

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

ALICE DE MOURA EMÍLIO

**CULTIVO E ESTUDO DE DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO
DE ARQUEIAS OXIDANTES DE AMÔNIA EM AMBIENTES
MARINHOS**

SÃO PAULO

2023

ALICE DE MOURA EMÍLIO

**Cultivo e estudo de diversidade e distribuição de arqueias
oxidantes de amônia em ambientes marinhos**

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

SÃO PAULO

2023

ALICE DE MOURA EMILIO

**Cultivo e estudo de diversidade e distribuição de arqueias
oxidantes de amônia em ambientes marinhos**

Versão Corrigida

(Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-graduação)

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

Área de concentração: Microbiologia do Programa de Pós-Graduação

Orientadora: Prof^ª. Dra. Vivian Helena Pellizari

SÃO PAULO

2023

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica

Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Emílio. Alice de Moura.

Cultivo e estudo de diversidade e distribuição de arqueias oxidantes de amônia em ambientes marinhos / Alice de Moura Emílio; Vivian Helena Pellizari. – São Paulo, 2023.

141 p.

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

1.Arqueia 2. Diversidade 3. Análise bioinformática 4. Cultivo. I. Pellizari, Vivian Helena. Cultivo e estudo de diversidade e distribuição de arqueias oxidantes de amônia em ambientes marinhos.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Alice de Moura Emílio

Título da Dissertação: Cultivo e estudo de diversidade e distribuição de arqueias oxidantes de amônia em ambientes marinhos.

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Vivian Helena Pellizari

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

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

Examinado(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinado(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinado(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....



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

CERTIFICADO DE ISENÇÃO **(995/2018 -ERRATA)**

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **995/2018** referente ao projeto intitulado: "**Cultivo e estudo da diversidade e distribuição de arqueias oxidantes de amônia em ambientes marinhos**", sob a responsabilidade do(a) aluno(a) "**Alice de Moura Emilio**", e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) "**Vivian Helena Pellizari**" do Departamento de "Microbiologia" foi analisado e aprovado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 16 de Novembro de 2022.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

Dedicatória

Dedico à minha família

AGRADECIMENTO

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família, principalmente meus pais, Vera e José, por proporcionarem a melhor criação e educação possível. E por acreditarem e confiarem em mim e me incentivarem à alcançar meus sonhos.

Meus sinceros agradecimentos a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Vivian Helena Pellizari por me aceitar em seu laboratório, por todas as oportunidades de aprendizado e crescimento profissional a mim oferecidas e por sua confiança depositada em mim para a realização dessa pesquisa.

À Dr^a. Fabiana Paula por me co-orientou nesse projeto com sua paciência ao ensinar os experimentos, análises e a ajuda na revisão do texto. E por ser uma excelente profissional e por todo conhecimento a mim passado.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana (LECOM) que me acolherem, por participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho seja pela ajuda na preparação de experimento, nas análises e pelos ensinamentos, sugestões e convivência durante todos esses anos. À Rosa Gamba por toda sua experiência profissional, pessoal e dedicação em transmitir sua sabedoria e alegria.

À Ana Carol, Diana e Juliana por me ajudarem nas dificuldades e me apoiarem com suas conversas, conselhos, amizade, risadas e por deixarem essa caminhada mais leve e divertida.

Agradeço ao Instituto de Ciência Biomédicas e ao Instituto Oceanográfico. Ao laboratório do Prof^o. Dr^o. Jose Gregório Cabrera Gomez por disponibilizarem reagentes necessários para a realização desse estudo, ao laboratório da Prof^a. Dr^a. Tsai Siu Mui e seu grupo por disponibilizar a cultura de *Nitrososphaera viennensis* e por auxiliar no experimento do cultivo.

Agradeço a meus amigos: Amanda, Ana Paula, Christiane, Júlio Cezar e Leiliane por uma década de amizade e por estarem presentes na minha vida nos bons e maus momentos, pelas longas conversas, apoio e boas risadas.

À minha família canina Preta (*in memoriam*), Sol e Zoe, e menção honrosa para Peixoto (ou Toquinho), por fazerem minha vida mais leve e caótica, com seus latidos, bagunças e carinho incondicional.

Agradeço pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de estudo à Fundação de apoio à Universidade de São Paulo (FUSP). Pela idealização e execução do projeto pela empresa de energia PETROBRAS responsável pelo Projeto Santos: caracterização ambiental da Bacia de Santos - código do projeto 3366. E pelo apoio da ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Brasil.

Por fim sou grata a todos que participaram e ajudaram na minha caminhada até chegar aqui e dedico esse trabalho a eles.

A ciência atua na fronteira entre o conhecimento e a ignorância sem medo de admitir que não sabemos. Não há nenhuma vergonha nisso. A única vergonha é fingir que temos todas as respostas.

Neil deGrasse Tyson, 2014.

RESUMO

EMÍLIO, A. M. **Cultivo e estudo de diversidade e distribuição de arqueias oxidantes de amônia em ambientes marinhos.** 2023. 132 p. Dissertação (Mestrado Departamento do Programa) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Os micro-organismos desempenham um papel central nos ciclos biogeoquímicos marinhos. A arqueias oxidante de amônia (classe Nitrososphaeria), um grupo quimiolitotrófico que compreende vários táxons da classe Nitrososphaeria, pode realizar a primeira etapa da nitrificação enquanto fixa carbono inorgânico, portanto, um grupo chave nos ciclos do nitrogênio e do carbono. A maioria das espécies de Nitrososphaeria não são cultivadas e apenas algumas são isoladas. Estudos recentes indicam a importância desses organismos para o ambiente marinho, mas nosso conhecimento ainda é muito limitado e há escassez de informações disponíveis sobre a diversidade e ecologia desses micro-organismos para o Oceano Atlântico Sul. Este trabalho estudou as arqueias oxidantes de amônia na Baía de Santos (Atlântico Sudoeste). Para avaliar a diversidade e distribuição deste grupo foi utilizado um conjunto de dados composicionais da região V4 do gene 16S rRNA de 94 amostras de sedimentos e 175 de água das zonas neríticas e oceânicas da baía. No sequenciamento do gene 16S rRNA, a classe Nitrososphaeria representou até 50% e 20% das comunidades microbianas em amostras de água e sedimento, respectivamente. No sistema bentônico, a ordem Nitrosopumilales apresentou os maiores índices de riqueza, diversidade e abundância na região do talude. No sistema pelágico, a ordem Nitrosopumilales apresentou os maiores índices de riqueza, diversidade e abundância na zona mesopelágica. Com intuito de obter cultura de arqueias oxidantes de amônia, foram realizadas culturas de enriquecimento. Após sucessivos repiques e otimização das condições, foram obtidas culturas com 63% de grupos da família Nitrosopumilaceae, além de presença de bactérias da família Nitrosomonadaceae (4%). Bactérias oxidantes de nitrito da família Nitrospiraceae também estavam presentes na cultura, representando 2% da comunidade. Empregando a análise de PCR quantitativo, os tratamentos com a adição de antibiótico e a incubação à 20°C favoreceram o enriquecimento. Na curva de crescimento foi observado o consumo de amônio concomitantemente ao aumento da concentração de nitrato. Com análise do metagenoma foi recuperado um genoma de arqueia, classificado no gênero *Nitrosarchaeum*, família Nitrosopumilaceae. Esse genoma apresentou genes relacionados a oxidação de amônia, a fixação de carbono, ao metabolismo do carbono e biossíntese de cofatores e vitaminas. Por meio da genômica comparativa, a pesquisa apresentou características que diferem a arqueia cultivada dos genomas usados como referência. Os resultados obtidos neste trabalho indicam resultados promissores para o primeiro cultivo de arqueia oxidante de amônia do Atlântico Sudoeste e o primeiro passo para a caracterização desse grupo-chave na Baía de Santos.

Palavras-chave: Arqueias; oxidação de amônia; nitrogênio; carbono; ciclos biogeoquímicos; diversidade; parâmetros ambientais; análise molecular; cultivo.

ABSTRACT

EMÍLIO, A. M. **Cultivation and study of the diversity and distribution of ammonia-oxidizing archaea in marine environments.** 2023. 132 p. Dissertação (Mestrado Departamento do Programa) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Microorganisms play a central role in the marine biogeochemical cycles. The ammonia-oxidizing archaea, a chemolithoautotrophic group comprising several taxa from the class Nitrososphaeria, can carry out the first step of nitrification while fixing inorganic carbon, thus a key player in the nitrogen and carbon cycles. Most Nitrososphaeria species are uncultivated, and only few have been isolated. Recent studies have indicated the importance of these organisms to the marine environment, but our knowledge is still very limited and scarce information is available about of these microorganisms diversity and ecology in the Southwest Atlantic Ocean. This research studied the ammonia-oxidizing archaea in the Santos Basin (South West Atlantic). A compositional dataset of the V4 region of the 16S rRNA enabled to evaluate the diversity and distribution of the ammonia-oxidizing archaea from 94 sediment and 175 water samples from neritic and oceanic zones of the basin. In the 16S rRNA gene sequencing, the class Nitrososphaeria accounted for up to 50% and 20% of the communities in sediment and water samples, respectively. In the marine sediment, the Nitrosopumilales order presented the highest richness, diversity and abundance indices of in the slope region. In water samples, the Nitrosopumilales order presented the highest richness, diversity and abundance indices in the mesopelagic zone. Applying culture methods enabled to obtain a culture highly enriched with ammonia oxidizing archaea from the family Nitrosopumilaceae (63%), in addition to ammonia oxidizing bacteria from the family Nitrosomonadaceae (4%). Nitrite-oxidizing bacteria of the genus *Nitrospira* was also present in the culture and represented 2% of the community. Treatments with the addition of antibiotics and incubation at 20°C tended to favour AOA enrichment. Along with the growth curve, the consumption of ammonium happened concomitantly with the increase in the concentration of nitrate. The analysis on metagenome recovered an archaeal genome, classified under Nitrosarchaeum genus, Family Nitrspumilaceae. This genome showed genes related to nitrogen and carbon metabolism and biosynthesis of cofactors and vitamins. This study provides a successful enrichment Nitrosopumilaceae family to be first ammonia-oxidizing archaea cultivated from the South West Atlantic. This result is the first step on the characterization of this key group in the Santos Basin.

Keywords: Archaea; ammonia oxidation; nitrogen; carbon; biogeochemical cycles; diversity; environmental parameters; molecular analysis; cultivation;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo do nitrogênio no oceano, mostrando as reações de transformação dos compostos nitrogenados na coluna de água, nas regiões de superfície, subsuperfície e oceano profundo, e no sedimento marinho. Setas em vermelho demonstram as trocas de nutrientes entre as regiões e setas em azul as reações executadas por micro-organismos.

Figura 2 – Atuação das arqueias, representadas por filos, nas principais reações dos ciclos do carbono, enxofre e nitrogênio em ambientes óxicos e anóxicos.

Quadro 1 – Classificação taxonômica das arqueias oxidantes de amônia em seis níveis taxonômico, baseado no banco de dados Silva 138.

Figura 3 – a: Representação esquemática de larga escala de giros e correntes do Oceano Atlântico Sul; b: Esquema de circulação e massas da água do Oceano na área do Atlântico Sudoeste.

Figura 4 – Estratificação do ecossistema marinho: (a) zonação do sistema pelágico e bentônico; (b) zonação da luminosidade no ecossistema pelágico.

Figura 5 – Distribuição geográfica da malha amostral do sedimento por transecto do Projeto Santos.

Figura 6 – Distribuição geográfica da malha amostral da água por transecto do Projeto Santos.

Figura 7 – Abundância relativa das Classes dominantes (>1%) da comunidade microbiana em relação à batimetria do sistema bentônico da Bacia de Santos.

Figura 8 - Distribuição geográfica da abundância relativa da classe Nitrososphaeria do sistema bentônico da Bacia de Santos.

Figura 9 - Distribuição geográfica dos gêneros de arqueias oxidantes de amônia no sistema bentônico da Bacia de Santos.

Figura 10 – Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) das comunidades de Nitrosopumilales por profundidade na Bacia de Santos. Linhas horizontais mostram as diferenças significativas com o método de ajuste *Bonferroni*. Os círculos coloridos correspondem às estações coletadas em cada batimetria.

Figura 11 – Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) das comunidades de Nitrosopumilales no sedimento em contato com a massa de água na Bacia de Santos. Linhas horizontais mostram as diferenças significativas com o método de ajuste *Bonferroni*. Os círculos coloridos correspondem às estações coletadas em cada massa de água.

Figura 12 – Índices alfa de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) das comunidades de Nitrosopumilales do sedimento nas regiões oceânicas na Bacia de Santos. Linhas horizontais mostram as diferenças significativas com o método de ajuste *Bonferroni*. Os círculos coloridos correspondem às estações coletadas em cada região oceânica.

Figura 13 – Análise canônica de coordenadas principais (CAP) das comunidades de Nitrosopumilales com parâmetros ambientais do sistema bentônico. A ordenação foi construída com a distância Unifrac não ponderado. A coloração foi definida pelas profundidades e as formas geométricas pelas massas de água.

Figura 14 – Correlação de Spearman entre os gêneros de AOA, bactérias nitrificantes e fatores ambientais para a região da Plataforma Continental. Correlações positivas estão marcadas em azul e negativas em vermelho. O tamanho do círculo é proporcional ao valor do coeficiente r . O eixo vertical representa a variação dos valores do coeficiente r .

Figura 15 – Correlação de Spearman entre os gêneros de AOA, bactérias nitrificantes e fatores ambientais para a região do Talude. Correlações positivas estão marcadas em azul e negativas em vermelho. O tamanho do círculo é proporcional ao valor de coeficiente r . O eixo vertical representa a variação dos valores do coeficiente r .

Figura 16 – Correlação de Spearman entre os gêneros de AOA, bactérias nitrificantes e fatores ambientais para a região do Platô de São Paulo. Correlações positivas estão marcadas em azul e negativas em vermelho. O tamanho do círculo é proporcional ao valor do coeficiente r . O eixo vertical representa a variação dos valores do coeficiente r .

Figura 17 – Abundância relativa das classes dominantes (>1%) da comunidade procariótica em relação aos estratos do sistema pelágico da Bacia de Santos.

Figura 18 - Distribuição geográfica dos gêneros de arqueias da classe Nitrososphaeria nos estratos de superfície (a) e pico máximo de clorofila (b) no sistema pelágico.

Figura 19 - Distribuição geográfica dos gêneros de arqueias da classe Nitrososphaeria nos estratos de 250 m (a) e 900 m (b) no sistema pelágico.

Figura 20 – Distribuição geográfica dos gêneros de arqueias da classe Nitrososphaeria nos estratos de 1200 m (a) e 2300 m (b) no sistema pelágico.

Figura 21 – Abundância relativa de gêneros de arqueias oxidantes de amônia por estrato da coluna d'água.

Figura 22 – Índices de riqueza (Chao1) e de diversidade (Shannon) das comunidades de Nitrosopumilales nos diferentes estratos do sistema pelágico. Linhas horizontais mostram as diferenças significativas com o método de ajuste *Bonferroni*. Os círculos coloridos correspondem às estações coletadas em cada estrato.

Figura 23 - Índices de riqueza (Chao1) e de diversidade (Shannon) das comunidades de Nitrosopumilales nas diferentes massas de água do sistema pelágico. Linhas horizontais mostram as diferenças significativas com o método de ajuste *Bonferroni*. Os círculos coloridos correspondem às estações coletadas em cada massa de água.

Figura 24 - Índices de riqueza (Chao1) e de diversidade (Shannon) das comunidades de Nitrosopumilales pelas zonas pelágicas do sistema pelágico. Linhas horizontais mostram as diferenças significativas com o método de ajuste *Bonferroni*. Os círculos coloridos correspondem às estações coletadas em cada zona pelágica.

Figura 25 – Análise canônica de coordenadas principais (CAP) das comunidades de Nitrosopumilales com parâmetros ambientais do sistema pelágico. A ordenação foi construída com a distância Unifrac não ponderado. A coloração foi definida pelas massas de água (*water_mass*) e as formas geométricas pelos estratos (*layer*).

Figura 26 – Correlação de Spearman entre gêneros de AOA, bactérias nitrificantes e fatores ambientais na zona epipelágica. Correlações positivas estão marcadas em azul e negativas em vermelho. O tamanho do círculo é proporcional ao valor do coeficiente r . O eixo vertical representa a variação dos valores do coeficiente r .

Figura 27 – Correlação de Spearman entre gêneros de AOA, bactérias nitrificantes e fatores ambientais na zona mesopelágica. Correlações positivas estão marcadas em azul e negativas em vermelho. O tamanho do círculo é proporcional ao valor do coeficiente r . O eixo vertical representa a variação dos valores do coeficiente r .

Figura 28 – Correlação de Spearman entre gêneros de AOA, bactérias nitrificantes e fatores ambientais na zona batipelágica. Correlações positivas estão marcadas em azul e negativas em vermelho. O tamanho do círculo é proporcional ao valor do coeficiente r . O eixo vertical representa a variação dos valores do coeficiente r .

Figura 29 – Perfil dos parâmetros físico-químicos nos estrato da coluna de água da Bacia de Santos: temperatura (a), salinidade (b), oxigênio dissolvido (c), amônia (d), nitrito (e), nitrato (f), fosfato (g), silicato (h) e clorofila-a (i).

Figura 30 - Fluxograma da metodologia empregada no estudo. Os quadrados azuis são referentes a experimentos e técnicas e os quadrados laranjas são referentes a amostras.

Figura 31 – Imagem de satélite da cidade de Cananéia. a – Mapa da região da cidade de Cananéia, ícone amarelo (X) indica Mar Pequeno, local da coleta de água no estuário, o ícone vermelho (Y) indica o local da coleta de água do mangue; b – Vista do ponto de coleta da água da região estuarina; c – Vista do ponto de coleta da água da região do mangue.

Quadro 2 – Descrição das amostras coletadas na área do Estuário de Cananéia.

Figura 32 – Fluxograma das amostras coletadas no Estuário de Cananéia, quadro verde foram as amostras que tiveram crescimento confirmado e quadro vermelho as amostras que não cresceram.

Figura 33 – Gráfico da transformação do nitrogênio pela determinação de amônio, nitrato e nitrito pelo tempo em dias, dos cultivos do ponto 6-fundo e mangue com solução de vitamina e sem solução vitamina, além do controle positivo (*Nitrososphaera viennensis*).

Figura 34 – Gráfico de abundância relativa em nível taxonômico de classe dos cultivos ponto 6-fundo (estuário, Num6) e mangue com e sem vitamina (mangue, MCV e MSV), respectivamente.

Figura 35 – Gráfico de abundância relativa dos cultivos do ponto 6-fundo (estuário), mangue com e sem vitamina (mangue), no nível taxonômico de família.

Figura 36 – Curva de dissociação do PCR quantitativo das culturas do ponto 6-fundo com tratamento e curva padrão (espécies *N. viennensis*) dos genes *amoA* (a) e gene 16S rRNA (b).

Figura 37 – Média do número de cópias ng de DNA pelo método de qPCR dos genes *amoA* (a) para arqueias, 16S rRNA (b) e média da razão entre os resultados dos genes *amoA* e 16S rRNA (c) das diferentes formas de enriquecimento.

Figura 38 – Gráfico de concentração em μM de amônio, nitrito e nitrato pelo tempo em dias, das amostras de controle negativo (a), controle positivo (*Nitrososphaera viennensis*) (b) e cultura do ponto 6F incubado à 20°C (c).

Figura 39 – Gráfico de concentração em μM de amônio, nitrito e nitrato pelo tempo em dias, das amostras de controle negativo (a), controle positivo (*Nitrososphaera viennensis*) (b) e cultura do ponto 6F incubado à 26°C (c) e ponto 6F com adição de antibiótico (d).

Figura 40 – Gráficos de determinação colorimétrica de amônio, nitrito e nitrato do cultivo ponto 6-fundo sob o tratamento com adição de antibiótico nos períodos de: a – um mês de incubação, b – um mês e meio de incubação.

Figura 41 - Predição taxonômica por meio das sequências do programa Kaiju, nos níveis taxonômicos de Filo (a) e Ordem (b).

Quadro 3 – Classificação taxonômica dos *bins* pelo programa GTDB-Tk.

Figura 42 - Árvore filogenômica dos genomas do domínio Archaea.

Quadro 4 – Descrição dos genes e enzimas dos metabolismos do nitrogênio, carbono e da via de fosforilação oxidativa encontrados no *bin 027*.

Quadro 5 – Características gerais para a comparação genômica entre a *bin 027* e os genomas de referência do banco de dados GenBank.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estados de oxidação do nitrogênio.

Tabela 2.1 – Concentrações do meio de cultura *Fresh Water* e suplemento.

Tabela 2.2 – Concentrações dos componentes do meio basal *Fresh Water* (concentração final 10x).

Tabela 2.3 – Concentrações dos componentes da solução vitamina.

Tabela 2.4 – Concentrações dos componentes da solução de elementos traços.

Tabela 2.5 – Curva de calibração para determinação da concentração de nitrito nas culturas por enriquecimento de arqueias oxidadoras de amônia.

Tabela 2.6 – Curva de calibração para determinação da concentração de amônio nas culturas por enriquecimento de arqueias oxidadoras de amônia.

Tabela 2.7 – Curva de calibração para determinação da concentração de nitrato nas culturas por enriquecimento de arqueias oxidadoras de amônia.

Tabela 2.8 – Comparação dos resultados dos montadores de *contigs* MetaSPAdes, HybridSPAdes, IDBA e Megahit.

Tabela 2.9 – Resultados dos montadores de *bins* *MaxBin*, *CONCOCT*, *MetaBat2* e *DasTool*, com as principais características para comparação.

Tabela 2.10 – Qualidades dos *bins* pelo montador *Dastool* (parâmetro *blast*), com índice de completude e contaminação.

