 15 – 50m | Sonicação | Acridine Orange | Epif. | 1,4 – 36,5 x 10 ⁸ cel.g ⁻¹ PS |
| Luna <i>et al.</i> 2002 | Adriatic Sea ⁴ | 9 – 12m | Sonicação | Acridine Orange | Epif. | 1,5 – 53,1 x 10 ⁸ cel.g ⁻¹ PS |
| Turley & Dixon 2002 | Atlântico Nordeste | 1.100 - 3.600m | Sonicação | Acridine Orange | Epif. | 0,56 – 5,32 x 10 ⁸ cel.mL ⁻¹ |
| Quéric <i>et al.</i> 2004 | Oceano Ártico | 1.200 – 5.600m | Pirofosfato e Homogeneização | Iodeto de Propídio e Syto 9 | Epif. | 0,8 – 5,4 x 10 ⁸ cel.cm ⁻³ |
| Lunau <i>et al.</i> 2005 | Mar do Norte | 2 - 40m | Metanol | SYBR Green I | Epif. | 4,46 x 10 ⁶ cel.g ⁻¹ PU |
| | | | Pirofosfato | SYBR Green I | Epif. | 3,64 x 10 ⁶ cel.g ⁻¹ PU |
| | | | Tween 80 | SYBR Green I | Epif. | 2,56 x 10 ⁶ cel.g ⁻¹ PU |
| Gouda <i>et al.</i> 2006 | Eastern Harbour ⁵ | 1,5 – 13m | Metanol | SYBR Green I | Epif. | 9,03 x 10 ⁸ cel.g ⁻¹ PU |
| | | | Pirofosfato | SYBR Green I | Epif. | 7,04 x 10 ⁸ cel.g ⁻¹ PU |
| | | | Tween 80 | SYBR Green I | Epif. | 5,77 x 10 ⁸ cel.g ⁻¹ PU |
| Raghukumar <i>et al.</i> 2006 | Bacia Indiana Central | 5.000m | Sonicação | Acridine Orange | Epif. | 2,0 x 10 ⁹ cel.g ⁻¹ PS |
| Hewson <i>et al.</i> 2007 | Oceano Pacífico | 20 – 900m | Pirofosfato e homogeneização | SYBR Green I | Epif. | 0,72 - 1,63 x 10 ⁸ cel.mL ⁻¹ |
| Deming & Carpenter 2008 | Golfo do México | 212 – 3.732m | Triton-X | Acridine Orange e DAPI | Epif. | 0,1 - 1,89 x 10 ⁹ cel.cm ⁻³ |

(*) 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.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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 procariotas 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 de abundância bacteriana em sedimentos marinhos ainda estão pouco definidos pela 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) análise das causas da variabilidade nas observações; (2) desenvolvimento de uma explicação para o valor médio. Os trabalhos que abordam a microbiologia de sedimentos marinhos têm predominantemente usado a primeira abordagem. Dado uma temperatura constante, a área superficial do grão de sedimento foi identificada como a mais forte correlação da abundância em sedimentos costeiros superficiais. 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. 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 consequente 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 do paraformaldeído como preservante das células, (2) do pirofosfato de sódio associado à sonicação na extração das células bacterianas e (3) na quantificação por citometria em fluxo. A correta determinação da abundância bacteriana e consequentemente 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 procariotas nos oceanos do mundo.