Tabela 2.11 – Descrição dos dados estatísticos de comparação genômica pelos métodos de ANI, AAI e DDH, dos genomas de referência dos gêneros *Nitrosarchaeum* e *Nitrosopumilus* com *bin* 027.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAI	<i>amino-acid identity</i>
AC	água costeira
ACAS	água central do Atlântico Sul
ACS	água circumpolar superior
AIA	água intermediária Antártica
AMO	<i>ammonia monooxygenase</i>
ANI	<i>average nucleotide identity</i>
AOA	arqueias oxidantes de amônia
APAN	água profunda do Atlântico Norte
ASV	variantes de sequências de amplicon
AT	água tropical
ATP	ATP adenosina trifosfato
<i>Ca.</i>	<i>Candidatus</i>
CHO	carboidrato total
DCM	<i>deep chlorophyll maximum</i>
DDH	<i>DNA-DNA hybridization</i>
GDGT	<i>glycerol dialkyl glycerol tetraethers</i>
HAO	hidroxilamina oxidorreductase/desidrogenase
HDH	hidrazina desidrogenase
HZS	hidrazina sintase
MW	água de mistura
N ₂	gás nitrogênio ou dinitrogênio
N ₂ H ₄	hidrazina
N ₂ O	óxido nitroso
NarG	nitrato redutase
NH ₂ OH	NH ₂ OH hidroxilamina
NH ₃	gás amônia
NH ₄ ⁺	íons amônio
NirK e NirS	nitrito redutase
NO	óxido nítrico
NO ₂ ⁻	nitrito
NO ₃ ⁻	nitrato
NosZ	óxido nítrico redutase
NosZ	óxido nitroso redutase
NXR	nitrito oxidorreductase
O ₃	ozônio
qPCR	PCR em tempo real
RDNA	redução dissimilatória de nitrato para amônio
SACW	água central do Atlântico Sul
SRF	<i>surface</i>
TOC	carbono orgânico total
TW	água tropical
UCDW	água circumpolar superior
WCA	<i>Water column A</i>

WCB
HAC
LAC

Water column B
High ammonia concentration
Low ammonia concentration

LISTA DE SÍMBOLOS

μM

micromolar

R^2

regressão logarítmica

mM

milimolar

v/v

volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 O nitrogênio no Ambiente marinho.....	25
2.2 Ciclo do nitrogênio	27
2.2.1 Fixação do nitrogênio.....	28
2.2.2 Nitrificação.....	28
2.2.3 Desnitrificação, <i>anammox</i> e redução dissimulatória de nitrato para amônio.....	30
2.3 Arqueias oxidantes de amônia.....	33
CAPÍTULO 1 - Análise molecular da comunidade de arqueias oxidantes de amônia na Bacia de Santos	37
3 OBJETIVO	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Área de estudo.....	39
4.2 Amostragem	42
4.3 Determinação de parâmetros físico-químicos.....	44
4.4 Extração de DNA, sequenciamento do gene 16S rRNA	44
4.5 Análise bioinformática e estatística	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Sistema Bentônico.....	47
5.1.1 Composição taxonômica da comunidade microbiana.....	47
5.1.2 Alfa e Beta Diversidade da ordem Nitrosopumilales.....	49

5.1.3 Correlação de Spearman de micro-organismos nitrificantes e parâmetros ambientais do sedimento	54
5.2 Sistema Pelágico.....	56
5.2.1 Composição Taxonômica da comunidade microbiana.....	56
5.2.2 Alfa e Beta diversidade da ordem Nitrosopumilales no sistema pelágico	62
5.2.3 Correlação de Spearman de micro-organismos nitrificantes e parâmetros ambientais da coluna de água	67
6 CONCLUSÃO.....	72
CAPÍTULO 2 - Cultivo de arqueias oxidantes de amônia nas amostras de água do Estuário de Cananéia	73
7 OBJETIVO	74
7.1 Objetivo geral.....	74
7.2 Objetivo específico.....	74
8 MATERIAIS E MÉTODOS	75
8.1 Área de coleta.....	75
8.2 Desenho experimental	75
8.3 Amostras.....	75
8.4 Meio de cultura, condições de cultivo e acompanhamento de crescimento por quantificação de parâmetros químicos.....	76
8.5 Tratamentos e curva de crescimento	77
8.6 Extração de DNA	78
8.7 Sequenciamento do gene 16S rRNA e análise bioinformática.....	78
8.8 PCR quantitativo	79
8.9 Metagenoma	80
9 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
9.1 Cultivo por enriquecimento do Estuário de Cananéia.....	82

9.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA	83
9.3 Abundância dos genes 16S rRNA e amoA dos cultivos em tratamento	85
9.4 Curva de crescimento da cultura estuarina	87
9.5.1 Perfil funcional do genoma da arqueia.....	95
9.5.2 Genômica comparativa.....	98
10 CONCLUSÃO.....	101
REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

O ambiente marinho ocupa mais de 70% da superfície do planeta oceanos, mares, regiões de maré, estuários e mares polares (BOLHUIS; CRETOIU, 2016). O oceano é dividido em sistema pelágico, que reserva 97% da água do mundo e sistema bentônico ou sedimento marinho, responsável por cobrir dois terços da superfície terrestre (CHARETTE; SMITH, 2010; HESSE; SCHACHT, 2011). Mais de dois terços da biomassa oceânica é composta por micro-organismos como, bactérias, arqueias, vírus e protistas (BAR-ON; MILO, 2019; ABREU et al., 2022). O oceano possui papel chave para os ciclos biogeoquímicos, sobretudo do carbono, oxigênio, nitrogênio, enxofre e fósforo, e de grande importância para a regulação do clima em todo planeta (LOUCA; PARFREY; DOEBELI, 2016; HUTCHINS; FU, 2017).

O ciclo do nitrogênio é realizado por meio da ação de micro-organismos que atuam nas reações de oxido-redução dos compostos nitrogenados. Esse ciclo é composto pelas principais etapas: fixação, nitrificação e desnitrificação (STEIN; KLOTZ, 2016; PAJARES; RAMOS, 2019). Na fixação de N, realizada por bactérias e arqueias que utilizam o complexo enzimático nitrogenase, ocorre a redução de dinitrogênio (N_2) em amônia (NH_3) que é biologicamente disponível para demais grupo de macro e micro-organismos (ZEHR; KUDELA, 2011; STEIN; KLOTZ, 2016; PAJARES; RAMOS, 2019). Nitrificação possui duas etapas principais, a oxidação de amônia em nitrito, realizada por bactérias e arqueias, e a oxidação do nitrito em nitrato, por bactérias. (ZEHR; KUDELA, 2011; KUYPERS; MARCHANT; KARLTAL, 2018; PAJARES; RAMOS, 2019). Desnitrificação é a conversão de nitrato em N_2 , o qual pode retornar para atmosfera. Além disso, óxido nítrico e óxido nitroso podem ser formados nesse processo realizado por bactérias desnitrificantes (ZEHR; KUDELA, 2011; KUYPERS; MARCHANT; KARLTAL, 2018; PAJARES; RAMOS, 2019).

Os micro-organismos nitrificantes são essenciais para gerar a forma acessível de nitrogênio (SEMEDO et al., 2021). Dentre eles estão as arqueias oxidantes de amônia (AOA) que compõe a Classe Nitrososphaeria, do filo Crenarchaeota (RINKE et al., 2020). Nitrososphaeria é um dos grupos de arqueias mais abundante no ambiente marinho, abrangendo cerca de 30% da biomassa planctônica, e é importante para a produção primária no oceano profundo, possuindo papel de destaque nos ciclos do nitrogênio e do carbono (HERNDL et al., 2005; ORCUTT et al., 2011; MEADOR et al., 2020). São responsáveis pela oxidação da amônia em nitrito, e realizam a fixação de carbono inorgânico liberando carbono orgânico para o ambiente (SCHLEPER, 2010; WALKER et al., 2010).

Sua distribuição geográfica abrange toda a coluna da água oceânica, mas é encontrada em sua maioria na zona mesopelágica (SANTORO et al., 2017). Também são encontradas em sedimentos marinhos, (SANTORO et al., 2019), rios e lagos (LIU et al., 2015; LI et al., 2018a), áreas estuarinas (ZOU; LIU; LI, 2020), em interação simbiótica com esponjas marinhas (PRESTON et al., 1996) e em outros ambientes, aquáticos e terrestres, sendo caracterizada como um grupo cosmopolita (SWAN et al., 2014).

A distribuição das AOA observada por meio dos sequenciamentos de nova geração, análises do gene 16S rRNA ou abordagem genômica, em estudos realizados no ecossistema marinho global demonstraram a importância desses micro-organismos através da sua relevância ecológica, perante ao ambiente, à comunidade microbiana e aos ciclos biogeoquímicos (SUNAWAGA et al., 2015; OFFRE; SPANG; SCHLEPER, 2013; ACINAS et al., 2021).

Com o advento dos métodos independentes de cultivo foram descobertos novos micro-organismos em diversos ambientes e possibilitaram a descrição de novas espécies e metabolismos (NAYFACH, 2021), estima-se que cerca de 1% dos micro-organismos foram cultivados em laboratório (HOFER, 2018). Isso demonstra, uma demanda de pesquisas que abordem em conjunto a análise genômica e cultivo, possibilitando a produção de meio de cultura adequado que supra as necessidades metabólicas e que proporcione a caracterização fisiológica desses organismos. As arqueias oxidantes de amônia cultivadas foram a partir de métodos de enriquecimento, microcosmos e co-culturas, e há apenas quatro isolados descritos, sendo *Nitrosopumilus maritimus* o único organismo isolado do ambiente aquático, proveniente do aquário tropical de Seattle (KÖNNEKE et al., 2005), porém ainda há muito para ser conhecer da fisiologia das AOA, sendo necessário mais estudos abordando métodos dependentes de cultivo desses micro-organismos.

Trabalhos pretéritos realizados no oceano Atlântico Sul relataram a presença dessas arqueias (BERGO et al., 2022; FERREIRA et al., 2022; BENDIA et al., 2022). Entretanto na Bacia de Santos há escassez de trabalhos relacionados à descrição da distribuição da população de arqueia utilizando análise de genes marcadores e abordagem genômica, além de não haver relatos de estudos que abordem métodos dependentes de cultivo para a AOA. Dessa forma, o presente estudo buscou analisar a distribuição e diversidades da comunidade de arqueias oxidantes de amônia, por meio da utilização do sequenciamento do gene 16S rRNA de amostras obtidas do sistema bentônico e pelágico da Bacia de Santos. Além disso, utilizou-se técnicas de

enriquecimento associada a técnicas de biologia molecular para cultivar esses organismos, a partir de amostras de água do estuário de Cananéia, da Bacia de Santos.

Parte deste estudo foi realizado no âmbito do Projeto Santos – Caracterização Ambiental da Bacia de Santos, coordenado pela PETROBRAS/CENPES e em colaboração com Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP). O estudo faz parte do subprojeto 8 intitulado por: Abundância, distribuição e caracterização funcional da comunidade microbiana do sistema pelágico da Bacia de Santos, coordenado pela Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari. Foram também empregadas amostras do estuário de Cananéia, coletadas com apoio do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP) e a Base de Pesquisa “Dr. João de Paiva Carvalho”, situada na cidade de Cananéia.

Essa dissertação está organizada em introdução e revisão bibliográfica comum, e dividida em dois capítulos: capítulo 1 - Análise molecular da comunidade de arqueias oxidantes de amônia na Bacia de Santos, compreendendo os dados do Projeto Santos. E capítulo 2 - Cultivo de arqueias oxidantes de amônia nas amostras de água do estuário de Cananéia, compreendendo os dados do estuário de Cananéia. Ambos capítulos estão constituídos por: objetivo, metodologia, resultado, discussão e conclusão.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O nitrogênio no Ambiente marinho

O nitrogênio é o elemento químico essencial para a vida, sendo o quarto mais abundante na biomassa celular, necessário para a síntese de importantes biomoléculas orgânicas, como os ácidos nucleicos (DNA e RNA), adenosina trifosfato (ATP), aminoácidos e as proteínas (STEIN; KLOTZ, 2016). O dinitrogênio (N_2) é o gás mais abundante, compreendendo cerca de 78% da atmosfera terrestre, além de estar presente dissolvido em grande quantidade no oceano. Porém, essa forma não é acessível para a maioria dos organismos (GRUBER; GALLOWAY, 2008; VOSS et al., 2013; PAJARES; RAMOS, 2019).

O nitrogênio tem papel fundamental na manutenção biogeoquímica do ecossistema marinho, além de influenciar ciclos de outros elementos, como carbono, oxigênio e fósforo e na produtividade biológica (GRUBER, 2008; ZEHR; KUDELA, 2011; PAJARES; RAMOS, 2019). Está entre os elementos fundamentais para a continuidade da produtividade primária. Mesmo os compostos nitrogenados sendo abundantes no ecossistema marinho, é considerado nutriente limitante para essa produtividade (FALKOWSKI, 1997; GRUBER, 1997; VOSS et al., 2013). Essa limitação pode ocorrer por diversos fatores, um deles é a relação co-limitante

com outros nutrientes como, fósforo e ferro, interferindo na taxa de crescimento celular e na composição de comunidades microbianas, principalmente para fitoplânctons (ZEHR; KUDELA, 2011; MOORE et al., 2013; PAJARES; RAMOS, 2019).

No ambiente marinho, o nitrogênio pode ser encontrado nas formas dissolvida, particulada, orgânica, inorgânica, oxidada e reduzida. O nitrogênio orgânico dissolvido compreende aminoácidos livres ou combinados, ureia, DNA e creatina, enquanto o nitrogênio orgânico particulado é composto por detritos e matéria orgânica morta ou viva (SHARP, 1983; HOWARTH, 2022). As formas inorgânicas dissolvidas compreendem o N_2 , o gás amônia (NH_3) e os íons amônio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) e, quando esses íons estão aderidos a partícula, fazem parte do nitrogênio inorgânico particulado (SHARP, 1983; JOYE; ANDERSON, 2008; HOWARTH, 2022). É possível observar a presença dos compostos nitrogenados por toda a coluna de água e sedimento, formando um gradiente influenciado pelo aporte de matéria provenientes de rios e estuários, pelas ações antrópicas, pela microbiota presente, por fatores físicos como estratificação e temperatura, ou relacionado a circulação oceânica como vórtices, correntes e massa de água (SHARP, 1983; GRUBER, 2008; ZEHR; KUDELA, 2011; HUTCHINS; CAPONE, 2022).

No perfil global de disposição dos compostos nitrogenados na coluna de água, maiores concentrações do gás nitrogênio (N_2) estão presentes na região costeira, próxima ao litoral e na região oceânica, por todo gradiente vertical (SHARP, 1983). Foram observadas maiores concentração de amônio (NH_4^+) e nitrito (NO_2^-) na região superficial, possivelmente relacionado a degradação da matéria orgânica realizada por bactérias heterotróficas, e o decaimento da concentração nas profundidades abaixo de 100 m ocorre devido à rápida assimilação feita pelos organismos (GRUBER, 2008). O amônio é uma das formas mais biodisponíveis no ambiente marinho em relação a nitrogênio inorgânico dissolvido e é a forma assimilada e incorporada mais rapidamente pelo organismo (KLAWONN et al., 2019). O nitrito é um produto intermediário e instável, com isso não permanece muito tempo no ambiente, além de ser uma forma tóxica para muitos organismos (GRUBER, 2008; ZEHR; KUDELA, 2011; DAIMS; LÜCKER; WAGNER, 2016). Nitrato parece apresentar maior concentração nas regiões mais profundas (> 1000 m), sendo que um perfil similar já foi observado no Atlântico Sudoeste, influenciado pelo aporte das águas profundas, frias e ricas em nutrientes (BRAGA; NIENCHESKI, 2006; GRUBER, 2008). Nitrato é a forma mais estável e oxidada (Tabela 1), sendo o íon mais abundante encontrado no mar (GRUBER, 2008; ZEHR; KUDELA, 2011). Para o sedimento, a distribuição espacial é semelhante ao ambiente pelágico, tendo a presença

de amônia, de nitrito, de nitrato, de nitrogênio orgânico dissolvido e dos demais compostos (VOSS et al., 2013).

Tabela 1 – Estados de oxidação do nitrogênio.

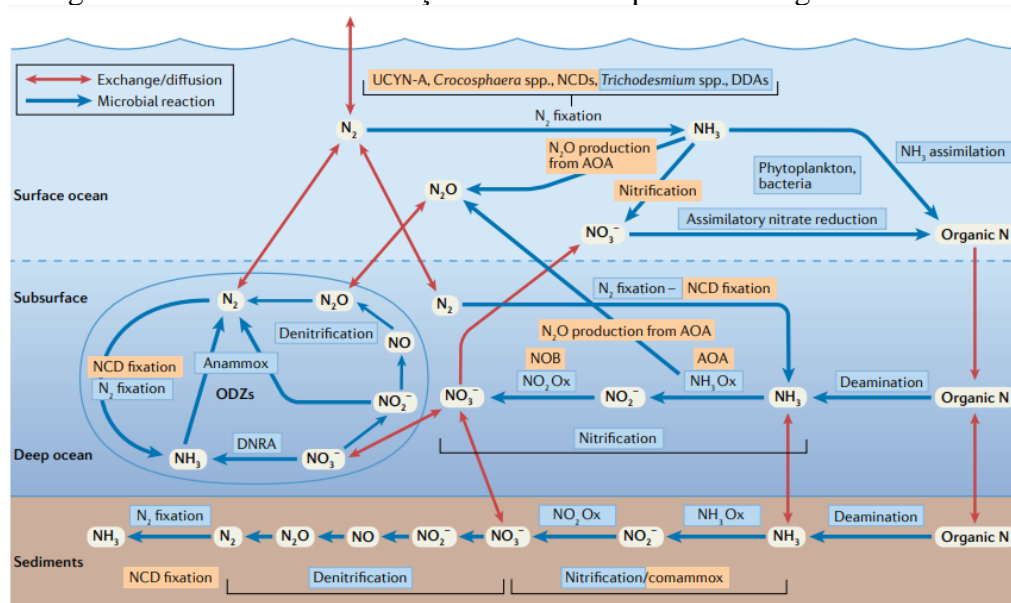
Nome	Fórmula	Número de oxidação
Ácido nítrico, íon nitrato	$\text{HNO}_3, \text{NO}_3^-$	+5
Dióxido nitrogênio	NO_2	+4
Ácido nitroso, íon nitrito	$\text{HNO}_2, \text{NO}_2^-$	+3
Óxido nítrico	NO	+2
Óxido nitroso	N_2O	+1
Gás nitrogênio	N_2	0
Hidroxilamina	NH_2OH	-1
Hidrazina	N_2H_4	-2
Amônia, íon amônio	$\text{NH}_3, \text{NH}_4^+$	-3

Fonte: STEIN; KLOTZ, 2016.

2.2 Ciclo do nitrogênio

O ciclo do nitrogênio marinho (Figura 1) acontece por meio das transformações que estabilizam e disponibilizam os compostos nitrogenados no ambiente, isso através das reações de oxidação e redução realizadas por micro-organismos (KUYPERS; MARCHANT; KARLTAL, 2018; HUTCHINS; CAPONE, 2022). As etapas mais estudadas do ciclo do nitrogênio são a fixação, nitrificação e desnitrificação. Entretanto, com advento de novas tecnologias moleculares e com descobrimento de novos grupos de micro-organismos foram descobertos processos adicionais: *comammox*, *anammox* e redução dissimilatória de nitrato para amônia (STEIN; KLOTZ, 2016; PAJARES; RAMOS, 2019).

Figura 1 – Ciclo do nitrogênio no oceano, mostrando as reações de transformação dos compostos nitrogenados na coluna de água, nas regiões de superfície, subsuperfície e oceano profundo, e no sedimento marinho. Setas em vermelho demonstram as trocas de nutrientes entre as regiões e setas em azul as reações executadas por micro-organismos.



Fonte: HUTCHINS; CAPONE, 2022.

2.2.1 Fixação do nitrogênio

Na fixação do nitrogênio ocorre a conversão de N_2 em NH_3 , o qual é biologicamente disponível para demais organismos, fornecendo a fonte de nitrogênio para a produção primária, além de gerar “novo” nitrogênio para o ambiente oceânico (OHLENDIECK et al., 2007; WU et al., 2018; TANG et al., 2019; HUTCHINS; CAPONE, 2022). Esse processo é realizado por bactérias e arqueias diazotróficas, através da reação de redução feita pelo complexo enzimático nitrogenase. O gene *nifH* (dinitrogenase redutase) é um biomarcador para detectar e analisar a diversidade de diazotróficos (EADY, 1996; ZEHR; MELLON; ZANI, 1998; KUYPERS; MARCHANT; KARLTAL, 2018; PAJARES; RAMOS, 2019).

Um dos micro-organismos marinhos fixadores de nitrogênio mais estudados é o *Trichodesmium*, uma cianobactéria filamentosa de vida livre, encontrada na superfície de águas tropicais, subtropicais e oligotróficas, e capaz de fixar carbono além do nitrogênio (CAPONE, 1997; ZEHR, 2011; BERGMAN et al., 2013). Dependendo das condições ambientais ocorre a floração desses organismos, chamada também de maré vermelha, de larga extensão sob a superfície oceânica, podendo ser observada por satélites (CAPONE, 1997; SUBRAMANIAM et al., 2001). Outro gênero é a *Crocospaera*, cianobactéria unicelular de vida livre, que fixa nitrogênio durante a noite, possui pigmentos fotossintetizantes e consome o nitrogênio fixado e amônio (ZEHR, 2011; MASUDA et al., 2013; INOMURA; MASUDA; GAUGLITZ, 2019). Arqueias filo Euryarchaeota, do grupo de metanogênicas e metanotróficas anaeróbica (ANME) que foram descritas em no oceano profundo, sedimento e em fontes hidrotermais, são também capazes de fixar nitrogênio (MEHTA; BUTTERFIELD; BAROSS, 2003; MEHTA; BAROSS, 2006; DEKAS; PORETSKY; ORPHAN, 2009).

2.2.2 Nitrificação

O amônio proveniente da fixação do nitrogênio e da decomposição e remineralização de matéria orgânica entra na etapa da nitrificação onde é convertido em nitrito e nitrato através das reações de oxidação. Esse processo é dividido em duas partes: a oxidação de amônia em nitrito, realizada por bactérias e arqueias, e a oxidação do nitrito em nitrato, feita por bactérias, além de haver a oxidação direta de amônia em nitrato, conhecida por *comammox* (PAJARES; RAMOS, 2019).

Na primeira parte ocorre a transformação NH_3 em hidroxilamina (NH_2OH) pela enzima *ammonia monooxygenase* (AMO) codificada pelo gene *amoABC*, biomarcador utilizado para verificar a presença de micro-organismos oxidadores de amônia no ambiente (KUYPERS;

MARCHANT; KARLTAL, 2018; PAJARES; RAMOS, 2019). Em seguida ocorre a conversão de hidroxilamina em NO_2^- através da enzima hidroxilamina oxidorreductase/desidrogenase (HAO), codificada pelo gene *hao* (KOZLOWSKI et al., 2016; CARANTO; LANCASTER, 2017; KUYPERS; MARCHANT; KARLTAL, 2018). Podem ser gerados os produtos intermediários durante a oxidação da hidroxilamina, esses produtos seriam óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O) (MARTENS-HABBENA et al., 2015; CARANTO; LANCASTER, 2017). Na segunda parte acontece a oxidação de nitrito a nitrato pela enzima nitrito oxidorreductase (NXR), codificada pelos genes *nxrABC*, que são biomarcadores de bactérias oxidantes de nitrito (PESTER et al., 2013; KUYPERS; MARCHANT; KARLTAL, 2018; PAJARES; RAMOS, 2019). Na oxidação do amônio em nitrito realizado pelas arqueias há modificação relacionada a hidroxilamina, não há indícios da presença do gene *hao*, mas o estudo de Vajrala e colaboradores (2012) relataram, provavelmente, a presença de uma enzima desconhecida para a conversão de hidroxilamina em nitrito.

Os primeiros micro-organismos nitrificantes foram cultivados por Frankland e Frankland em 1890 e isolado em 1891 por Sergei Winogradsky (KOCH; VAN KESSEL; LÜCKER, 2018; LEHTOVIRTA-MORLEY, 2018). Os procariotos oxidadores de amônia são aeróbios, quimiolitotróficos e assimilam carbono inorgânico por vias metabólicas diferentes: ciclo de Calvin nas bactérias e ciclo hidroxipropionato/hidroxibutirato nas arqueias (LEHTOVIRTA-MORLEY, 2018). As bactérias pertencem aos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* e *Nitrospira* (PURKHOLD et al., 2000), e as arqueias pertencem a classe Nitrososphaeria e são representadas pelos gêneros *Nitrosopumilus*, *Nitrososphaera*, *Nitrosarchaeum*, *Nitrosocaldus*, *Nitrosotalea*, *Nitrosopelagicus* e *Cenarchaeum* (LEHTOVIRTA-MORLEY, 2018). Os oxidantes de amônia são descritos em diversos ambientes, incluindo solos (SHEN et al., 2012; PAJARES; BOHANNAN, 2016; ALVES et al., 2018), estuários (MOSIER; FRANCIS, 2008; SANTORO et al., 2008), água doce (LU et al., 2018), coluna de água (NUNOURA et al., 2015; WU et al., 2022), oceano profundo (ACINAS et al., 2021) e sedimento marinho (WANG et al., 2017; PEOPLES et al., 2019).

As bactérias oxidantes de nitrito são representadas pelos gêneros *Nitrospina*, *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrotoga*, *Nitrococcus* e *Nitrolancea* (FENG et al., 2016; PACHIADAKI et al., 2017; SPIECK et al., 2020). São distribuídas em solo (HAN et al., 2018; FREITAG et al., 2005), estuário (SUN et al., 2022), rio (CÉBRON; GARNIER, 2005), sedimento (ALTMANN et al., 2003), fontes termais (LEBEDEVA et al., 2010) e ambiente marinho, sendo que neste último há a predominância de *Nitrospina* e *Nitrospira*, presentes nas zonas de mínimo de oxigênio e

em regiões profundas (FÜSSEL et al., 2011; NUNOURA et al., 2015; PACHIADAKI et al., 2017). São adaptadas a concentrações mínimas de nitrito (KOCH et al., 2015; NOWKA; DAIMS; SPIECK, 2015) e os representantes marinhos podem conter as enzimas urease e cianato hidratase/liase, responsáveis pela conversão de ureia e cianato em amônia (KOCH et al., 2015; PACHIADAKI et al., 2017).

Os micro-organismos nitrificantes apresentam uma interação de mutualismo, pois os oxidantes de amônia fornecem substrato (NO_2^-) para as oxidantes de nitrito, que, por sua vez ao consumir esse nutriente retira do ambiente um elemento tóxico e inibitório para oxidadoras de amônia (STEIN; ARP, 1998; LEHTOVIRTA-MORLEY et al., 2013; STEMPFHUBER et al., 2016). Por apresentarem uma diversidade de metabolismos, os procariotos nitrificantes se adaptam em uma variedade de ambientes.

As bactérias que participam da reação de *comammox* são membros do gênero *Nitrospira* e foram identificadas em ambientes de solo, água doce, lodo, sistema de tratamento de água, região costeira, estuário e sedimento, mas em dados de água e sedimento do oceano aberto são praticamente não detectadas (XIA et al., 2018; AL-AJEEL et al., 2022). Esse gênero possui três espécies, a *N. inopinata*, a primeira bactéria *comammox* descrita e apresenta alta afinidade com o amônio por se adaptar em ambiente oligotróficos (DAIMS et al., 2015; KITS et al., 2017; YANG et al., 2022). E as demais espécies são *Ca. Nitrospira nitrosa* e *Ca. Nitrospira nitrificans*, obtidas de amostras de biofiltro de aquicultura (VAN KESSEL et al., 2015).

2.2.3 Desnitrificação, *anammox* e redução dissimulatória de nitrato para amônio

Desnitrificação é um processo respiratório anaeróbico, realizado a partir da conversão de nitrato em N_2 , etapa que ocorre em uma concentração reduzida de O_2 , em regiões subóxicas ou anóxicas do sedimento ou na coluna de água (WARD et al., 2009; ZEHR; KUDELA, 2011). A redução de NO_3^- produz o NO_2^- , que por sua vez é reduzido nos gases óxido nítrico e óxido nitroso até formar o N_2 (KUYPERS; MARCHANT; KARLTAL, 2018; PAJARES; RAMOS, 2019) (Tabela 1). As enzimas que catalisam essa reação são a nitrato redutase (NarG), nitrito redutase (NirK e NirS), óxido nítrico redutase (NorB) e óxido nitroso redutase (NosZ), codificadas pelos genes *narG*, *nirK* e *nirS*, *norB* e *nosZ*, respectivamente. Entretanto, esses genes podem ser encontrados separadamente em outros micro-organismos que não realizam a desnitrificação (MOSIER; FRANCIS, 2010; KUYPERS; MARCHANT; KARLTAL, 2018; PAJARES; RAMOS, 2019). Para a identificação dos micro-organismos desnitrificantes é

utilizado um conjunto de genes marcadores, tais como *narG*, *nirK*, *nirS*, *norB* e *nosZ* (PAJARES; RAMOS, 2019; CHEN et al., 2020; MIRALLES-ROBLEDILLO et al., 2021).

A desnitrificação é realizada por uma diversidade de procariotos, tendo como maioria bactérias anaeróbicas autotróficas e heterotróficas, mas podem ocorrer também em bactérias quimiossintéticas e aeróbicas, bem como arqueias (SHAPLEIGH, 2013). Essa comunidade microbiana é encontrada no ecossistema aquático em estuários, sedimento marinho, fontes termais (ZENG; ALAIN; SHAO, 2021) e zonas de mínimo de oxigênio (MICHOTEY; MÉJEAN; BONIN, 2000; BRAKER et al., 2001; WARD et al., 2009; LEE; FRANCIS, 2016). Membros pertencentes ao filo Proteobacteria, dos gêneros de *Pseudomonas* (BONIN; GILEWICZ; BERTRAND, 1987), *Marinobacter* (CARREIRA et al., 2018), *Azospirillum* (ZIMMER; STEPHAN; BOTHE, 1984) e *Hyphomicrobium* (GAUTHIER et al., 1992; KLOOS et al., 1995). E bactérias das espécies *Hyphomicrobium denitrificans* (URAKAMI et al., 1995), *Shewanella denitrificans* (BRETTAR; CHRISTEN; HÖFLE, 2002) e a arqueia *Halobacterium denitrificans* (TOMLINSON; JAHNKE; HOCHSTEIN, 1986).

Anammox é a oxidação de NH_3 para formar N_2 . A reação acontece na ausência de O_2 e tem como produtos intermediários o NO e a hidrazina (N_2H_4), sendo que o nitrito é utilizado comoceptor final de elétrons (KARTAL; KELTJENS, 2016; CARANTO; LANCASTER, 2017; RIOS-DEL TORO; CERVANTES, 2019). As enzimas que catalisam essas reações são a hidrazina sintase (HZS), convertendo amônia a hidrazina, a qual por sua vez é oxidada pela hidrazina desidrogenase (HDH) gerando o N_2 (KUYPERS; MARCHANT; KARLTAL, 2018; RIOS-DEL TORO; CERVANTES, 2019). A hidroxilamina também pode ser formada nessa reação no lugar da hidrazina e utilizando a HAO para gerar N_2 (KUENEN, 2008).

A primeira bactéria *anammox* descrita pertence a ordem Planctomycetales, *Candidatus Brocadia anammoxidans* (STROUS et al., 1999; JETTEN et al., 2001). Posteriormente outros gêneros foram descobertos, *Scalindua* (SCHMID et al., 2003), *Kuenenia* (STROUS et al., 2006), *Anammoxoglobus* (KARTAL et al., 2007) e *Jettenia* (ALI et al., 2014), sendo encontradas em sistema de tratamento de água e em reatores (RIOS-DEL TORO; CERVANTES, 2019). O gênero *Scalindua* apresenta as espécies *Candidatus Scalindua sorokinii* e *S. rubra*, identificadas no ambiente marinho (KUYPERS et al., 2003; VAN DE VOSSENBERG et al., 2008; SPETH et al., 2017). As bactérias *anammox* pertencentes a Planctomycetes são quimiolitototróficas anaeróbicas e apresentam característica como célula dividida em três compartimentos separados por membranas, ausência de peptidoglicano na

parede celular e a duração da divisão celular da ordem de semanas (VAN NIFTRIK; JETTEN, 2012; RIOS-DEL TORO; CERVANTES, 2019).

A redução dissimilatória de nitrato para amônio (RDNA) é um processo anaeróbico dividido em duas partes, na primeira ocorre a redução de nitrato em nitrito, reação semelhante à denitrificação, com os genes *napA* e *narG*, e na segunda parte, a redução de nitrito em amônio, com a enzima nitrito redutase (NIR), codificando o gene *nrfA* (ZEHR; KUDELA, 2011; BU et al., 2017; VIEIRA, 2017; PAJARES; RAMOS, 2019). Essa redução compete com a denitrificação pelo nitrato e pode fornecer amônio para a nitrificação e *anammox* (LAM et al., 2009; PAJARES; RAMOS, 2019), além de conservar o nitrogênio na forma de amônio no ambiente, (YU et al., 2017; HOWARTH, 2022). A RDNA é descrita em ambientes anóxicos, seja na zona mínima de oxigênio na coluna de água ou no sedimento (LAM et al., 2009; PAJARES; RAMOS, 2019). A redução de nitrato realizada por RDNA mostrou ser dominante em comparação a denitrificação em regiões costeiras, principalmente no sedimento estuarino (GIBLIN et al., 2013; SONG et al., 2013; DENG et al. 2015).

Os micro-organismos conhecidos na realização dessa redução são bactérias heterotróficas, anaeróbicas obrigatórias e facultativas, alguns aeróbios, além de algumas espécies de quimiolitotróficas (TIEDJE, 1988; PAJARES; RAMOS, 2019). Essas bactérias são Proteobacteria, Firmicutes, Acidobacteria, Actinobacteria e Chloroflexi, e alguns gêneros como, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Desulfotobacterium*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Beggiatoa*, *Thermosulfurimonas* e *Dissulfuribacter* (TIEDJE, 1988; VAN DEN BERG et al., 2017; PAJARES; RAMOS, 2019; LI; JIANG; JI, 2022; WANG; LI, 2023). A RDNA foi descrita em diatomáceas que habitam o sedimento (KAMP et al., 2011) e o ambiente pelágico (KAMP et al., 2013).

Durante as reações de nitrificação, desnitrificação e *anammox*, são formados dois potentes gases do efeito estufa, o óxido nítrico (NO) e o óxido nitroso (N₂O), sendo que N₂O possui um potencial de aquecimento aproximadamente 300 vezes maior quando comparado à CO₂ (RAVISHANKARA; DANIEL; PORTMANN, 2009; SCHREIBER et al., 2009; CARANTO; LANCASTER, 2017). Ambos são gases produzidos biologicamente, mas também de forma antropogênica (indústria e agricultura), podendo influenciar na química atmosférica ao reagir com outros gases e afetar a camada de ozônio (O₃), além disso podem participar da produção de chuva ácida (STEIN; YUNG, 2003; MOROZ; KOHN, 2011; SCHREIBER et al., 2012).

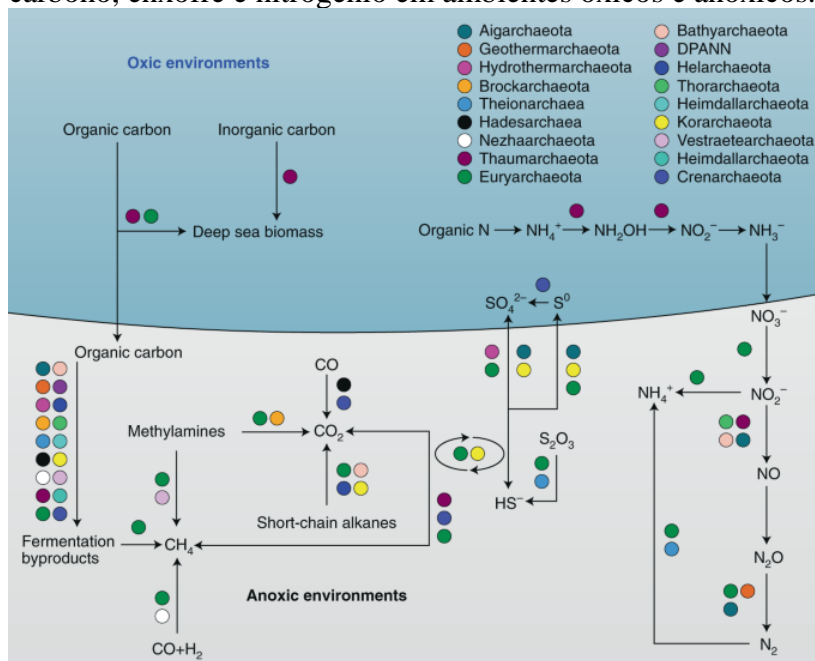
2.3 Arqueias oxidantes de amônia

A análise comparativa e filogenética utilizando os genes 16S e 18S rRNA realizada por Woese e Fox (1977) originou a divisão de três domínios: Eukarya, Eubacteria e Archaeobacteria, sendo os dois últimos denominados de Bacteria e Archaea, posteriormente. O domínio Archaea apresenta características mais semelhantes aos eucariontes do que as bactérias (WOESE; MAGRUM; FOX, 1978; BAKER et al., 2020).

Inicialmente o domínio Archaea era representado por micro-organismos extremófilos, habitando ambientes de condições extremas relacionadas a temperatura, salinidade, pH (acidez e alcalinidade), pressão osmótica e concentração de oxigênio (WOESE; MAGRUM; FOX, 1978; CARDOSO et al., 2003; MEDINA-CHÁVEZ; TRAVISANO, 2022). Entretanto, com os avanços nas pesquisas moleculares foram descobertas as arqueias mesofílicas (BROCHIER-ARMANET et al., 2008).

As arqueias tem um papel significativo nos ciclos biogeoquímicos (Figura 2), devido a produção e mineralização de matéria orgânica, sobretudo para os ciclos do carbono e nitrogênio. Elas atuam na produção de matéria orgânica através da fixação de carbono, executam reações exclusivas como metanogênese e oxidação anaeróbica de metano no ciclo do carbono e a redução de sulfato no ciclo do enxofre, e participam da nitrificação e desnitrificação no ciclo do nitrogênio, além de produzir importantes gases do efeito estufa como, metano e óxido nitroso (OFFRE; SPANG; SCHLEPER, 2013; BAKER et al., 2020).

Figura 2 – Atuação das arqueias, representadas por filós, nas principais reações dos ciclos do carbono, enxofre e nitrogênio em ambientes óxicos e anóxicos.



Fonte: BAKER et al., 2020.

O filo Thaumarchaeota, apontado na figura 2 atuando em reações no ciclo do nitrogênio e carbono, inclui arqueias quimiolitotróficas, mixotróficas e heterotróficas (PESTER; SCHLEPER; WAGNER, 2011; BERG et al., 2015; AYLWARD; SANTORO, 2020). Entretanto, a classificação taxonômica do domínio Archaea está em constante modificação. Com isso a nomenclatura de filo Thaumarchaeota não é mais usual, atualmente as arqueias oxidante de amônia pertencem ao filo Crenarchaeota, classe Nitrososphaeria, incluídas nas ordens Nitrosocadales, Nitrosopumilales, Nitrososphaerales e Nitrosotaleales (RINKE et al., 2020) (Quadro 1).

Quadro 1 – Classificação taxonômica das arqueias oxidantes de amônia em seis níveis taxonômico, baseado no banco de dados Silva 138.

Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
Archaea	Crenarchaeota	Nitrososphaeria	Nitrosocadales	Nitrosocadaceae	<i>Candidatus Nitrosocaldus</i>
			Nitrosopumilales	Nitrosopumilaceae	<i>Candidatus Nitrosopelagicus</i> <i>Candidatus Nitrosopumilus</i> <i>Candidatus Nitrosotenuis</i> <i>Cenarchaeum</i> <i>Nitrosarchaeum</i>
			Nitrososphaerales	Nitrososphaeraceae	<i>Candidatus Nitrocosmicus</i> <i>Candidatus Nitrososphaera</i>
			Nitrosotaleales	Nitrosotaleaceae	<i>Candidatus Nitrosotalea</i>

Fonte: QUAST et al., 2018.

Arqueias tem o metabolismo quimiolitotrófico e alguns grupos são considerados mixotrófico (WALKER et al., 2010). Com a oxidação da amônia, na primeira etapa de nitrificação, é gerada a energia utilizada para a fixação de carbono inorgânico, sendo um importante produtor primário, sobretudo no oceano profundo (WALKER et al., 2010; YAKIMOV et al., 2011), contribuindo significativamente para os ciclos de nitrogênio e carbono.

A conversão da amônia em nitrito executada pelas arqueias ocorre de forma semelhante ao descrito no item 2.2.2, exceto pela ausência da enzima homóloga à HAO, responsável pela oxidação da hidroxilamina em nitrito, tornando o funcionamento dessa reação pouco compreendida. Foram propostos modelos metabólicos que buscam solucionar esse problema, seja a partir da atuação do complexo de cobre ou da ação da enzima NirK (STEIN, 2019; SOLER-JOFRA; PÉREZ; VAN LOOSDRECHT, 2021), mas também há a indicação de uma enzima desconhecida para a conversão de hidroxilamina (VAJRALA et al., 2012). Durante essa

reação há a produção de NO e N₂O, gases promotores do efeito estufa, como produtos intermediários (SANTORO et al., 2011; LÖSCHER et al., 2012; KOBAYASHI et al., 2018).

As AOA utilizam o ciclo 3-hidroxiopropanato/4-hidroxiбутирато para a fixação de carbono inorgânico. Essa via é mais efetivamente energética para fixação de carbono em comparação com o ciclo de Calvin-Benson, encontrado na maioria da bactéria quimiolitotróficas, cianobactérias e outras arqueias. (KÖNNEKE et al., 2014; BARBOSA; GOMEZ; TORRES, 2018; LI et al., 2018b).

Outra característica ligada ao metabolismo de algumas espécies é a presença de mecanismos para utilização de ureia e cianato como fonte de energia, como pode ser inferido pela identificação dos genes *ureC* e *cynS*, responsáveis pela codificação das enzimas urease e cianase, respectivamente (TOURNA et al., 2011; PALATINSZKY et al., 2015; TOLAR, 2017; KITZINGER et al., 2018). Também foi descrito na literatura a capacidade de assimilar carbono, utilizando como fonte bicarbonato ou piruvato. (TOURNA et al., 2011; QIN et al., 2014; SAUDER et al., 2017).

Em sua membrana celular há presença do lipídio crenarchaeol, composto por *glycerol dialkyl glycerol tetraethers* (GDGT), apresentando uma conformação exclusiva das arqueias oxidantes de amônia (PESTER; SCHLEPER; WAGNER, 2011; DAMSTÉ et al., 2002). Crenarchaeol é utilizado como biomarcador de lipídeos de membrana para identificar a presença de arqueias nitrificantes em diversos ambientes (PEARSON et al., 2008; PITCHER; SCHOUTEN; DAMSTÉ, 2009; PITCHER et al., 2011; SOLLAI et al., 2019). Também é usado em estudos de paleotemperatura, para reconstrução de condições climáticas do passado, sobretudo relacionado a temperatura da superfície do oceano (SCHOUTEN et al., 2002; HURLEY et al., 2016).

As arqueias da classe Nitrososphaeria ocupam uma variedade de habitats, do ambiente aquático, sendo as arqueias mais abundantes nos oceanos, representando de 20 a 40% da comunidade planctônica marinha (HERNDL et al., 2005; MÜLLER et al., 2018), ou no ecossistema terrestre, correspondendo de 1 a 10% da comunidade procarionte (OCHSENREITER et al., 2003; KEMNITZ; KOLB; CONRAD, 2007). Sua distribuição geográfica abrange toda coluna da água (KARNER; DELONG; KARL, 2001; SANTORO et al., 2017; REJI et al., 2019a), além de estar presente no sedimento marinho (NUNOURA et al., 2018), em rios (PINTO et al., 2020), estuários (LIU et al., 2018a) e mangues (LI et al., 2019; ZHANG et al., 2020). Foi identificada no ecossistema polar (SIGNORI et al., 2014; LEARMAN et al., 2016), em fontes termais (BEAM et al., 2014, CHEN et al., 2016), deserto (HWANG et al., 2021), em regiões oligotróficas, seja lagos profundos (VISSERS et al., 2012;

CALLIERI et al., 2015) ou solo (JUNG et al., 2014), além de estarem entre os três grupos de arqueia mais abundantes em amostras de pockmark (GIOVANNELLI et al., 2016).

As principais espécies descritas no ecossistema aquático são: *Nitrosopumilus maritimus*, a primeira AOA isolada, proveniente de substrato rochoso do aquário tropical de Seattle (KÖNNEKE et al., 2005), *Cenarchaeum symbiosum* apresenta interação simbiótica com esponjas marinhas (gênero *Axinella*) e a primeira do filo Crenarchaeota a ter o genoma anotado (PRESTON et al., 1996; HALLAM et al., 2006), *Candidatus Nitrosoarchaeum limnia* (MOSIER et al., 2012) e *Candidatus Nitrosopelagicus brevis* (SANTORO et al., 2015) ambos cultivados por enriquecimento.

No ambiente terrestre apenas duas espécies foram isoladas: *Nitrososphaera viennensis*, primeira cultura isolado de solo, a partir de amostras do jardim de Viena (TOURNA et al., 2011) e *Nitrosoarchaeum koreensis*, isolada de solo agrícola (JUNG et al., 2018). As demais espécies terretres foram cultivadas por enriquecimento, incluindo *Candidatus Nitrososphaera evergladensis* a partir de solo agrícola (ZHALNINA et al., 2014), *Candidatus Nitrososphaera gargensis* de fontes termais, considerado termófilo moderado (SCHLEPER; NICOL, 2010; STAHL; de la TORRE, 2012). Os termofílicos extremos são representados por *Candidatus Nitrosocaldus cavascurensis* e *Ca. Nitrosocaldus yellowstonii*, (DE LA TORRE et al., 2008; ABBY et al., 2018) e *Candidatus Nitrosotalea devanaterre* descrita em solo ácido (LEHTOVIRTA-MORLEY et al., 2011).

**CAPÍTULO 1 - Análise molecular da comunidade de arqueias
oxidantes de amônia na Bacia de Santos**

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo analisar a distribuição e diversidade das arqueias oxidantes de amônia nos ecossistemas bentônico e pelágico localizados na Bacia de Santos;

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a taxonomia da comunidade microbiana e descrever a diversidade taxonômica das arqueias oxidantes de amônia nos ambientes do sedimento marinho e da coluna de água;
- Determinar os índices de diversidade, além de avaliar os parâmetros físico-químicos que influenciam a estruturação da comunidade das arqueias oxidantes de amônia;
- Investigar a correlação entre os fatores ambientais, a comunidade de microorganismos nitrificantes e as arqueias oxidantes de amônia;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

A Bacia de Santos é uma bacia sedimentar do oceano Atlântico Sudoeste, com uma área de aproximadamente 350.000 km². Está localizada na região Sudeste-Sul do Brasil, abrangendo a porção litorânea dos estados do Rio de Janeiro à Santa Catarina, fica entre as Bacia de Campos e de Pelotas, delimitada ao norte pelo Alto de Cabo Frio e ao sul pelo Alto de Florianópolis (MOHRIAK, 2003; JECK, 2006; MOREIRA, 2007, CLEMENTE, 2013; VIANA, 2018).

A Bacia de Santos possui relevância econômica para o país por ser a segunda maior produtora de hidrocarbonetos, ficando atrás da Bacia de Campos, e a primeira em produção de gás natural. Essa produção é realizada em diversos campos exploratório que compõe o polígono do Pré-Sal (AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL - ANP, 2017).