AGRADECIMENTOS: Este trabalho é parte da dissertação de Mestrado de Karla Danila Coloia de Carvalho, que foi possibilitado pelo projeto "Ambiente pelágico: caracterização ambiental do oceano profundo na área da Bacia de Campos (Oceanprof)" financiado pelo CENPES-FUJB. Gostaríamos de agradecer aos membros da banca – Professores João Leal e Helena Lavrado – e aos revisores anônimos pela contribuição à versão final deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AMALFITANO, S. & FAZI, S. 2008. Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 75: 237-243.
- AMALFITANO, S.; FAZI, S. & PUDDU, A. 2009. Flow cytometric analysis of benthic prokaryotes attached to sediment particles. *Journal of Microbiological Methods*, 79: 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*, 55: 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*, 57: 295-306.
- BJORNSEN, P.K. & KUPARINEN, J. 1991. Determination of bacterioplankton biomass, net production and growth efficiency in the Southern Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 71: 185-194.
- BLACKBURN, T.H. 1987. Microbial food webs in sediments. Pp. 39-58. In: M.A. Sleight (ed.). *Microbes in the sea*. Ellis Horwood Limited, Chichester, WS. 241p.
- 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*, 43: 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*, 47: 2835-2875.
- BOLLIGER, R.; HANSELMANN, K.W. & BACHOFEN, R. 1991. Microbial potential in deep-sea sediments. *Experientia*, 47: 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*, 56: 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*, 9: 336-345.
- BRUSSAARD, C.P.D.; TIMMERMANS, K.R.; UITZ, J. & VELDHUIS, M.J.W. 2008. Virioplankton dynamics and virally induced phytoplankton lysis versus microzooplankton grazing southeast of the Kerguelen (Southern Ocean). *Deep-Sea Research*, 55: 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*, 27: 29-36.
- CAI, W.-J. & SAYLES, F.L. 1996. Oxygen penetration depths and fluxes in marine sediments. *Marine Chemistry*, 52: 123-131.
- COLOMBET, J.; ROBIN, A.; LAVIE, L.; BETTAREL, Y.; CAUCHIE, H.M. & SIME-NGANDO, T. 2007. Virioplankton 'pegylation': Use of PEG (polyethylene glycol) to concentrate and purify viruses in pelagic ecosystems. *Journal of Microbiological Methods*, 71: 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*, 9: 17-26
- DEFLAUN, M.E & MAYER, L.M. 1983. Relationships between bacteria and grain surfaces in intertidal sediments. *Limnology and Oceanography*, 28: 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*, 41: 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*, 47: 471-486.
- DEMING, J.W. & COLWELL, R.R. 1982. Barophilic Bacteria Associated with Digestive Tracts of Abyssal Holothurians. *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 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*, 50: 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*, 55: 2597-2606.

- D'HONDT, S.; RUTHERFORD, S. & SPIVACK, A.J. 2002. Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments. *Science*, 295: 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*, 440: 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*, 16: 17-25.
- DUHAMEL, S. & JACQUET, S. 2006. Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 64: 316-332.
- EPSTEIN, S.S. & ROSSEL, J. 1995. Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. *Marine Ecology Progress Series*, 117: 289-298.
- FRY, J.C. 1990. Direct methods and biomass estimation. Pp. 41-86. In: R. Grigorova & J.R. Norris (eds.). *Techniques in Microbial Ecology*. Academic Press Limited, London, GL. 627p.
- 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*, 41: 249-257.
- GAGE, J.D. & TYLER, P.A. 1991. *Deep-Sea Biology: A Natural History of Organisms at the Deep Sea Floor*. Cambridge University Press, Cambridge, CB. 504p.
- GAGE, J.D. 2003. Food inputs, utilization, carbon flow and energetics. Pp. 313-380. In: P.A. Tyler (ed.). *Ecosystems of the deep oceans*. Elsevier, Amsterdam, SA. 582p.
- GASOL, J.M.; ZWEIFEL, U-L.; PETERS, F.; FUHRMAN, 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*, 65: 4475-4483.
- GASOL, J.M. & DELGIORGIO, P.A. 2000. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina*, 64: 197-224.
- 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*, 56: 295-304.
- GOUGH, H.L. & STAHL, D.A. 2003. Optimization of direct cell counting in sediment. *Journal of Microbiological Methods*, 52: 39-46.
- HERRING, P. 2002. *The Biology of the Deep Ocean*. Oxford University Press, Oxford, OX. 328p.
- 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*, 54: 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*, 33: 1224-1228.
- HOLM-HANSEN, O. & BOOTH C.R. 1966. The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. *Limnology and Oceanography*, 11: 510-519.
- JANNASCH, H.W. & JONES, G.E. 1959. Bacterial populations in seawater as determined by different methods of enumeration. *Limnology and Oceanography*, 4: 128-139.
- KARL, D.M. 2007. Plastics-irradiated-etched: the Nuclepore® filter turns 45 years old. *Limnology and Oceanography Bulletin*, 16: 49-54.
- 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*, 68: 23-31.
- 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*, 64: 1725-1730.
- LEE, S. & FUHRMAN, J. A. 1987. Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1298-1303.
- LESEN, A.E. 2005. Relationship between benthic foraminifera and food resources in South San Francisco Bay, California, USA. *Marine Ecology Progress Series*, 297: 131-145.