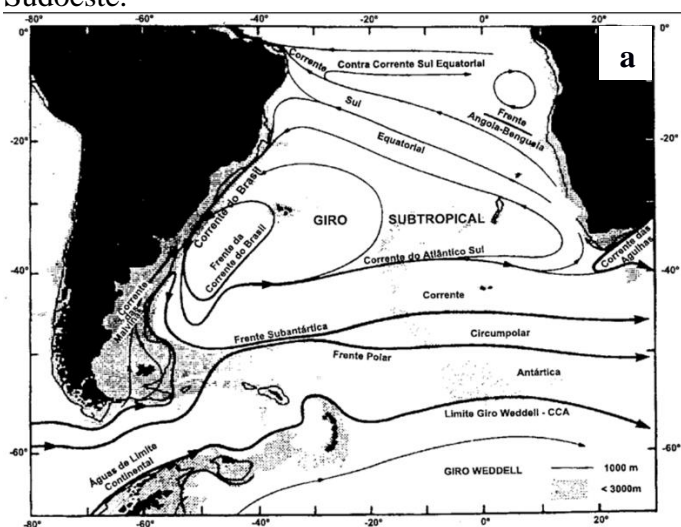
A fisiografia da Bacia de Santos é composta pelas regiões da plataforma continental, talude e platô de São Paulo (ASSINE; CORRÊA; CHANG, 2008). A plataforma continental é chamada biologicamente de zona nerítica, sofrendo influência das águas doces que desaguam dos rios, principalmente do Rio da Prata, trazendo matéria orgânica e poluentes (CAMPOS, 2021). Possui uma largura de, aproximadamente, 180 km ao sul e 100 km ao norte, e a profundidade máxima varia de 100 a 180 m, onde se localiza a quebra da plataforma (CIOTTI et al., 1995, TAGLIARO; JOVANE, 2021). O talude, região de declive acentuado, inicia próximo à quebra da plataforma, possui largura média de 120 km, e atinge mais de 3000 m de profundidade. Em algumas regiões do talude são observados cânions submarinos e grandes depósitos de sedimentos, além de campos de *pockmarks* e diápiros de sal (TAGLIARO; JOVANE, 2021; SILVA, 1995 apud SOUZA, 2000). O platô de São Paulo é um planalto marginal com morfologia acidentada, com profundidade superficial em torno de 2000 a 3500 m e largura máxima de 600 km (KUMAR; GAMBOA, 1979; KUMAR et al., 1977). O Platô de São Paulo delimita a Bacia de Santos ao leste e é caracterizado por extensa camada de evaporitos ou depósitos salinos (KUMAR; GAMBOA, 1979; GOMES et al., 2012),

A dinâmica oceanográfica na Bacia de Santos é marcada pela Corrente do Brasil, uma corrente de contorno oeste associada ao Giro Subtropical do Atlântico Sul, fluindo em direção ao sul sobre a plataforma continental e parte do talude, que transporta águas quentes e salinas (SILVEIRA et al., 2000; HARARI, 2021) (Figura 3a). A corrente é composta verticalmente por: água tropical (AT), água central do Atlântico Sul (ACAS), água intermediária Antártica (AIA), água intermediária Antártica (AIA), água circumpolar superior (ACS) e água profunda

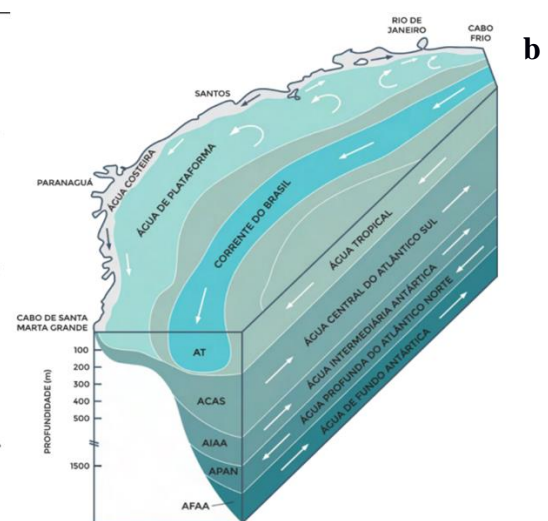
do Atlântico Norte (APAN) (SILVEIRA et al., 2000). AT é superficial atingindo 0 a 200 m, transportando águas quentes (20°C) e com alta salinidade (36 psu) (HARARI, 2021). A ACAS está localizada na profundidade de 200 a 400 m, água fria ($<20^{\circ}\text{C}$), salinidade entre 34 e 36 psu, e é rica em nutrientes inorgânicos e oxigênio dissolvido (BRAGA; MÜLLER, 1998; HARARI, 2021) (Figura 3B). Além dessas massas é encontrada na costa da bacia a água costeira (AC), é composta pela mistura de águas tropicais com águas fluviais, carrega águas quentes e com baixa salinidade (CIOTTI et al., 1995; NETTO JUNIOR, 2012).

Outras massas da água que estão presentes nas regiões mais profundas da Bacia de Santos são: água intermediária Antártica (AIA), água circumpolar superior (ACS) e água profunda do Atlântico Norte (APAN) (SILVEIRA et al., 2000; CAMPOS, 2021; HARARI, 2021). AIA flui em direção ao norte na profundidade de 500 a 1000 m, apresenta temperatura entre 3 a 6°C , baixa salinidade (34,2 a 34,6 psu) e elevados níveis de oxigênio dissolvido e nutrientes (STRAMMA; ENGLAND, 1999; SILVEIRA et al., 2000; VIEIRA, 2018; CAMPOS, 2021; HARARI, 2021). ACS é composta por baixas temperaturas ($3,3$ a $3,4^{\circ}\text{C}$), salinidade baixa (34,4 a 34,5 psu), contém baixa concentração de oxigênio dissolvido e alta concentração de nutrientes, e flui em direção a leste na Corrente Circumpolar Antártica (Figura 3a) (STRAMMA; ENGLAND, 1999; SILVEIRA et al., 2000; VIEIRA, 2018; HARARI, 2021). APAN com fluxo em direção ao sul, possui alta salinidade (34,6 a 35 psu) e concentração de oxigênio dissolvido, e baixas temperaturas (3 a 4°C) e concentração de nutrientes (SILVEIRA et al., 2000; VIEIRA, 2018; CAMPOS, 2021; HARARI, 2021) (Figura 3b).

Figura 3 – a: Representação esquemática de larga escala de giros e correntes do Oceano Atlântico Sul; b: Esquema de circulação e massas da água do Oceano na área do Atlântico Sudoeste.



Fonte: PETERSON, STRAMMA, 1991.

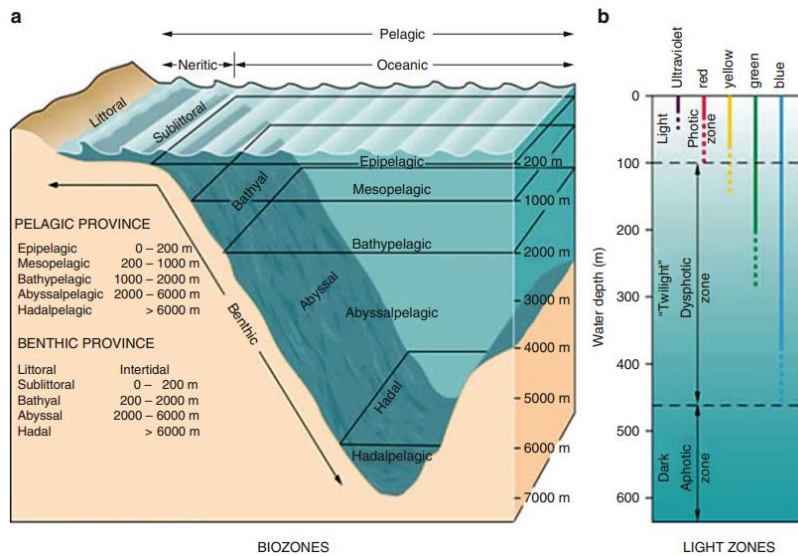


Fonte: HARARI, 2021.

As diferentes condições ambientais na bacia decorrem da variação de profundidade, e essa estratificação vertical da coluna de água é composta pelas zonas: epipelágica de 0 a 200 m de profundidade, correspondendo a zona eufótica com a incidência de luz em que acontece a produção primária, em sua maioria, através da fotossíntese (OKAFOR, 2011). Mesopelágica ou disfótica, está localizada entre 200 a 1000 m, e batipelágica ou afótica, de 1000 a 4000 m de profundidade, ambas são caracterizadas por temperaturas abaixo de 10°C, alta pressão e pelo decaimento da luminosidade impossibilitando a fotossíntese, sendo denominadas como oceano escuro que detém 95% do volume global do oceano (OKAFOR, 2011; DANOVARO et al., 2017). Nessas regiões há grande concentração de nutrientes inorgânicos, mas a matéria orgânica também está presente, proveniente da neve marinha formada pelos detritos orgânicos das camadas superiores (ARÍSTEGUI et al., 2009; OKAFOR, 2011), e a produção primária é oriunda de micro-organismos quimiossintetizantes (OKAFOR, 2011; MITRA; ZAMAN, 2016) (Figura 4).

O ambiente bentônico é composto pelas zonas: sublitoral, batial, abissal e hadal (MITRA; ZAMAN, 2016). Sublitoral com 0 a 200 m de extensão e constantemente sob radiação solar, as outras zonas, batial (200 a 2000 m), abissal (2000 a 6000 m) e hadal (>6000 m) tem como características a ausência de luz, alta pressão hidrostática e baixa temperatura, porém com a presença de fontes hidrotermais há o aumento da temperatura nessas regiões (SCHRENK; HUBER; EDWARDS, 2010; JØRGENSEN; MARSHALL, 2016; MITRA; ZAMAN, 2016). Esse ambiente também consta com as principais províncias da bacia oceânica: margem continental composta por plataforma e talude, planícies abissais, montes submarinos e fossas oceânicas (SCHRENK; HUBER; EDWARDS, 2010; MITRA; ZAMAN, 2016) (Figura 4a). O sedimento marinho é estratificado em camadas, a camada óxica é superficial com milímetros a centímetros de profundidade e, ocorre a difusão do O₂ proveniente da coluna de água e a remineralização de matéria orgânica (NEALSON, 2010; ORSI, 2018; JØRGENSEN et al., 2022; ZHAO et al., 2021). A camada anóxica não há a penetração de O₂, ocorrendo reações de redução de metais (manganês e ferro) e sulfato, e há a zona de transição entre essas camadas (KRISTENSEN, 2000; NEALSON, 2010; ORSI, 2018).

Figura 4 – Estratificação do ecossistema marinho: (a) zonação do sistema pelágico e bentônico; (b) zonação da luminosidade no ecossistema pelágico.



Fonte: MITRA; ZAMAN., 2016.

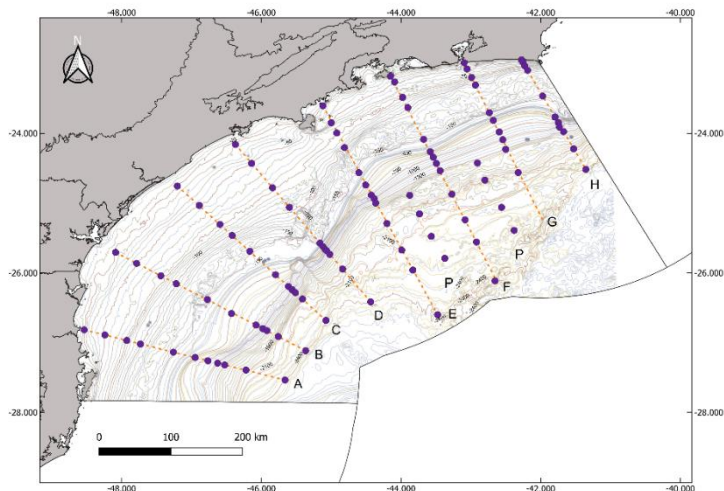
4.2 Amostragem

As coletas de sedimento e água para análises moleculares foram realizadas durante cruzeiros oceanográficos realizados como parte do Projeto Santos – Caracterização Ambiental da Bacia de Santos (Brasil), coordenado pelo PETROBRAS/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento (CENPES), em colaboração com Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP).

As amostras de sedimento marinho foram coletadas na primavera de 2019, utilizando os equipamentos *Box corer* (50x50x50 cm) ou *Van veen*, dependendo do tipo de sedimento encontrado. A coleta foi realizada nas regiões de Plataforma Continental, Talude e Platô de São Paulo, ao longo de 8 transectos (A - H), do sul ao norte da Bacia de Santos, com estações de coleta nas profundidades de 25, 50, 75, 100, 150, 400, 700, 1000, 1300, 1900 e 2400 m. Também foram amostrados 12 pontos adicionais no Platô de São Paulo (Figura 5). Após a coleta, as amostras de sedimento foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até o momento da extração de DNA.

As amostras de sedimento também foram coletadas para análises físico-químicas, realizadas por outros grupos de pesquisa colaboradores do projeto, como descrito abaixo. Além disso, a caracterização da camada de água em contato com o sedimento foi realizada utilizando o *Sea-Bird Electronics CTD*.

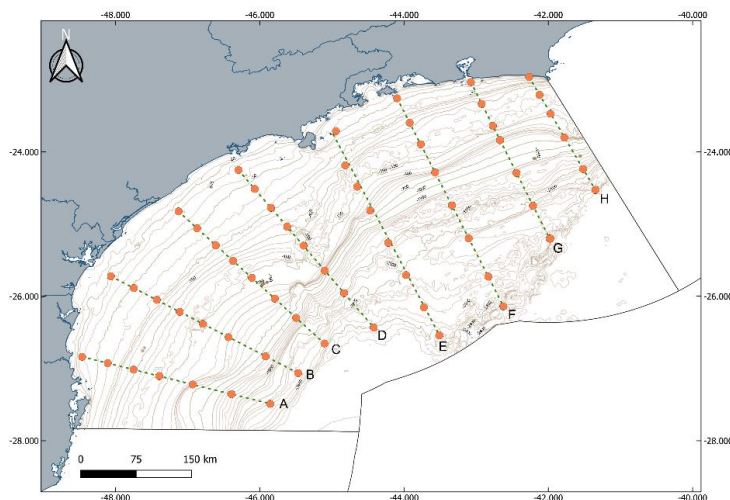
Figura 5 – Distribuição geográfica da malha amostral do sedimento por transecto do Projeto Santos.



Fonte: MOREIRA; JONCK, 2019a, modificado.

As amostras de água foram coletadas durante inverno e primavera de 2019. Foi utilizado o sistema CTD/Rosette contendo garrafas Go-flo e Niskin para coletar amostras nas regiões de Plataforma Continental, Talude e Platô de São Paulo, em transectos denominados de A a H (Figura 6). No perfil vertical foram coletados os estratos de 1 m, pico máximo de clorofila, 250 m, 900 m, 1200 m e 2300 m, podendo haver variação de profundidade dependendo da estação. Para cada ponto amostrados, foram filtrados até 15 L de água, utilizando bomba peristáltica (BP600, Milan), com a vazão do canal entre 0,8 à 25 ml/min., e filtro *Sterivex* (Sigma-Aldrich) com porosidade de 0,22 μm . Para cada estrato eram usados filtros que ao atingirem a colmatação eram trocados para a continuação da filtragem. Foram adicionados 3 mL de *RNAlater* (Ambion, Austin, Texas) a cada filtro, os quais foram selados e armazenados em ultrafreezer até o momento da extração de DNA.

Figura 6 – Distribuição geográfica da malha amostral da água por transecto do Projeto Santos.



Fonte: MOREIRA; JONCK, 2019b, modificado.

4.3 Determinação de parâmetros físico-químicos

Além da caracterização biológica, as amostras de sedimento foram analisadas para caracterização química, sendo supervisionada pelo prof. Renato da Silva Carreira da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. A análise de sedimentologia e geomorfologia foram realizadas sobre a coordenação do prof. Alberto Garcia de Figueiredo Jr. da Universidade Federal Fluminense com colaboração de Leopoldo Américo Miguez de Mello do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento (CENPES). A análise hidroquímica das amostras de água coletadas no sistema pelágico foi realizada sobre a supervisão do prof. Frederico Pereira Brandini da Universidade de São Paulo.

4.4 Extração de DNA, sequenciamento do gene 16S rRNA

A extração das amostras de sedimento foi realizada com o *DNeasy PowerSoil Pro kit* (Qiagen-ThermoFisher) seguindo o protocolo. Já as amostras de água foram extraídas utilizando o *DNeasy PowerWater kit* (Qiagen-ThermoFisher) com modificação no protocolo, que consistia na utilização do filtro *Sterivex*, utilizado na filtração da água e de células precipitadas obtidas da solução de *RNAlater*.

Após a extração, o DNA foi quantificado no aparelho Qubit 4 (Invitrogen-Thermo Fisher), utilizando o *Qubit dsDNA HS Assay kit* (Invitrogen-Thermo Fisher). A qualidade foi analisada por espectrofotômetro utilizando o equipamento Denovix DS-11 FX (DeNovix Inc.).

Das 292 amostras coletadas de sedimento e de 281 amostras de água, foram selecionadas 94 de sedimento e 175 de água para análise da diversidade microbiana por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. O sequenciamento das amostras de sedimento foi realizado pela empresa *Zymo Research*. O preparo do DNA foi feito com *Quick-16STM NGS Library Prep kit* (Zymo Research, Irvine, CA), utilizando os *primers* universais, 515F 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3', 926R 5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3' (QUINCE et al., 2011; PARADA; NEEDHAM; FUHRMAN, 2015). Em seguida a biblioteca foi feita a partir de reação de PCR, sendo o produto de PCR quantificado e purificado com *Select-a-Size DNA Clean & Concentrator kit* (Zymo Research, Irvine, CA), depois foi novamente quantificado com *TapeStation* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) e Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA). O sequenciamento foi executado na plataforma Illumina Miseq com método *paired-end* 2x 250bp em 600 ciclos.

Das 175 amostras de água, 29 foram sequenciadas pela empresa *Zymo Research*, como descrito acima e 146 foram sequenciadas pela NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, São Paulo). A biblioteca foi preparada a partir da reação de PCR, com os primers 515F-926R, a

programação do termociclador foi na fase de desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de anelamento de 45 segundos à 95°C, 45 segundos à 50°C e 90 segundos à 68°C, a extensão final de 68°C por 5 minutos.

Em seguida, o produto do PCR foi purificado com os *beads AMPure XP Beads* (Beckman) e depois foi feita a ligação dos adaptadores Illumina em uma segunda reação de PCR, que após essa reação foi novamente purificada com os *beads*. O produto foi normalizado para uma mesma concentração, depois foi feito o pool com o mesmo volume e quantificado por qPCR, para validar e determinar a concentração final, o kit usado foi *KAPA Library Quantification* para Illumina. O sequenciamento foi executado na plataforma Illumina Miseq com método *paired-end 2x 250bp*.

4.5 Análise bioinformática e estatística

A análise do sequenciamento foi feita utilizando a plataforma Qiime 2, versão 2020.8 (BOLYEN et al., 2019). Inicialmente foi realizada a importação dos arquivos fastq.gz e da tabela de metadados, em seguida foi feita a etapa de *demultiplexing* que mostrou a qualidade das sequências *forward* e *reverse*. Depois foi executada a filtragem das sequências usado o pipeline Dada2 na etapa *denoising* (CALLAHAN et al., 2016), e o classificação taxonômica aplicando o banco de dados Silva 138 (QUAST et al., 2013).

Os arquivos gerados no Qiime2 foram analisados estatisticamente no ambiente R (R CORE TEAM, 2018), versão 4.1.3. Os principais pacotes usados foram qiime2R, versão 0.99.6 (BISANZ, 2018), para importar os arquivos do Qiime2, o pacote *phyloseq*, versão 1.38.0 (MCMURDIE; HOLMES, 2013) para rarefação, filtragem e demais análises dos dados, e *ggplot2*, versão 3.3.6 (WICKHAM, 2016) usado na construção gráfica dos resultados.

Para as análises estatísticas foi retirada amostras que não haviam dados para as variáveis ambientais e apresentaram contaminação, ao final da filtragem foram utilizadas 86 amostras de sedimento e 169 de água. Para diversidade alfa foram avaliados os índices de riqueza Chao1 e diversidade Shannon, utilizando os pacotes *vegan*, versão 2.6-2 (OKSANEN et al., 2022) e *picante*, versão 1.8.2 (KEMBEL et al., 2010). Para beta diversidade foi aplicada a distância *unweighth Unifrac* (não ponderada) na análise multivariada de permutação (PERMANOVA), realizado pelo pacote *permute*, versão 0.9-7 (SIMPSON, 2022), e *betadisper* para homogeneidade de dispersão entre as variáveis ambientais, utilizando o pacote *vegan*. Para avaliar a interação da distribuição das arqueias oxidantes de amônia com os parâmetros físico-químicos foi realizada a análise canônica de coordenadas principais (CAP) (ANDERSON;

WILLIS, 2003). Para a escolha dessas variáveis ambientais foi verificada a colinearidade entre elas, utilizando os valores do coeficiente ($r > 0,7$ e p-valor $< 0,05$), foram mantidas.

A análise de correlação de Spearman foi realizada empregando o pacote *corrplot*, versão 0.92 (WEI; SIMKO, 2021) para exploração visual da matriz de correlação dos microorganismos participantes da nitrificação com os parâmetros ambientais. O coeficiente de correlação r foi classificado nas seguintes categorias: $r > 0,30$ fraca, $r > 0,50$ moderada e $r > 0,70$ forte, respeitando o sinal de negativo (-) ou positivo (+) antes do valor. (RUMSEY, 2021).

Para a produção dos mapas foram utilizados *shapes* fornecidos pelo Projeto Santos, os dados biológicos usados foram a abundância relativa filtradas da classe Nitrososphaeria, para nível de ordem, família e gênero. Os mapas foram gerados no programa QGIS3, versão 3.12.3.

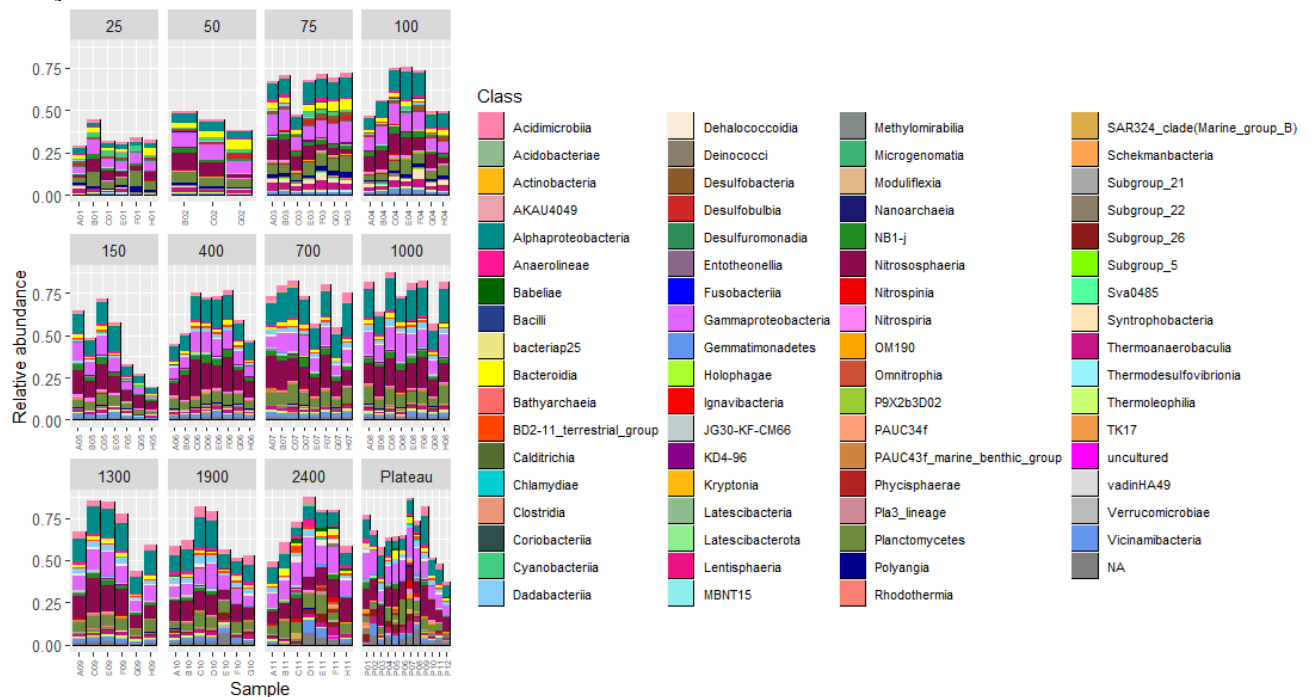
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sistema Bentônico

5.1.1 Composição taxonômica da comunidade microbiana

Para a análise da composição taxonômica foram utilizadas 86 amostras de sedimento gerando 847.186 sequências e 36.759 variantes de sequências de amplicon (ASV) após a rarefação dos dados. As classes dominantes detectadas em todas as profundidades analisadas foram Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Nitrososphaeria e Planctomycetes (Figura 7). Estudos anteriores realizados em amostras de sedimento marinho nas regiões de fossa do Oceano Pacífico indicaram também Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Nitrososphaeria, entre os grupos abundantes (ZHANG et al, 2018; PEOPLES et al, 2019). No mar Cáspio, essas classes também estiveram entre os mais predominantes, porém nas profundidades de 100 a 600 m (MAHMOUDI et al., 2014). Planctomycetes juntamente com as demais classes foram relatadas em abundância em sedimento marinho antártico (CHO et al., 2020). Nitrososphaeria está entre as arqueias mais dominantes no sedimento marinho, principalmente na camada superficial do sedimento (FRANCIS et al., 2005; ZHANG et al., 2018; JING et al., 2022).

Figura 7 – Abundância relativa das Classes dominantes (>1%) da comunidade microbiana em relação à batimetria do sistema bentônico da Bacia de Santos.

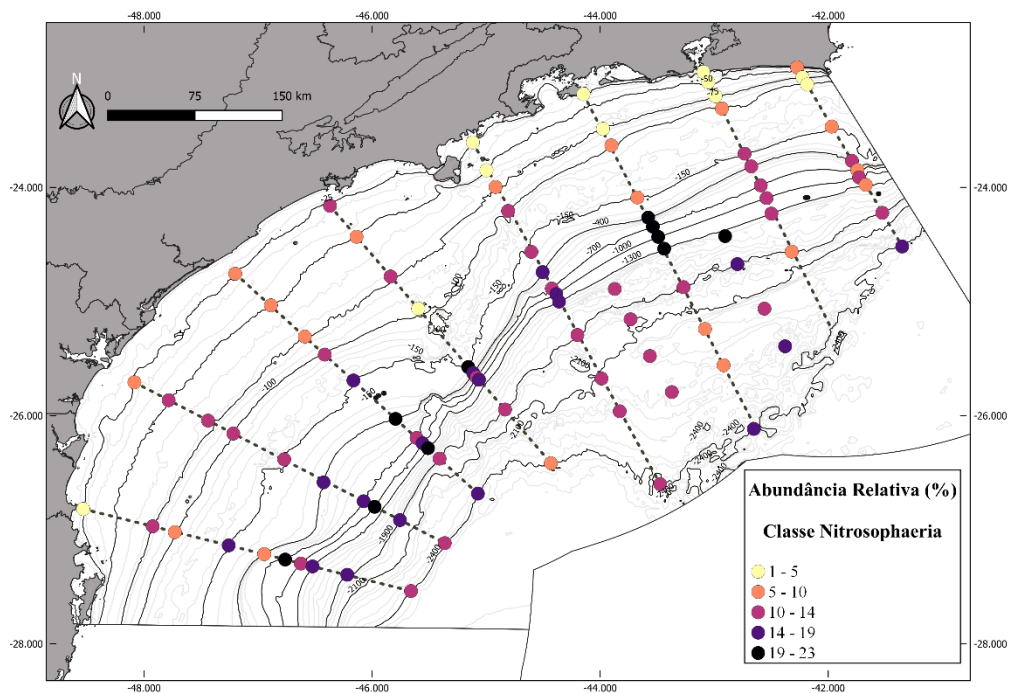


Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

Das ASVs totais, 1.465 (3,98%) foram classificadas sendo do domínio Archaea, sendo

912 ASVs (2,48%) pertencentes a classe Nitrososphaeria, que agrupa as arqueias oxidantes de amônia. Observando no mapa, a classe Nitrososphaeria teve ampla distribuição em toda Bacia de Santos, com maior prevalência na região da quebra da plataforma e talude. Considerando a batimetria, foi possível notar que as maiores abundâncias relativas foram encontradas nas isóbatas de 400 a 1300m, com a maior abundância atingindo mais de 20% da comunidade microbiana total (Figura 8). Já as menores abundâncias ocorrem nas isóbatas mais próximas a costa, principalmente ao norte da bacia. O fator que pode estar relacionado à baixa presença desses micro-organismos especificamente nessa região do sedimento seria a incidência de luz, estudos apontaram essa incidência interferindo no crescimento da população de AOA (LIU et al., 2018b; LU et al., 2020).

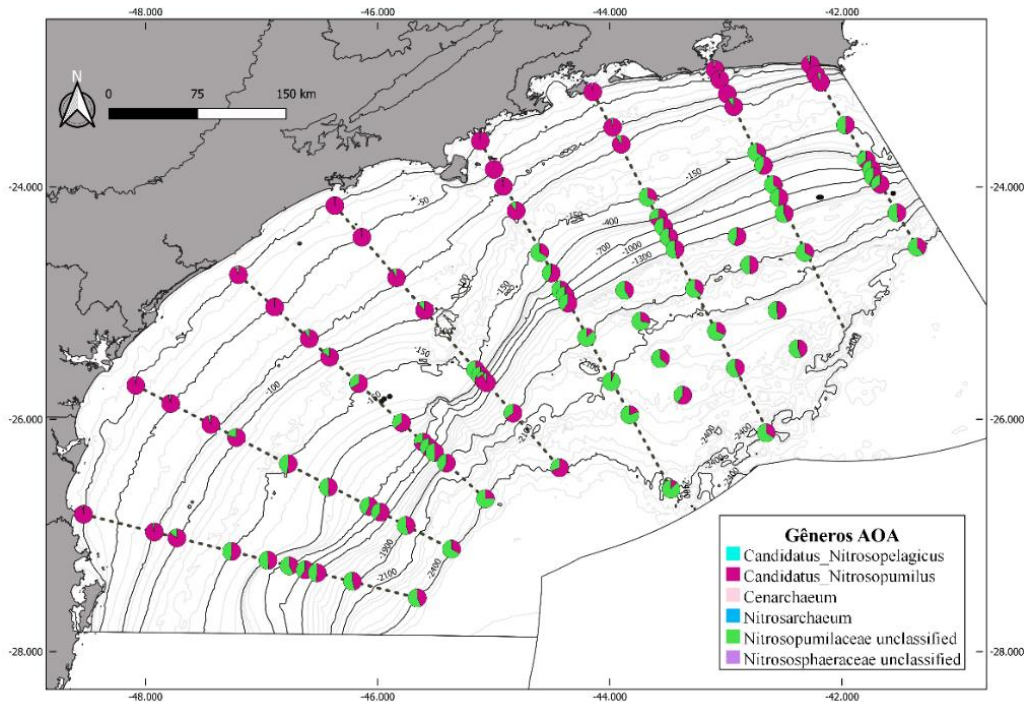
Figura 8 - Distribuição geográfica da abundância relativa da classe Nitrososphaeria do sistema bentônico da Bacia de Santos.



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2020.

Foi observado em relação aos gêneros de AOA, o *Candidatus Nitrosopumilus* foi predominante em toda a bacia, sobretudo nas amostras costeiras, de 25 a 100 m. Já Nitrosopumilaceae não-classificado foi abundante nas amostras de 150 m a 2400 m (Figura 9). Na literatura *Candidatus Nitrosopumilus* foi descrito como micro-organismos oxidante de amônia dominante no sedimento de estuário (LI et al., 2018c), de regiões superficiais (LALZAR et al., 2023) e sedimentos de regiões profundas (KEUTER; BARUCH RINKEVICH, 2016; WEMHEUER et al., 2019; ZHU et al., 2022), além desse gênero foi registrado a presença de *Cenarchaeum* e *Nitrosoarchaeum* (KEUTER; BARUCH RINKEVICH, 2016).

Figura 9 - Distribuição geográfica dos gêneros de arqueias oxidantes de amônia no sistema bentônico da Bacia de Santos.



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2020.

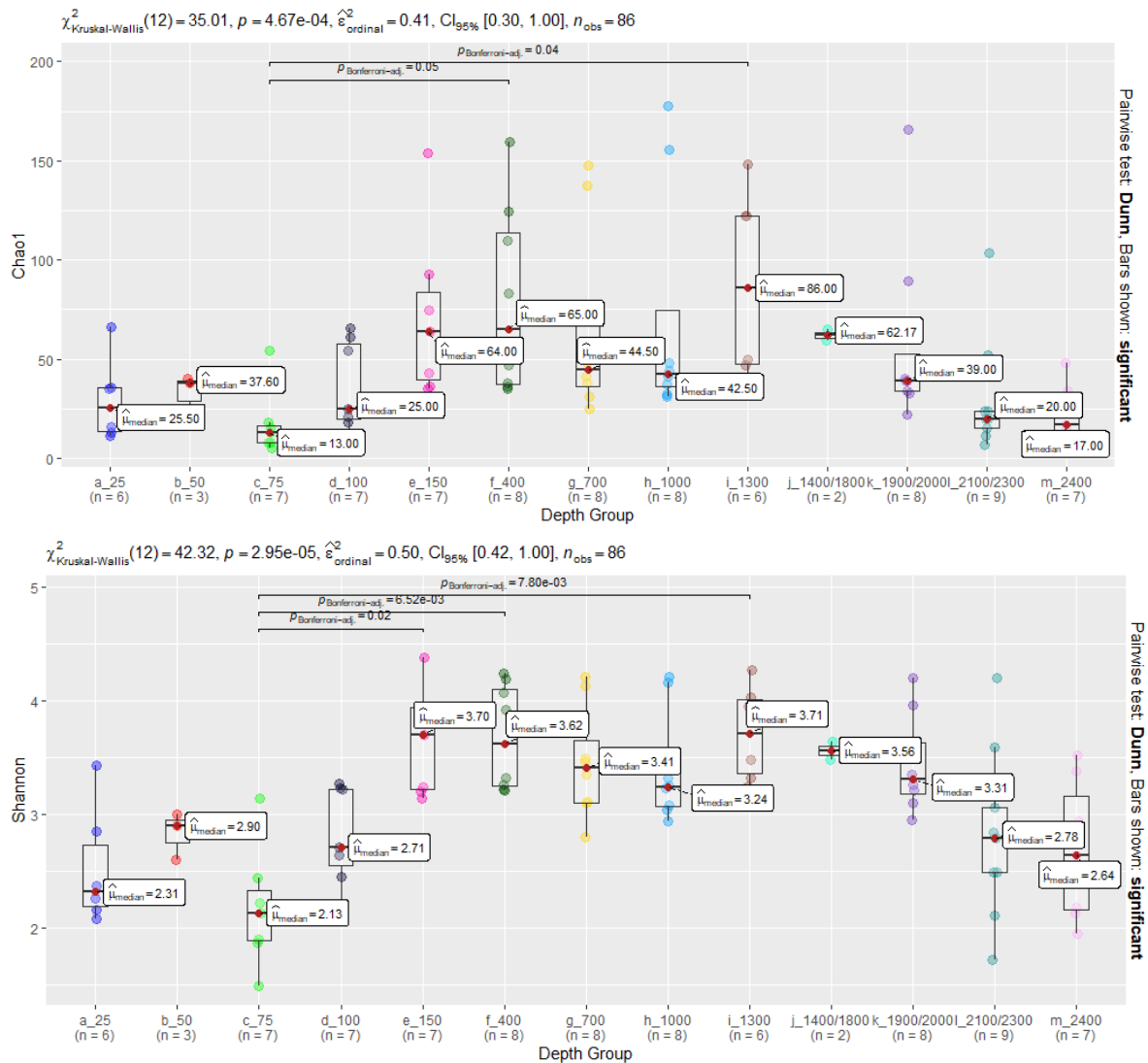
5.1.2 Alfa e Beta Diversidade da ordem Nitrosopumilales

As análises de diversidade foram realizadas apenas com ASVs da ordem Nitrosopumilales. Foi avaliada a normalidade dos valores obtidos para os índices Chao e Shannon com o teste Shapiro-Wilk. Os índices que apresentaram p-valor do teste abaixo de 0,05 não foram considerados normais. Foi então utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e o teste a posteriori Dunn, cujos índices foram significativos para o fator de profundidade, massa de água (próxima ao sedimento analisado) e região (plataforma, talude e platô). Já a comparação por transecto não apresentou resultado significativo, indicando similaridade entre as áreas sul e norte da bacia em relação à distribuição de Nitrosopumilales.

Os maiores valores de diversidade e riqueza foram observados na isóbata de 1300 m, sendo significativamente maior que a isóbata de 75 m (Figura 10). Foi avaliado que as comunidades de Nitrosopumilales do sistema bentônico variam entre amostras sob influência das diferentes massas de água. Isso se deve as trocas que ocorrem na região de transição entre o sedimento e coluna de água, e acabam influenciando o microbioma desse ambiente (JING et al., 2018). Os maiores índices de riqueza e diversidade foram observados na água circumpolar superior (UCDW), que apresentou diferença significativa na diversidade com água de mistura (MW) (Figura 11). Em relação ao fator regiões oceânicas sobre a Nitrosopumilales, os maiores índices de alfa diversidade foram observados nas amostras do Talude, demonstrando diferença

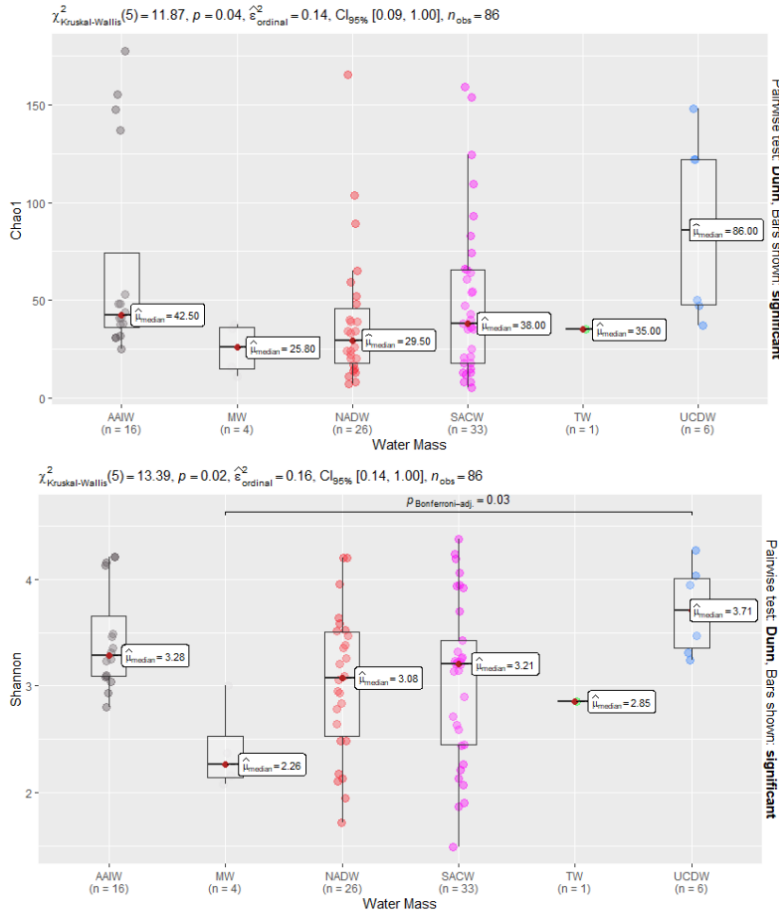
significativa com relação às demais regiões (Figura 12).

Figura 10 – Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) das comunidades de Nitrosopumilales por profundidade na Bacia de Santos. Linhas horizontais mostram as diferenças significativas com o método de ajuste *Bonferroni*. Os círculos coloridos correspondem às estações coletadas em cada batimetria.



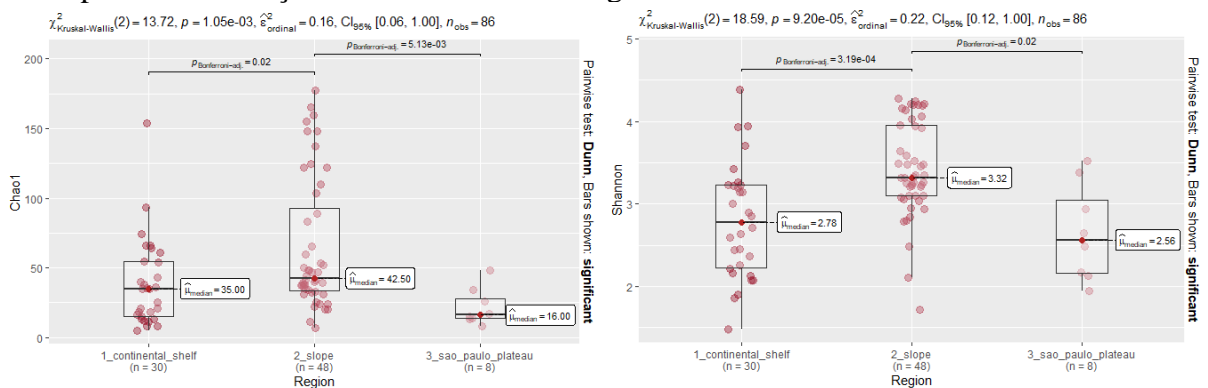
Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

Figura 11 – Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) das comunidades de Nitrosopumilales no sedimento em contato com a massa de água na Bacia de Santos. Linhas horizontais mostram as diferenças significativas com o método de ajuste *Bonferroni*. Os círculos coloridos correspondem às estações coletadas em cada massa de água.



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

Figura 12 – Índices alfa de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) das comunidades de Nitrosopumilales do sedimento nas regiões oceânicas na Bacia de Santos. Linhas horizontais mostram as diferenças significativas com o método de ajuste *Bonferroni*. Os círculos coloridos correspondem às estações coletadas em cada região oceânica.



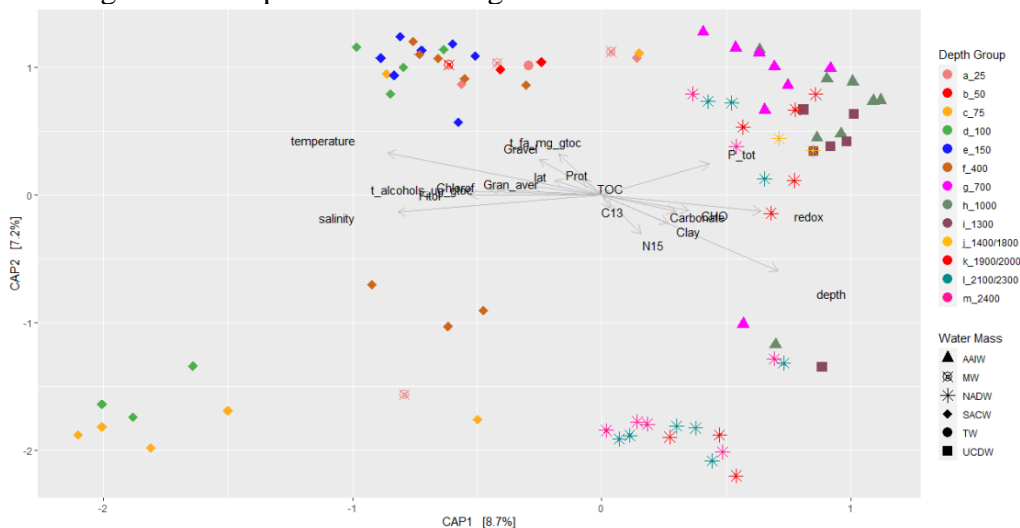
Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

A diversidade beta foi avaliada por meio da análise de PERMANOVA e do teste *betadisper*, utilizando a distância *Unifrac* não ponderado, com intuito de verificar a influência

dos fatores ambientais na estrutura da comunidade de Nitrosopumilales. A análise PERMANOVA indicou diferenças significativas desta estrutura para regiões oceânicas (Adonis $R^2 = 4,5454$; p-valor = 0,001), profundidades (Adonis $R^2 = 2,7163$; p-valor = 0,001) e massas de água (Adonis $R^2 = 3,144$; p-valor = 0,001). O teste *betadisper* demonstrou que as diferenças dos determinantes ambientais, profundidades e massas de água, foram significativos (p-valor < 0,05). As regiões oceânicas não apresentaram diferença significativa (p-valor > 0,05) para o *betadisper*. Com relação ao transecto, não foi observada diferença significativa nas análises de PERMANOVA (p-valor = 0,635) e *betadisper* (p = 0,731), para estrutura da comunidade. Com isso, pode se verificar que profundidade e massa de água possuem efeito significativo sobre a estrutura da comunidade de Nitrosopumilales.

O gráfico de análise canônica de coordenadas principais (CAP) foi gerado para avaliar quais variáveis ambientais interagem na composição da comunidade, para a escolha dessas variáveis foi checada a colinearidade entre elas. O gráfico de CAP (Figura 13) mostrou um agrupamento formado pelas amostras de 25 m a 400 m de profundidade que são influenciadas pelas massas de águas pela água tropical (TW), água de mistura (MW) e água central do Atlântico Sul (SACW), respectivamente. Essas amostras correlacionaram com maiores valores de temperatura, salinidade, clorofila, fitol, álcool, proteína, ácidos graxos, latitude e cascalho. Outro agrupamento obtido foi das amostras de 700 m a 2400 m de profundidade, contemplando as águas intermediárias e profundas da Bacia, sendo essas correlacionadas com maiores valores de profundidade, redox, fósforo total, carbonato, carbono 13, nitrogênio 15, carbono orgânico total (TOC), argila e carboidrato total (CHO).

Figura 13 – Análise canônica de coordenadas principais (CAP) das comunidades de Nitrosopumilales com parâmetros ambientais do sistema bentônico. A ordenação foi construída com a distância Unifrac não ponderado. A coloração foi definida pelas profundidades e as formas geométricas pelas massas de água.