- LIPP, J.S.; MORONO, Y.; INAGAKI, F. & HINRICHS, K.-U. 2008. Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature*, 54: 991-994.
- LOCHTE, K & TURLEY C.M. 1988. Bacteria and cyanobacteria associated with phytodetritus in the deep sea. *Nature*, 333: 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*, 68: 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*, 7: 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*, 76: 257-262.
- MANINI, E.; LUNA, G.M. & DANOVARO, R. 2004. Benthic bacterial response to variable estuarine water inputs. *FEMS Microbial Ecology*, 50: 185-194.
- MARANGER, R. & BIRD, D.F. 1996. High concentrations of viruses in the sediments of Lac Gilbert, Quebec. *Microbial Ecology*, 31: 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*, 63: 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*, 65: 45-52.
- MASCARELLI, A.L. 2009. Geomicrobiology: Low life. *Nature*, 459: 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*, 48: 161-171.
- MORONO, Y.; TERADA, T.; MASUI, N. & INAGAKI, F. 2009. Discriminative detection and enumeration of microbial life in marine subsurface sediments. *ISME Journal*, 3: 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*, 29: 233-249.
- NAGATA, T. 1986. Carbon and nitrogen content of natural planktonic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 52: 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*, 47: 5-9.
- NYBAKKEN, J. & BERTNESS, M.D. 2004. *Marine Biology: An Ecological Approach*. Sixth Edition. Pearson Education, Inc., San Francisco, CA. 579p.
- 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*, 371: 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*, 8: 11-28.
- PASCAL, P.-Y.; DUPUY, C.; MALLET, C.; RICHARD, P. & NIQUIL, N. 2008. Bacterivory by benthic organisms in sediment: Quantification using ^{15}N -enriched bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 355: 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*, 54: 1048-1059.
- 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*, 108: 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*, 59: 718-724.
- 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*, 57: 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*, 53: 1695-1717.
- RELEXANS, J.-C.; DEMING, J.; DINET, A.; GAILLARD, J.-F. & SIBUET, M. 1996. Sedimentary organic matter and micro-meiobenthos with relation to trophic conditions in the tropical northeast Atlantic. *Deep-Sea Research*, 43: 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*, 317: 1-8.
- RICHARDSON, M.D. & YOUNG, D.K. 1987. Abyssal benthos of the Venezuela Basin, Caribbean Sea: standing stock considerations. *Deep-Sea Research*, 34: 145-164.
- 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*, 320: 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*, 43: 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*, 79: 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*, 55: 2699-2711.
- SCHIERMEIER, Q. 2009. Experts draw up ocean-drilling wish list. *Nature*, 461: 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*, 433: 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*, 8: 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*, 43: 976-982.
- SCHWARZ, J. R. & COLWELL, R.R. 1975. Heterotrophic activity of deep-sea sediment bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 30: 639-649.
- 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*, 46: 543-556.
- SMITH, E.M. & DEL GIORGIO, P.A. 2003. Low fractions of active bacteria in natural aquatic communities? *Aquatic Microbial Ecology*, 31: 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*, 137: 1111-1123.
- 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*, 44: 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*, 49: 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*, 56: 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*, 55: 2199-2209.

THISTLE, D. 2003. The deep-sea floor: An overview. Pp. 5-38. In: P.A. Tyler (ed.). Ecosystems of the deep oceans. Elsevier, Amsterdam, SA. 582p.

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*, 49: 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*, 32: 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*, 3: 249-259.

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*, 33: 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*, 388: 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*, 42: 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*, 56: 1-12.

WILLIAMS, P.M. & CARLUCCI, A.F. 1976. Bacterial utilization of organic matter in the deep sea. *Nature*, 262: 810-811.

WIRSEN, C.O. & JANNASCH, H.W. 1975. Activity of marine psychrophilic bacteria at elevated hydrostatic pressures and low temperatures. *Marine Biology*, 31: 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*, 44: 1053-1068.

ZOBELL, C.E. & MORITA, R.Y. 1959. Deep-sea bacteria. *Galathea Report*, 1: 139-154.

Submetido em 15/12/2009

Aceito em 05/02/2010