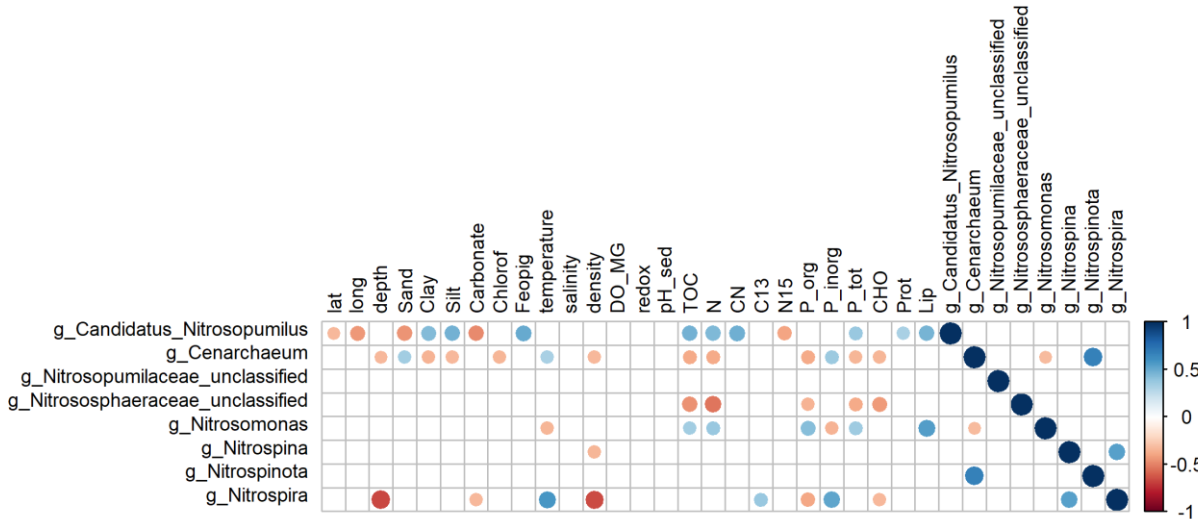
Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

Os micro-organismos nitrificantes são essenciais para produção primária e ciclagem do nitrogênio no ambiente bentônico (ZHAO et al., 2019), sobretudo as arqueias no sedimento de mar profundo (WEMHEUER et al., 2018). As AOA são o grupo de arqueias dominante no sedimento marinho, principalmente na camada óxica (DURBIN; TESKE, 2011; ZHAO et al., 2021), mas também está presente na subsuperfície de sedimento e até mesmo em rochas (JØRGENSEN; ZHAO, 2016; ZHAO et al., 2020). A superfície do sedimento é heterogênia, dinâmica e apresenta um gradiente de processos físicos e biogeoquímicos (FRINDTE et al., 2015; BANCHI et al., 2021). Um dos fatores é o contato com a coluna de água, este espaço de transição entre a água e o sedimento é chamado de interface sedimento-água, nele ocorre a troca de gases, transporte de substâncias, misturas, deposição e ressuspensão de partículas, provenientes de atividades físicas e biológicas, por exemplo, a bioturbação realizada por macro-organismos, e a ciclagem de nutrientes por micro-organismos (DAUMAS, 1990; SANTSCHI et al., 1990; FRINDTE et al., 2015; BANCHI et al., 2021). Assim como, a ação microbiana influencia na interface, os micro-organismos que habitam o sedimento superficial também são afetados por esses processos, seja pelo gradiente redox com a disponibilidade de aceptores e doadores de elétrons (FRINDTE et al., 2015; SCHAUBERGER et al., 2021), ou pela bioturbação (CHEN et al., 2017; PETRO et al., 2019), além de correntes oceânicas (MÜLLER et al., 2014; PEOPLES et al., 2019).

Maior abundância e diversidade de AOA foram observados na região batial da bacia, essa região é caracterizada pela baixa temperatura, alta pressão e conhecida por ser oligotrófica (JØRGENSEN; MARSHALL, 2016). Para habitarem esse ambiente as AOA apresentam uma gama de adaptações, como a presença dos genes que codificam para respostas a limitação de oxigênio e nitrogênio, proteína de choque frio, estresse oxidativo e altas pressões (ZHANG et al., 2018; KEROU et al., 2021). No sedimento de mar profundo elas são importantes representantes do metabolismo quimiossintéticos, contribuindo para a produção primária e para o ciclo do nitrogênio e carbono, produzindo energia e compostos orgânicos para os demais micro-organismos nesse ecossistema (MAHMOUDI et al., 2014; HE et al., 2018).

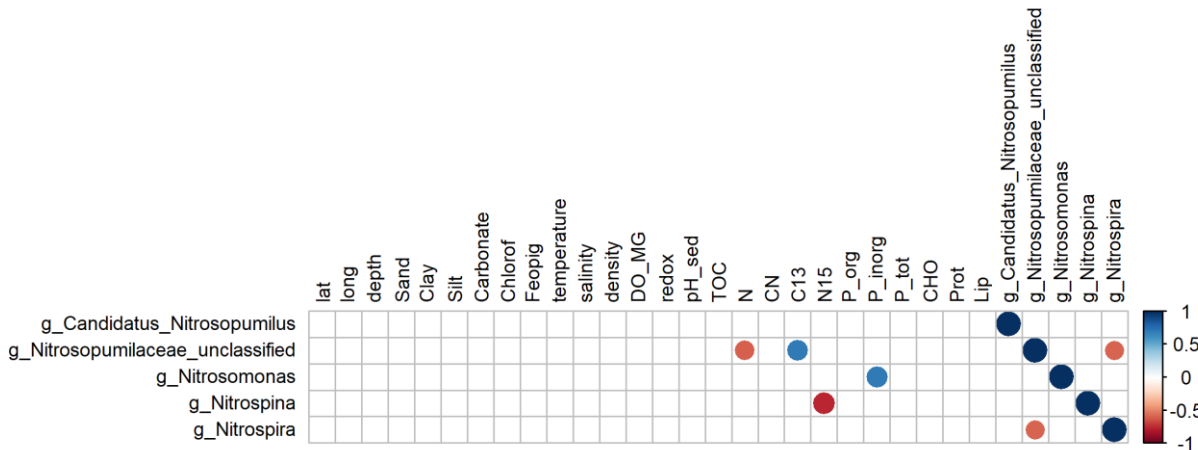
Em relação à estrutura da comunidade de Nitrosopumilales, foi indicada a influência dos fatores temperatura, salinidade e profundidade, esse resultado é consistente com o encontrado no estudo de He e colaboradores (2018), além disso, as massas de água também exerceram influência sobre a comunidade de Nitrosopumilales do sedimento superficial coletado. Porém não são apenas esses fatores que determinam a interferência na estrutura da comunidade, e sim a combinação com as demais variáveis ambientais (WANG et al., 2017; JING et al., 2022).

Figura 15 – Correlação de Spearman entre os gêneros de AOA, bactérias nitrificantes e fatores ambientais para a região do Talude. Correlações positivas estão marcadas em azul e negativas em vermelho. O tamanho do círculo é proporcional ao valor de coeficiente r . O eixo vertical representa a variação dos valores do coeficiente r .



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

Figura 16 – Correlação de Spearman entre os gêneros de AOA, bactérias nitrificantes e fatores ambientais para a região do Platô de São Paulo. Correlações positivas estão marcadas em azul e negativas em vermelho. O tamanho do círculo é proporcional ao valor do coeficiente r . O eixo vertical representa a variação dos valores do coeficiente r .



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

As correlações positivas entre os gêneros de AOA com bactérias oxidantes de nitrito podem indicar a interação de mutualismo entre esses grupos, já que a oxidação da amônia fornece nitrito como fonte de energia para a bactéria, ocorrendo assim a nitrificação completa, importante para a ciclagem de nutrientes no sedimento marinho (KIM et al., 2021; JING et al., 2022). A única correlação significativa dessa análise foi da plataforma continental entre abundância relativa de *Candidatus Nitrosopumilus* e a concentração de nitrogênio. Plataforma continental por estar próxima a região costeira recebe maior aporte de sedimentos ricos em

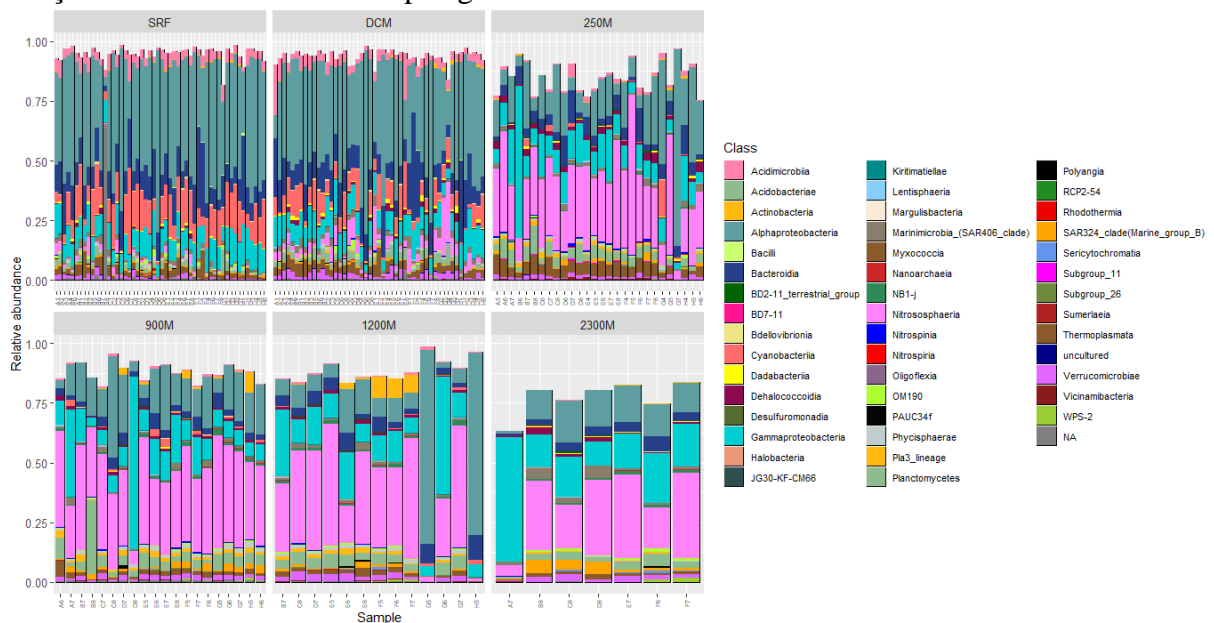
matéria orgânica, oriundos dos rios e estuários, adicionados a matéria proveniente dos fitoplanctons que vivem na coluna de água (MEYERS, 1997; DE MAHIQUES et al., 2004). A decomposição da matéria orgânica resulta na produção de amônia, servindo como substrato para os micro-organismos oxidantes de amônia, mas também existem no ambiente a produção de ureia e cianato que são substratos alternativos para esses micro-organismos (DEVOL, 2015; KITZINGER et al., 2018; ZHAO et al., 2021).

5.2 Sistema Pelágico

5.2.1 Composição Taxonômica da comunidade microbiana

Para as amostras de água analisadas visando posteriormente a filtragem da classe Niitrososphaeria, foram obtidas o total de 1.132.807 seqüências e 13.807 variantes de seqüências de amplicon (ASV) em 169 amostras após a rarefação dos dados. Verificando a abundância relativa da comunidade total foi observada nos estratos de SRF (*surface*) e DCM (*deep chlorophyll maximum*) a predominância de Alphaproteobacteria, Bacteroidia, Cyanobacteria e Gammaproteobacteria. Já nas camadas de 250 m, 900 m, 1200 m e 2300 m Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria estiveram entre os grupos dominantes. Porém, nestes estratos houve predominância da classe Nitrososphaeria (Figura 17).

Figura 17 – Abundância relativa das classes dominantes (>1%) da comunidade procariótica em relação aos estratos do sistema pelágico da Bacia de Santos.



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

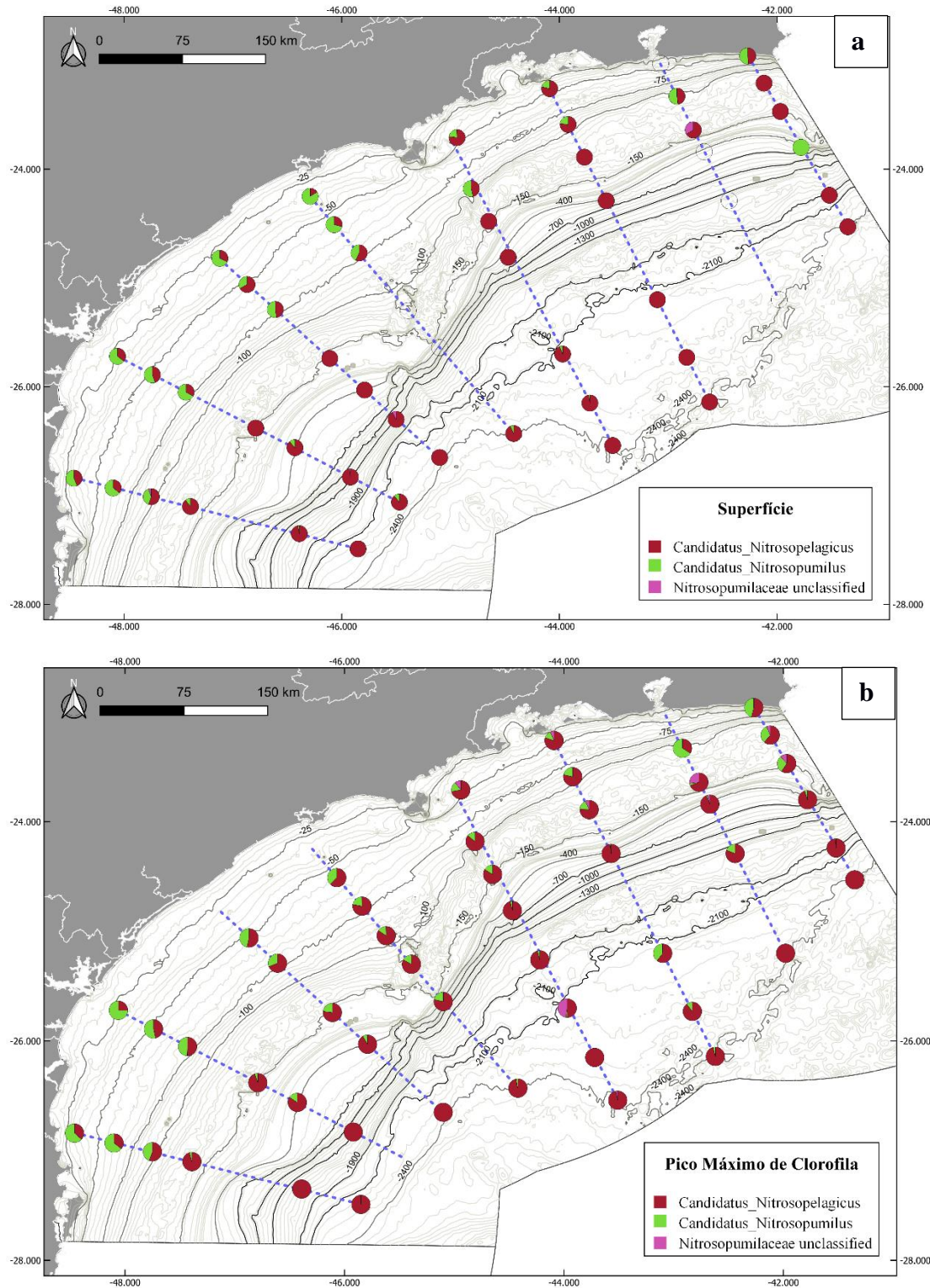
Os resultados estão em concordância com os dados encontrados por Alves Junior e colaboradores (2014) na Bacia de Campos, que observaram a dominância de Alphaproteobacteria e Cyanobacteria nos estratos superficiais, com redução na abundância com

a profundidade. O contrário ocorre com Gammaproteobacteria, aumentando concomitantemente sua predominância com a profundidade. A presença de Cyanobacteria, principalmente nas amostras superficiais, condiz com o esperado, pois esse grupo é formado por micro-organismos fotossintéticos abundantes na zona epipelágica. Porém já foram descritos em regiões mais profundas agregados a detritos em sedimentação (LOCHTE; TURLEY, 1988). Responsáveis por 25% da produção primária oceânica, esses organismos têm como representantes os gêneros *Prochlorochoccus* e *Synechococcus* (FLOMBAUM et al., 2013; WANG et al., 2020). As classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria estão distribuídas em toda a coluna de água e estudos anteriores indicaram a presença tanto na superfície e nas regiões abaixo de 200 m (WALSH et al., 2015; YILMAZ et al., 2016). Representante de Alphaproteobacteria, o clado SAR 11, composto por bactérias heterotróficas, são os micro-organismos mais abundantes no ambiente oceânico, constituindo 30% nas águas superficiais e 25% na zona mesopelágica das células picoplanctônicas (MORRIS et al., 2002; CARLSON et al., 2008). A única classe de arqueia presente foi a Nitrososphaeria predominante nas zonas meso- e batipelágicas, embora esteja presente em alguns transectos na região de pico máximo de clorofila.

Após realizar a filtragem de dados para classe Nitrososphaeria foram obtidas 541 ASVs (3,91%). A maior abundância relativa de Nitrososphaeria ocorreu nos pontos G5 e F5 do estrato de 250 m, compreendendo quase 67% e 55% das comunidades de procariotos, respectivamente. Os estratos mais profundos também registraram abundâncias significativas para: 1200 m (52%), 900 m (49%) e 2300 m (38%). Nas camadas superficiais, de SRF e DCM, foram registrados os menores valores de abundância relativa dessa classe (Figura 18).

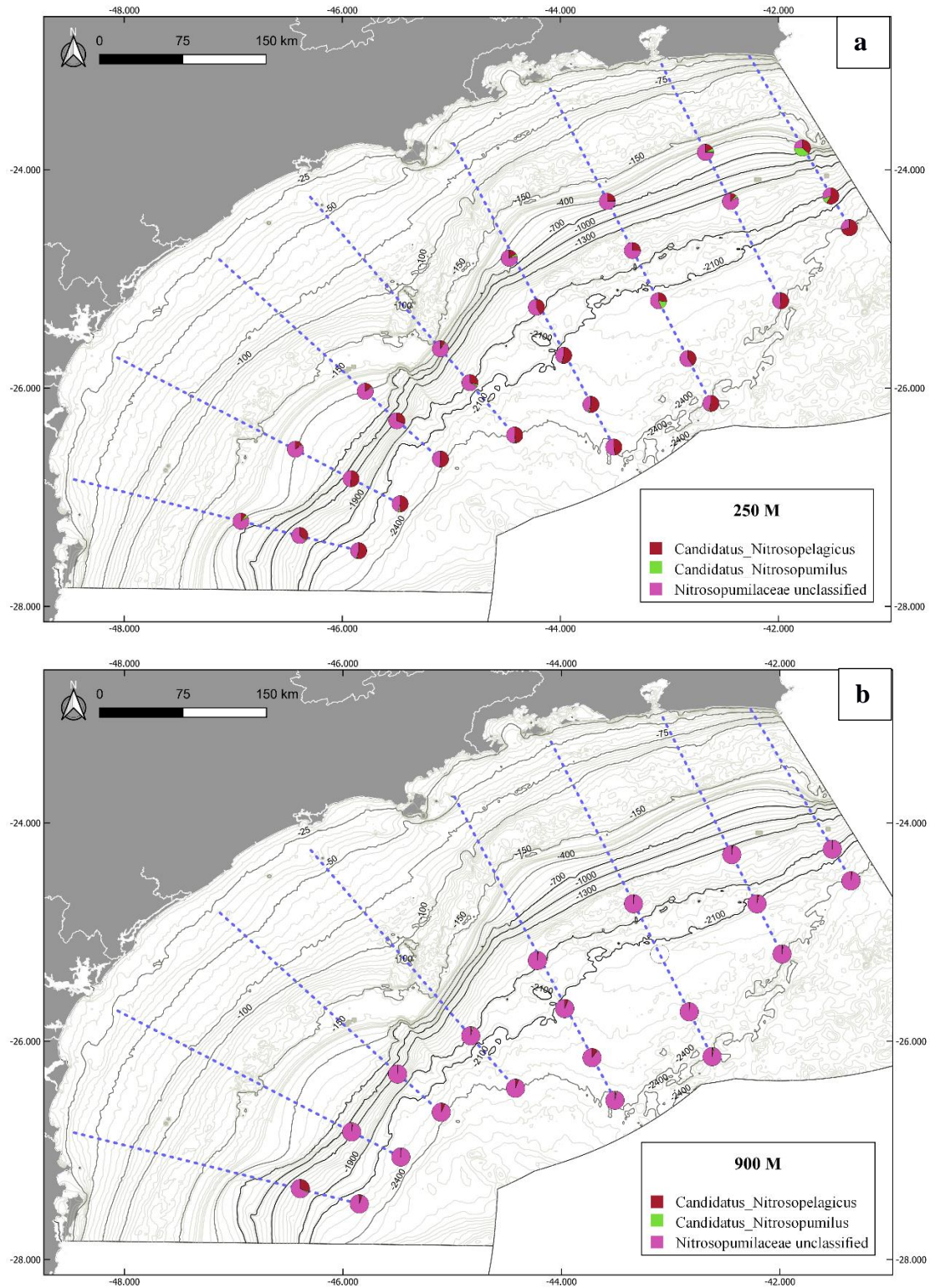
Os dados foram analisados à nível de gênero da classe Nitrososphaeria. Os gêneros de arqueias oxidantes de amônia, *Candidatus Nitrosopelagicus* e *Candidatus Nitrosopumilus* foram os mais representativos em relação as amostras da superfície e DMC. *Candidatus Nitrosopumilus* nas áreas próximas a costa, denominada como região nerítica, mostrou predominância, sobretudo, nos transectos mais ao sul da Bacia. Entretanto o gênero *Candidatus Nitrosopelagicus* teve dominância nas amostras oceânicas (Figura 18). Na zona mesopelágica, especificamente no estrato de 250 m, *Candidatus Nitrosopelagicus* e gêneros não-classificados foram os mais abundantes, sendo este último predominante nas amostras do estrato de 900 m (Figura 19). Para os estratos de 1200 m e 2300 m, os gêneros não classificados foram dominantes em todos os pontos dos transectos, porém houve a presença do *Candidatus Nitrosopumilus* (Figura 20).

Figura 18 - Distribuição geográfica dos gêneros de arqueias da classe Nitrososphaeria nos estratos de superfície (a) e pico máximo de clorofila (b) no sistema pelágico.



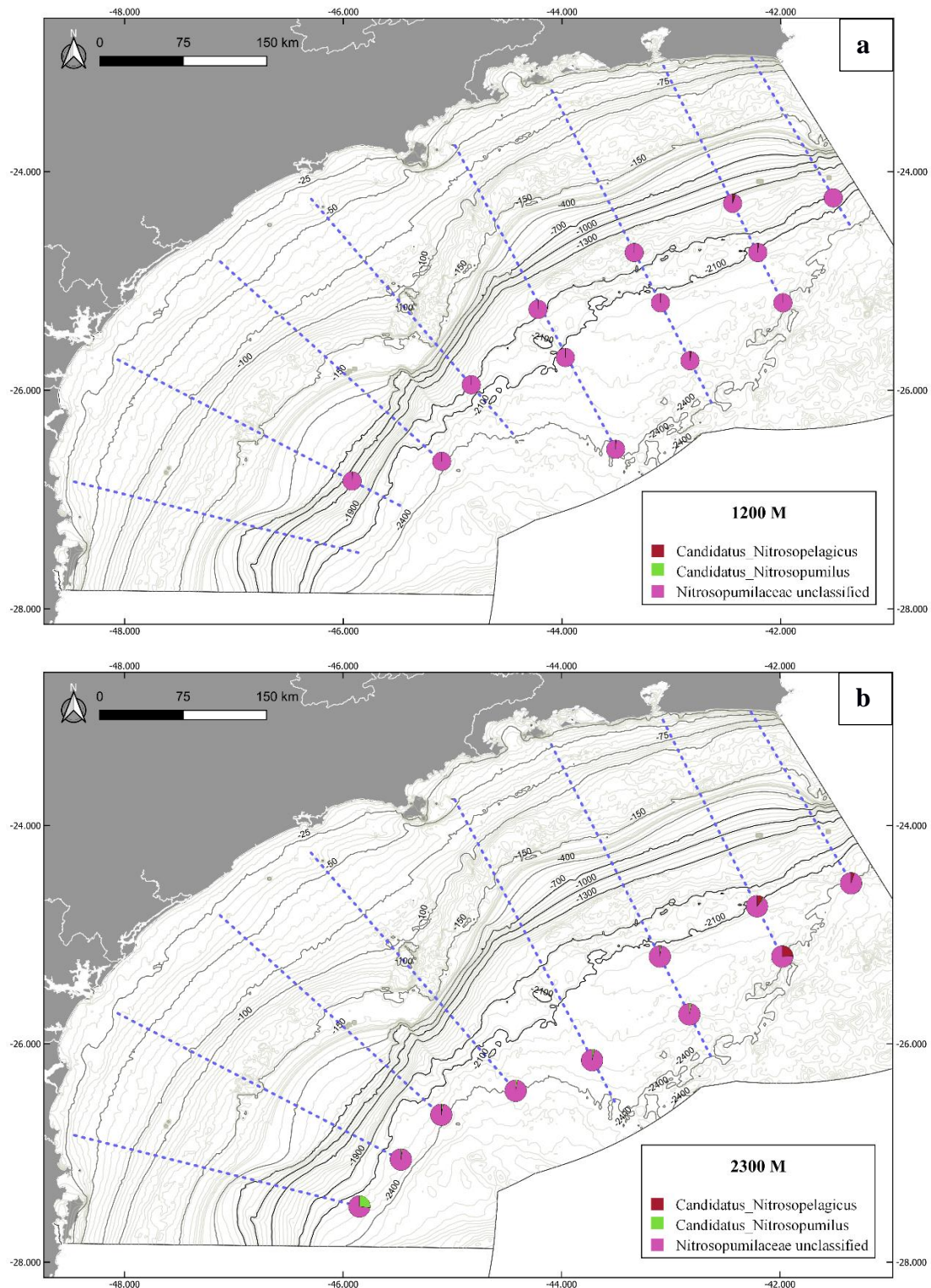
Fonte: Alice de Moura Emílio, 2020.

Figura 19 - Distribuição geográfica dos gêneros de arqueias da classe Nitrososphaeria nos estratos de 250 m (a) e 900 m (b) no sistema pelágico.



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2020.

Figura 20 – Distribuição geográfica dos gêneros de arqueias da classe Nitrososphaeria nos estratos de 1200 m (a) e 2300 m (b) no sistema pelágico.



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2020.

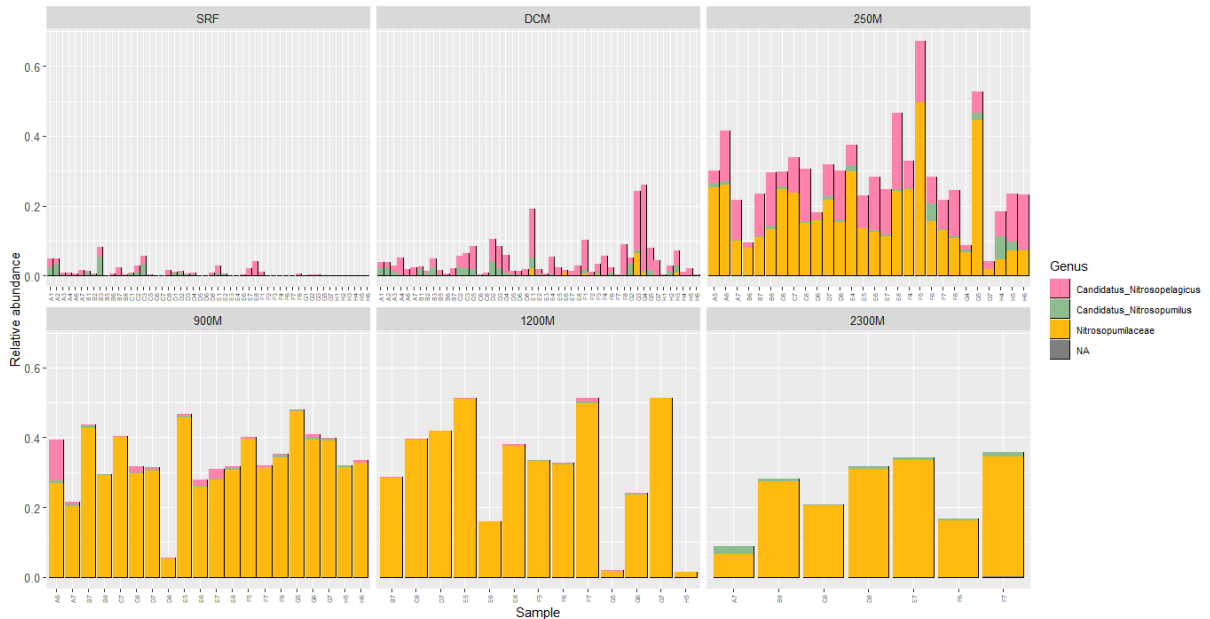
Avaliando as arqueias oxidantes de amônia em nível de gênero foi possível observar o padrão da distribuição da baixa abundância nas regiões superficiais e o aumento conforme a profundidade, tendo o máximo da abundância na zona mesopelágica (Figura 21). Sendo esses

resultados similares aos trabalhos realizados em regiões do Oceano Atlântico (SINTES et al., 2016; DAMASHEK et al., 2018), e na Bacia de Campos (ALVES JUNIOR et al., 2014). Na região norte do Oceano Pacífico, a presença do *Candidatus Nitrosopelagicus* ocorreu por toda coluna d'água, porém sua abundância relativa aumentou conforme a profundidade, e os gêneros não classificados atingiram os maiores valores na zona mesopelágica (SEMEDO et al., 2021). Nas regiões de fossas oceânicas próximas ao Japão, Nitrososphaeria apresentou perfil de distribuição semelhante, não sendo observada nas águas superficiais, porém nas profundidades maiores de 100 m houve o aumento considerável da abundância (NUNOURA et al., 2015).

Estudos anteriores justificam a baixa abundância das AOA na zona eufótica de oceanos e mares ao fator de inibição resultante da forte incidência solar (SMITH; CHAVEZ; FRANCIS, 2014; WU et al., 2022). Ainda é desconhecido como o mecanismo de fotossensibilidade ocorre nas arqueias, porém já foi observado que bactérias oxidantes de amônia também sofrem fotoinibição, por apresentarem a enzima amônia monooxigenase. (SHEARS; WOOD, 1985; MERBT et al., 2011; LU et al., 2020; GOTTSBALL et al., 2022). A luminosidade não é o único fator que pode interferir na presença de AOA na zona epipelágica do ambiente aquático. Smith, Chavez e Francis (2014) destacaram em seu estudo a competição entre AOA e fitoplanctons pelo substrato a amônia interferindo na taxa de nitrificação do ambiente.

Outra hipótese para explicar o padrão de distribuição das AOA na coluna de água da bacia seria os ecótipos. Foi identificado pela primeira vez por Francis e colaboradores (2005) a existência de ecótipos de AOA relacionados verticalmente ao ambiente pelágico, sendo os grupos: *water column A* (WCA) associado inicialmente a região rasa, porém já foi descrito em toda coluna de água, e *water column B* (WCB), associado a região profunda, abaixo da zona fótica (BEMAN; POPP; FRANCIS, 2008; SANTORO; CASCIOTTI; FRANCIS, 2010; SMITH et al., 2014; REJI et al., 2019b). Além da profundidade outros parâmetros estão ligados aos ecótipos como, fatores ambientais (MÜLLER et al., 2018), incidência de luz (MERBT et al., 2012; LUO et al., 2013), concentração de amônia (SINTES et al., 2013; SINTES et al., 2016) e taxa de nitrificação (SMITH et al., 2014; SANTORO et al., 2017). Com isso, é possível observar nos resultados a presença do *Candidatus Nitrosopelagicus* em amostras superficiais e profundas (Figura 21), podendo indicar uma distribuição semelhante ao apresentado por WCA, tendo em vista que, a espécie *Nitrosopelagicus brevis* o único representante cultivada do tipo WCA (SANTORO; CASCIOTTI, 2011; SANTORO et al., 2015).

Figura 21 – Abundância relativa de gêneros de arqueias oxidantes de amônia por estrato da coluna d'água.



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

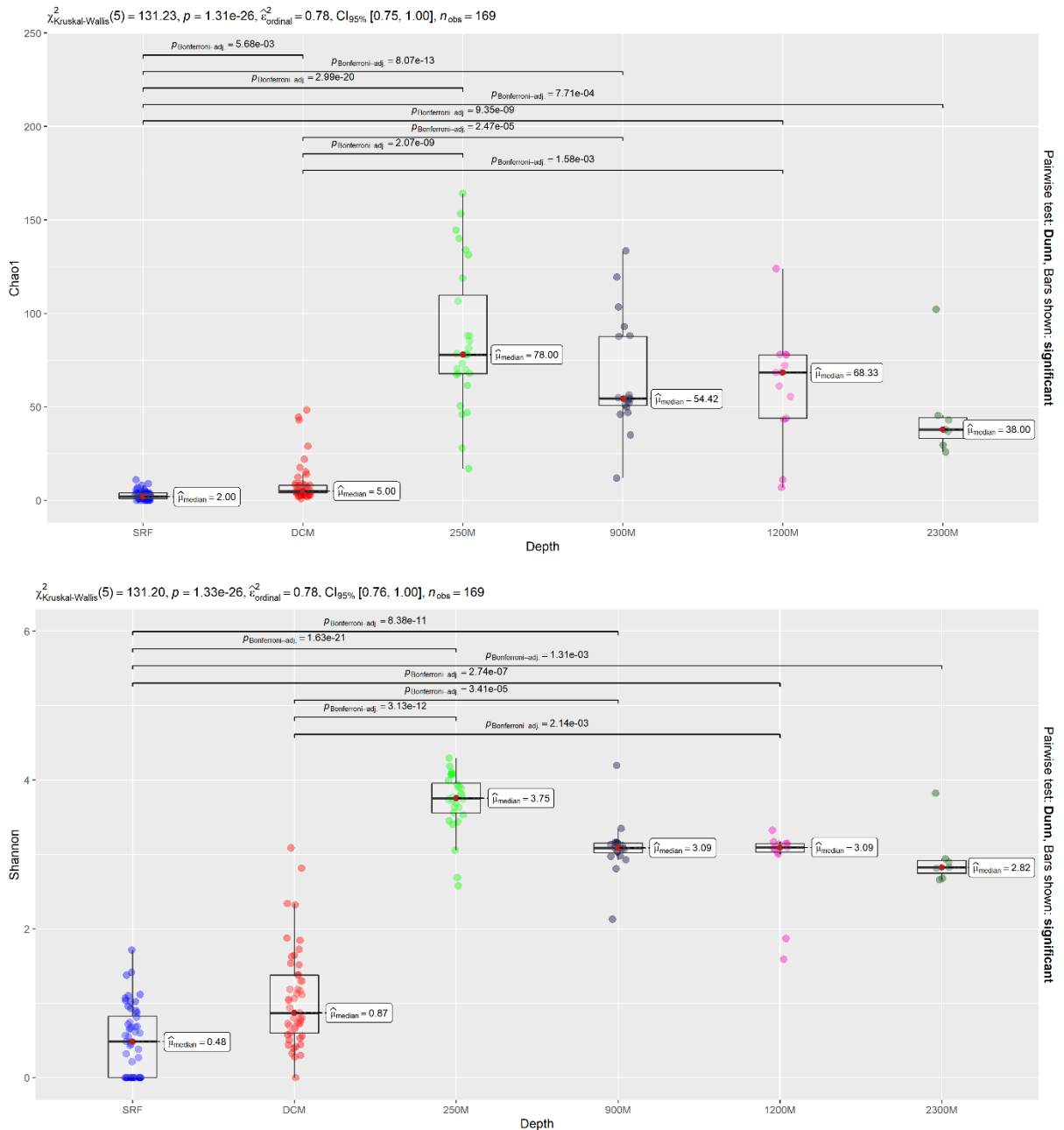
5.2.2 Alfa e Beta diversidade da ordem Nitrosopumilales no sistema pelágico

A análise de diversidade foi realizada apenas com ASVs da ordem Nitrosopumilales. Foi avaliada a normalidade dos valores obtidos para os índices Chao 1 e Shannon com o teste Shapiro-Wilk. Os índices que apresentaram p-valor do teste abaixo de 0,05 não foram considerados normais. Consequentemente foi empregado o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* e o teste a posteriori *Dunn*. Observou-se que os índices foram significativamente diferentes entre estratos, massas de água e regiões. Já a comparação por transecto não obteve resultado significativo, apontando a similaridade na distribuição de Nitrosopumilales em relação ao sul e norte da bacia.

Com relação aos estratos, foi observada maior riqueza de espécies e diversidade em 250 m (Figura 22). Já os estratos superficiais (SRF e DCM) apresentaram os menores índices de alfa diversidade, além de demonstrarem diferença significativa em relação aos demais estratos. Já entre 250 m, 900 m, 1200 m e 2300 m não houve diferença significativa. Para as massas de água (Figura 23) os maiores índices de Chao 1 e Shannon de Nitrosopumilales foram obtidos para água central do Atlântico Sul (SACW), sendo significativamente maior que as massas de água superficiais (CW, TW E MW). No entanto, os índices para SACW não tiveram diferença significativa em relação as massas de água intermediárias e profundas (AAIW, NADW e UCDW). Em relação às zonas pelágicas (Figura 24) os maiores índices de diversidade alfa foram encontrados nos estratos mesopelágicos, apresentando diferença significativa em relação

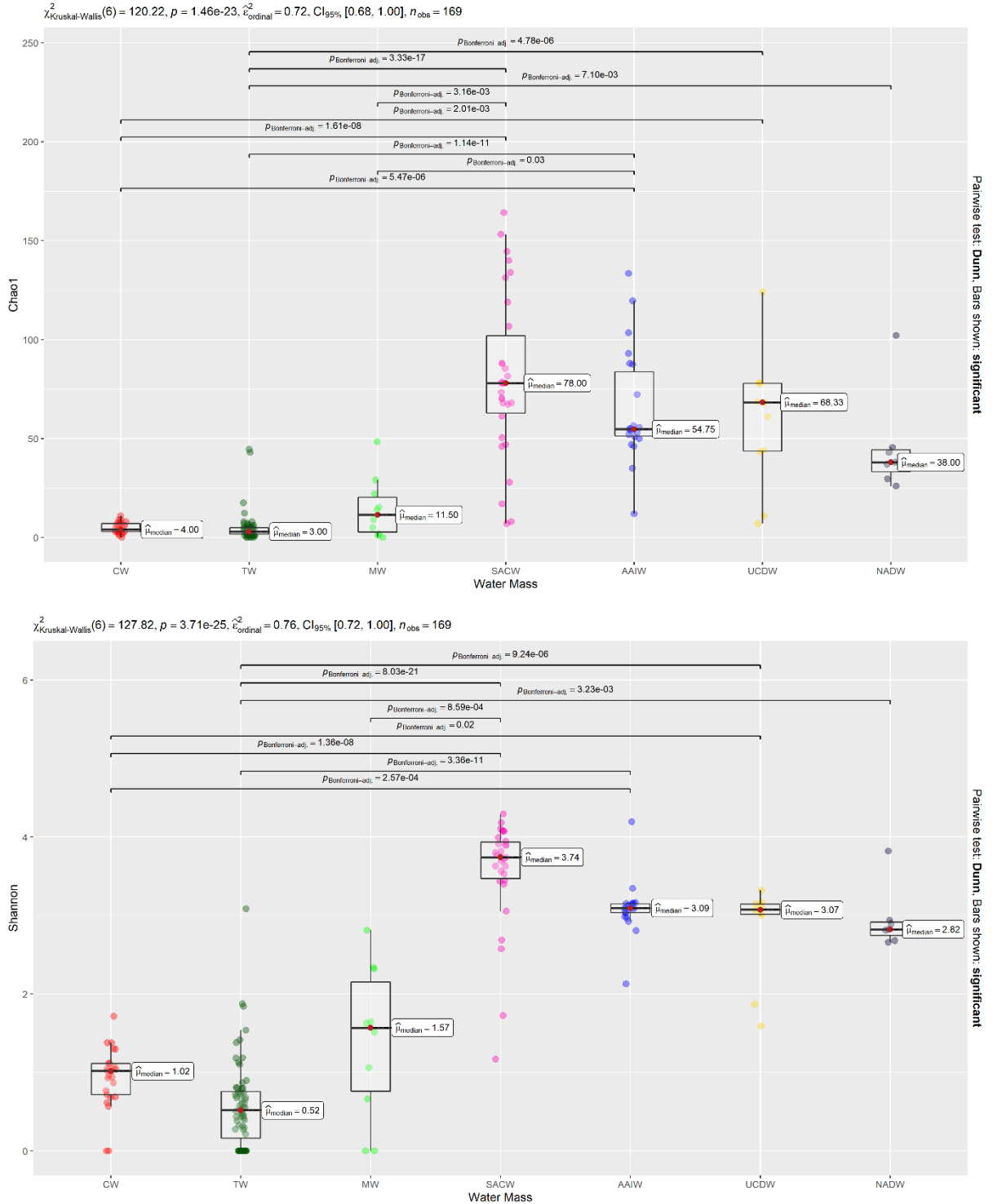
à zona epipelágica, que por sua vez foi significativamente menor em comparação a zona batipelágica.

Figura 22 – Índices de riqueza (Chao1) e de diversidade (Shannon) das comunidades de Nitrosopumilales nos diferentes estratos do sistema pelágico. Linhas horizontais mostram as diferenças significativas com o método de ajuste *Bonferroni*. Os círculos coloridos correspondem às estações coletadas em cada estrato.



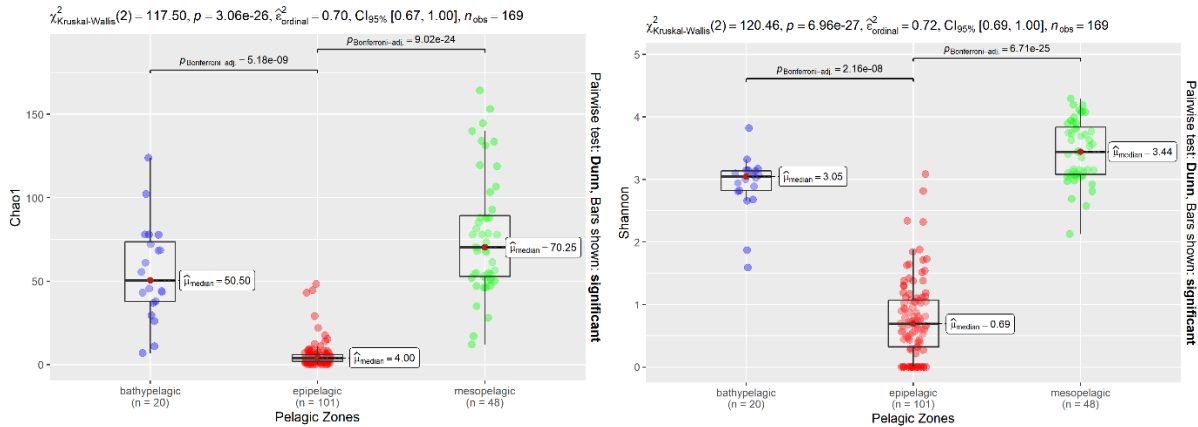
Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

Figura 23 - Índices de riqueza (Chao1) e de diversidade (Shannon) das comunidades de Nitrosopumilales nas diferentes massas de água do sistema pelágico. Linhas horizontais mostram as diferenças significativas com o método de ajuste *Bonferroni*. Os círculos coloridos correspondem às estações coletadas em cada massa de água.



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

Figura 24 - Índices de riqueza (Chao1) e de diversidade (Shannon) das comunidades de Nitrosopumilales pelas zonas pelágicas do sistema pelágico. Linhas horizontais mostram as diferenças significativas com o método de ajuste *Bonferroni*. Os círculos coloridos correspondem às estações coletadas em cada zona pelágica.



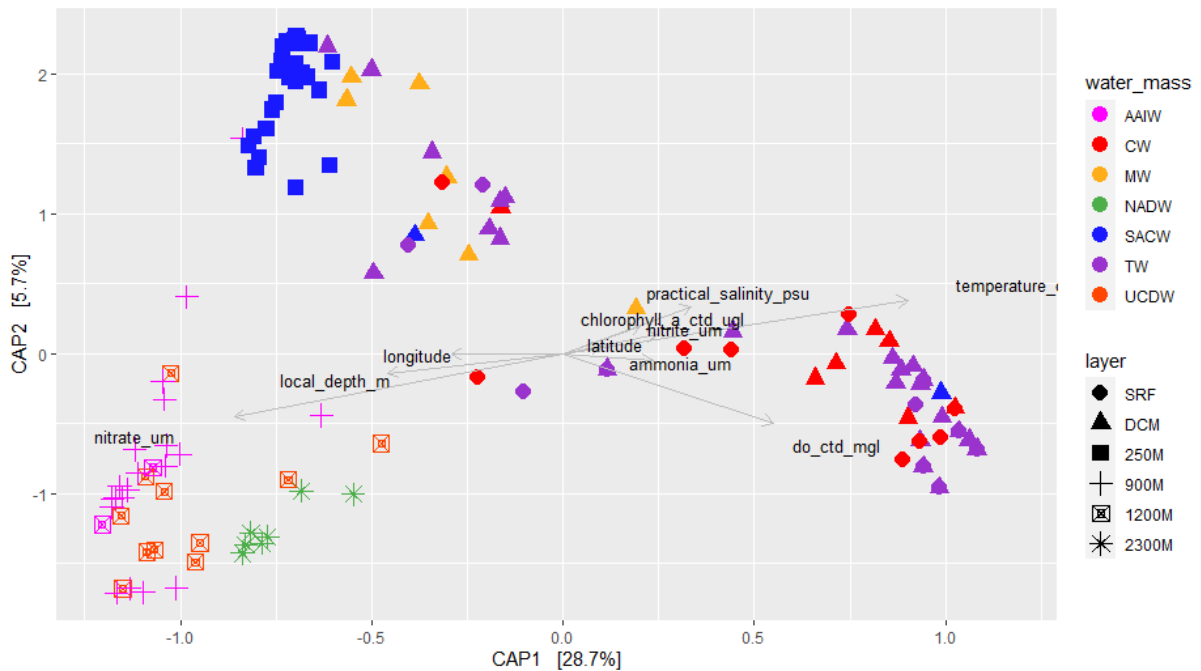
Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

A diversidade beta foi avaliada por meio da análise de PERMANOVA e do teste *betadisper*, utilizando a distância *Unifrac* não ponderado. A análise PERMANOVA indicou diferenças significativas para zonas pelágicas (epilágica, mesopelágica e batipelágica) (Adonis $R^2 = 41,837$; p-valor = 0,001), estratos (Adonis $R^2 = 28,363$; p-valor = 0,001), massas de água (Adonis $R^2 = 21,897$; p-valor = 0,001) e regiões nerítica e oceânica (Adonis $R^2 = 12,772$; p-valor = 0,001). O teste *betadisper* demonstrou que os fatores estratos, massas de água e regiões foram significativos (p-valor < 0,05) para a estrutura da comunidade dessas arqueias no ambiente. Entretanto as zonas pelágicas não apresentaram diferenças significativas para esse teste. Não foi observada diferença significativa entre transectos e a comunidade nas análises de PERMANOVA (p-valor = 0,561) e *betadisper* (p-valor = 0,925). Com isso, a estrutura da comunidade de Nitrosopumilales na coluna de água foi influenciada pelos estratos, massas de água e regiões nerítica e oceânica.

O gráfico de análise canônica de coordenadas principais (CAP) foi gerado para avaliar a interação das variáveis ambientais com a comunidade de Nitrosopumilales. O gráfico de CAP (Figura 25) demonstrou agrupamento formado pelas amostras de SRF (*surface*) e DCM (*deep chlorophyll maximum*), compostas pelas massas de água costeira (CW) e tropical (TW), contudo determinados pontos dessas amostras apresentaram maior dispersão. Esse grupo correlacionou com maiores valores de temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade, clorofila, nitrito, latitude e amônia. Foi observado um grupo possuindo as amostras dos estratos de 250 m e alguns pontos de DCM, relacionados as massas de água SACW, TW e MW. O estrato de 900 m, juntamente com 1200 m e 2300 m formaram outro agrupamento correlacionados com maiores valores de nitrato, profundidade local e longitude, abrangendo as massas de água

intermediárias e profundas (AAIW, NADW e UCDW).

Figura 25 – Análise canônica de coordenadas principais (CAP) das comunidades de Nitrosopumilales com parâmetros ambientais do sistema pelágico. A ordenação foi construída com a distância Unifrac não ponderado. A coloração foi definida pelas massas de água (*water_mass*) e as formas geométricas pelos estratos (*layer*).



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

As comunidades de AOA foram influenciadas pelo conjunto de fatores ambientais encontrados na zona epipelágica, como temperatura e oxigênio dissolvido, e na zona batipelágica, como o nitrato, além das demais parâmetros físico-químicas presentes nas massas de água. A distribuição vertical das AOA já foi ligada a variáveis como, temperatura, salinidade (VARELA et al., 2008; SHI et al., 2021), oxigênio (SANTORO et al., 2008; HOLLIBAUGH, 2017) e latitude (VARELA et al., 2008).

Ao analisar a influência das variáveis ambientais sobre a estrutura da comunidade de Nitrosopumilales percebe-se a partição das comunidades a partir dos estratos pertencentes as zonas eufótica, disfótica e afótica. Como citado anteriormente, os estratos superficiais exibiram menor abundância, riqueza e diversidade das AOA, pela possível ação da incidência de luz e a competição por substrato (ALONSO-SÁEZ et al., 2012; SMITH; CHAVEZ; FRANCIS, 2014; WU et al., 2022). Na região eufótica da Bacia de Santos foram registradas maiores concentrações dos nutrientes como, amônia e nitrito, quando comparado com as demais regiões (Figura 28). Isso se deve pela influência da pluma do rio da Prata e dos sistemas lagunares e estuarinos responsáveis pelo aporte de matéria orgânica e inorgânica para região costeira e superficial, além da ressurgência da SACW na parte norte, principalmente na região de Cabo

Frio, fertilizando a zona eufótica com nutrientes (VALENTIN; ANDRE; JACOB, 1987; BRANDINI, 1990; BRAGA et al. 2008).

A zona mesopelágica foi responsável por ter a maior abundância e diversidade desse grupo devido as suas características físico-químicas. Essa região é caracterizada pela baixa luminosidade, grande concentração de nutrientes inorgânicos e a remineralização de matéria orgânica proveniente da superfície, sendo assim constituído por uma diversidade de substratos o que possibilita a diversidade da comunidade microbiana (ROBINSON et al., 2010; BAUMAS et al., 2021). Para a zona afótica a comunidade de Nitrosopumilales teve uma abundância, riqueza e diversidade consideráveis, porém com valores abaixo da região mesopelágica. A comunidade procariótica presente na zona afótica possui adaptações para viver na ausência de luz, impossibilitando a fotossíntese, sob alta pressão hidrostática e baixas temperaturas (ACINAS et al., 2021). Essa região apresenta matéria orgânica não degradada por micro-organismos presentes nas zonas superiores formando assim a neve marinha, mas possui presença de compostos inorgânico, favorecendo assim a diversidade da comunidade microbiana e, conseqüentemente, de seu metabolismo (ARÍSTEGUI et al., 2009; ACINAS et al., 2021).

Temperatura e salinidade são os parâmetros utilizados para a caracterização de massas de água (HARARI, 2021), mas o oxigênio também pode ser usado para a identificação, como no caso da massa de água AAIW, que apresenta altas concentrações de oxigênio dissolvido, baixa salinidade e temperatura, quando comparada a UCDW pobre em oxigênio e rico em nutrientes (STRAMMA; ENGLAND, 1999; KLINCK et al., 2004; ALVES JUNIOR et al., 2015). As massas de água possuem fatores ambientais que impactam na composição da comunidade procariótica e, servem como barreira para a dispersão de micro-organismos (TEIRA et al. 2006; AGOGUÉ et al., 2011; AMANO-SATO et al., 2013). Porém como visto nos resultados de diversidade citados anteriormente, as massas de água profundas não tiveram diferença significativa, indicando uma similaridade da comunidade de Nitrosopumilales entre elas. Alves Junior e colaboradores (2015) observaram resultado semelhante na Bacia de Campos, em que massas de água profundas (SACW, AAIW e UCDW) compartilharam a composição da comunidade microbiana.

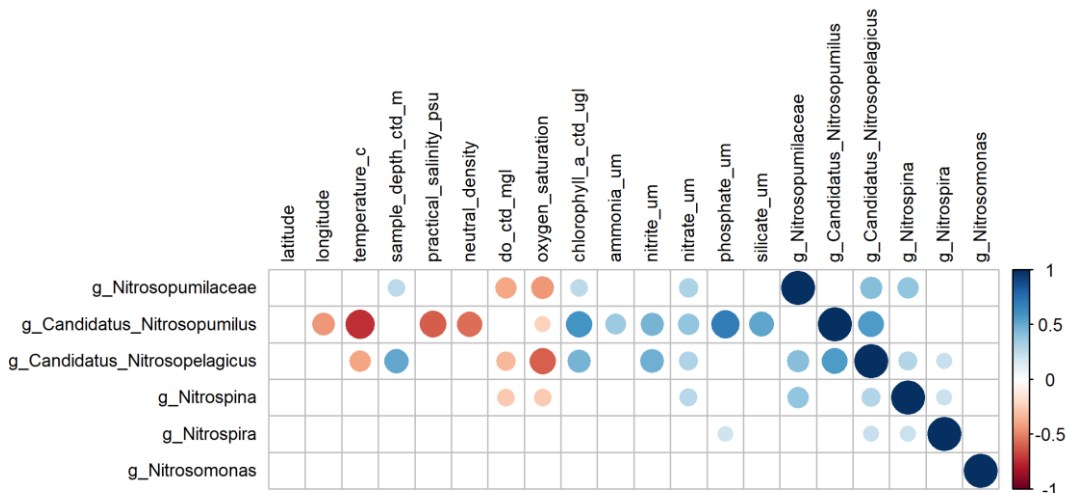
5.2.3 Correlação de Spearman de micro-organismos nitrificantes e parâmetros ambientais da coluna de água

Foi avaliada a relação entre os gêneros de arqueias pertencentes a ordem Nitrosopumilales com os gêneros de bactérias que realizam etapas da nitrificação no ciclo do nitrogênio, sendo elas *Nitrosomonas* oxidante de amônia, *Nitrospina* e *Nitrospira* oxidantes de

nitrito, juntamente com os parâmetros físico-químicos. A análise de correlação de Spearman foi visualizada por meio de gráficos divididos por zonas pelágicas: epipelágica, mesopelágica e batipelágica. Para interpretação dos dados foi considerado o coeficiente de correlação $r > 0,50$ moderado e o coeficiente $r > 0,70$ forte, respeitando o sinal de negativo (-) ou positivo (+) antes do valor. (RUMSEY, 2021).

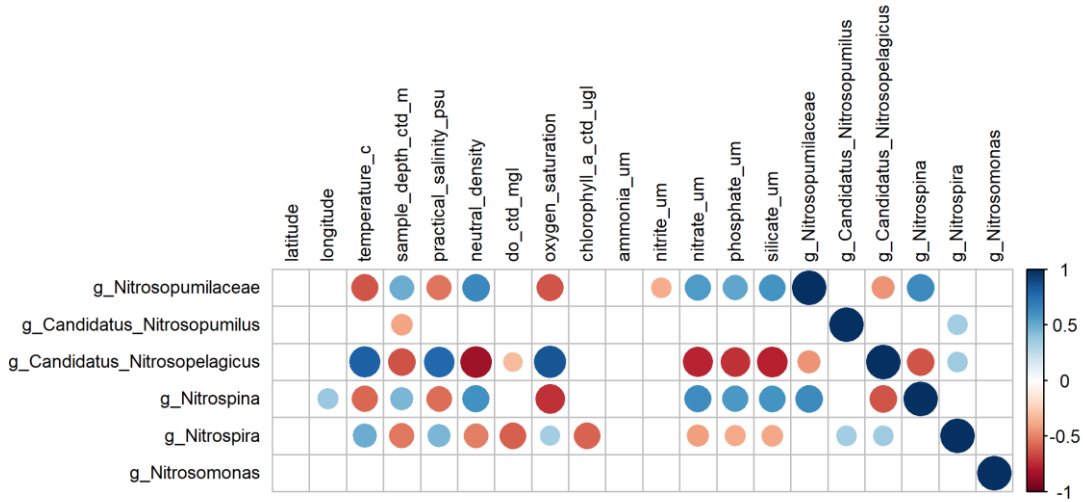
Para zona epipelágica (Figura 26), *Candidatus Nitrosopumilus* apresentou correlação positiva moderada com *Candidatus Nitrosopelagicus* e com os fatores fósforo, clorofila-a e silicato, e correlação negativa forte com temperatura ($r = -0,73$). O *Candidatus Nitrosopelagicus* exibiu correlação moderada positiva com profundidade, e negativa com oxigênio saturado. Na zona mesopelágica (Figura 27), *Candidatus Nitrosopelagicus* teve correlação positiva forte com temperatura ($r = 0,81$), salinidade ($r = 0,78$) e oxigênio saturado ($r = 0,85$), e negativa com densidade ($r = -0,84$), nitrato ($r = -0,76$), fósforo ($r = -0,72$) e silicato ($r = -0,77$). Para a zona batipelágica (Figura 28), o *Candidatus Nitrosopumilus* apresentou correlação positiva forte com profundidade ($r = 0,80$), oxigênio dissolvido ($r = 0,82$) e oxigênio saturado ($r = 0,79$), e negativa com nitrato ($r = -0,75$) e silicato ($r = -0,89$). Para o *Candidatus Nitrosopelagicus* há correlação positiva moderada com nitrato, e negativa forte com salinidade ($r = -0,77$).

Figura 26 – Correlação de Spearman entre gêneros de AOA, bactérias nitrificantes e fatores ambientais na zona epipelágica. Correlações positivas estão marcadas em azul e negativas em vermelho. O tamanho do círculo é proporcional ao valor do coeficiente r . O eixo vertical representa a variação dos valores do coeficiente r .



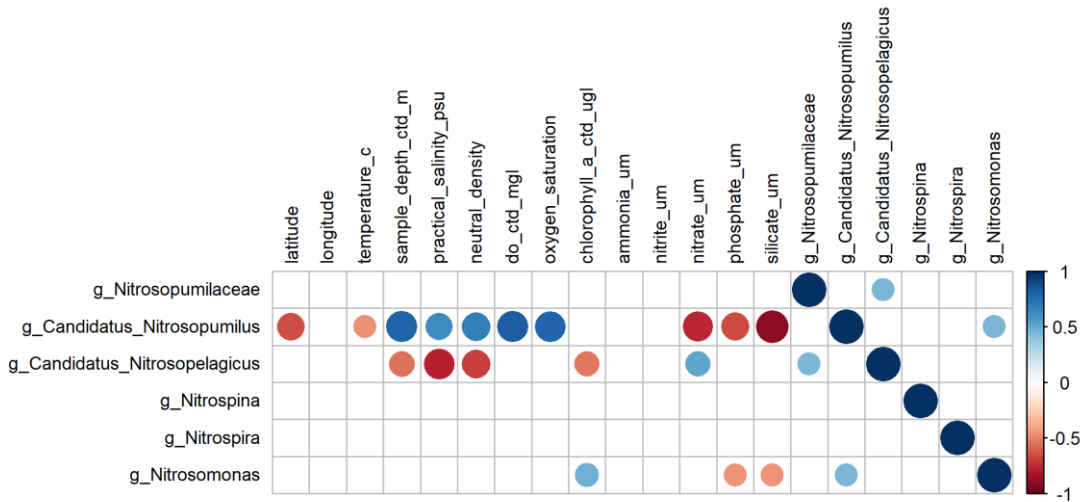
Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

Figura 27 – Correlação de Spearman entre gêneros de AOA, bactérias nitrificantes e fatores ambientais na zona mesopelágica. Correlações positivas estão marcadas em azul e negativas em vermelho. O tamanho do círculo é proporcional ao valor do coeficiente r . O eixo vertical representa a variação dos valores do coeficiente r .



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

Figura 28 – Correlação de Spearman entre gêneros de AOA, bactérias nitrificantes e fatores ambientais na zona batipelágica. Correlações positivas estão marcadas em azul e negativas em vermelho. O tamanho do círculo é proporcional ao valor do coeficiente r . O eixo vertical representa a variação dos valores do coeficiente r .



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

Nitrato, fosfato e silicato apresentaram correlações negativas fortes com *Candidatus Nitrosopelagicus* e *Ca. Nitrosopumilus*, nas zonas mesopelágica e batipelágica, respectivamente. Semedo e colaboradores (2021) observaram perfil semelhante relacionado ao nitrato com os mesmos gêneros. Em relação aos três fatores citados anteriormente, nos estratos abaixo da DCM foi observado a crescente concentração de nitrato, fosfato e silicato (Figura 28), podendo ser indício da remineralização da matéria orgânica. Esse mesmo padrão hidroquímico foi observado por Braga e colaboradores (2008) na região costeira mais ao sul do

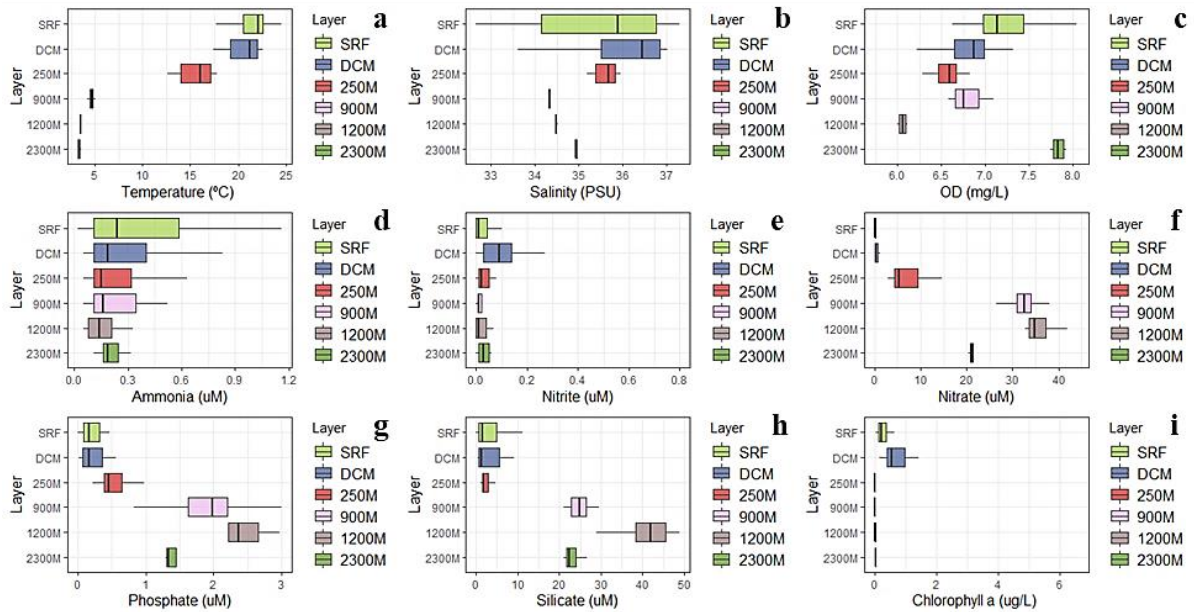
Brasil e por Damashek e colaboradores (2018) na costa litorânea da Georgia (EUA).

Temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido apresentaram as maiores concentrações na zona epipelágica (Figura 29), entretanto as correlações observadas com os gêneros de AOA nessa região foram negativos. *Ca. Nitrosopumilus* foi correlacionado negativamente com as águas quentes da região eufótica (SILVEIRA et al., 2000; HARARI, 2021), mesmo apresentando os maiores valores de abundância relativa nesta zona. Porém espécies do gênero *Nitrosopumilus* exibem uma variação térmica de 4 à 37°C (QIN et al., 2017b; BAYER et al., 2019), fazendo com que esse gênero esteja presente em estratos da superfície até o estrato de 2300m.

Mesmo não tendo correlação significativa entre o amônio e os gêneros de AOA, a concentração de amônio é um importante fator para a definição dos ecótipos, já descritos no item 5.2.1, além de, classificar outros tipos de AOA, sendo eles: *high ammonia concentration* AOA (HAC-AOA) e *low ammonia concentration* AOA (LAH-AOA) (SINTES et al., 2013; SINTES et al., 2016). HAC são arqueias que apresenta maior abundância em locais com alta concentração de amônio, sendo associada taxonomicamente ao tipo WCA, e LAC são arqueias dominantes em baixas concentrações de amônio, normalmente encontradas em regiões profundas, e são associadas ao tipo WCB (SINTES et al., 2013; SINTES et al., 2016; MÜLLER et al., 2018).

Já *Candidatus Nitrosopelagicus* foi relacionado positivamente com a temperatura na zona mesopelágica, principalmente no estrato de 250 m, influenciado pela massa de água SACW (6 a 20°C) (SILVEIRA et al., 2000; HARARI, 2021). Porém na zona batipelágica teve correlação negativa forte, essa por sua vez exibe baixas temperaturas, de 2 à 6°C (HARARI, 2021). A espécie *Nitrosopelagicus brevis* possui uma faixa de crescimento entre 10 à 35°C, com temperatura ótima à 22°C (SANTORO et al., 2015), explicando o decréscimo na abundância desse gênero nessas regiões. Em relação a salinidade, *Ca. Nitrosopelagicus* exibiu correlação positiva forte na zona mesopelágica, que apresentou maior salinidade (~36 psu) dentre as águas profundas (Figura 29). Na literatura AOA são comumente relacionadas a ambientes com baixa salinidade (< 26 psu) (MOSIER et al., 2012; SHI et al., 2021). O oxigênio apresentou correlação positiva com *Candidatus Nitrosopelagicus* e *Ca. Nitrosopumilus*, sobretudo nas zonas mesopelágica e batipelágica. Esse fator está entre as variáveis que interferem na abundância de AOA no ambiente pelágico (TOLAR; KING; HOLLIBAUGH, 2013). Estudos mostram a capacidade de AOA de oxidar amônia em baixas concentrações de oxigênio (MARTENS-HABBENA et al., 2009; QIN et al., 2017a).

Figura 29 – Perfil dos parâmetros físico-químicos nos estrato da coluna de água da Bacia de Santos: temperatura (a), salinidade (b), oxigênio dissolvido (c), amônia (d), nitrito (e), nitrato (f), fosfato (g), silicato (h) e clorofila-a (i).



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi analisada a comunidade de arqueias oxidantes de amônia da Bacia de Santos em amostras de sedimento e da coluna de água por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Com os resultados foi possível concluir que:

- As arqueias oxidantes de amônia foram o grupo de arqueias dominante na Bacia de Santos, indicando sua versatilidade em ocupar o ambiente marinho. Em ambos sistemas, o aumento da abundância das AOA foi concomitante ao aumento da profundidade, demonstrando estratégias adaptativas que permitem habitar a região profunda.
- O padrão de distribuição dos gêneros no sedimento, *Candidatus Nitrosopumilus* e os não-classificados foram predominantes em toda bacia. No sistema pelágico, *Candidatus Nitrosopelagicus* e *Candidatus Nitrosopumilus* foram dominantes na superfície, e em regiões profundas, os não-classificados. A alta prevalência de gêneros não-classificados nas amostras profundas de ambos os ambientes mostra a importância de mais estudos para descrever e caracterizar as espécies dessa região para melhor compreender a diversidade microbiana e a contribuição ecológica para esse habitat.
- Profundidade e massas de água foram fatores importantes para estruturação da comunidade das arqueias oxidantes de amônia nos sistemas bentônico e pelágico. Evidenciando a influência que o conjunto de variáveis ambientais tem sobre a definição da comunidade microbiana marinha.
- Este trabalho apresenta a primeira descrição exclusiva à comunidade de arqueias oxidantes de amônia na Bacia de Santos, colaborando para expandir o conhecimento dessas arqueias no Oceano Atlântico Sudoeste. Além disso, para estudos futuros sugere-se, a realização do perfil funcional das AOA, e também a avaliação da distribuição a partir dos ecótipos das arqueias oxidantes de amônia.

CAPÍTULO 2 - Cultivo de arqueias oxidantes de amônia nas amostras de água do Estuário de Cananéia

7 OBJETIVO

7.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo obter culturas de arqueias oxidantes de amônia provenientes do sistema estuarino Cananéia-Iguapé pertencente à Bacia de Santos;

7.2 Objetivo específico

- Desenvolver cultivos por enriquecimento da água do estuário de Cananéia;
- Analisar o sucesso do enriquecimento investigando a composição da comunidade microbiana presente por meio de sequenciamento do gene 16S rRNA;
- Otimizar as condições de cultivo testando diferentes tratamentos;
- Descrever o perfil funcional da comunidade enriquecida utilizando sequenciamento metagenômico;
- Fazer a caracterização genômica de uma AOA enriquecida nos cultivos;

8 MATERIAIS E MÉTODOS

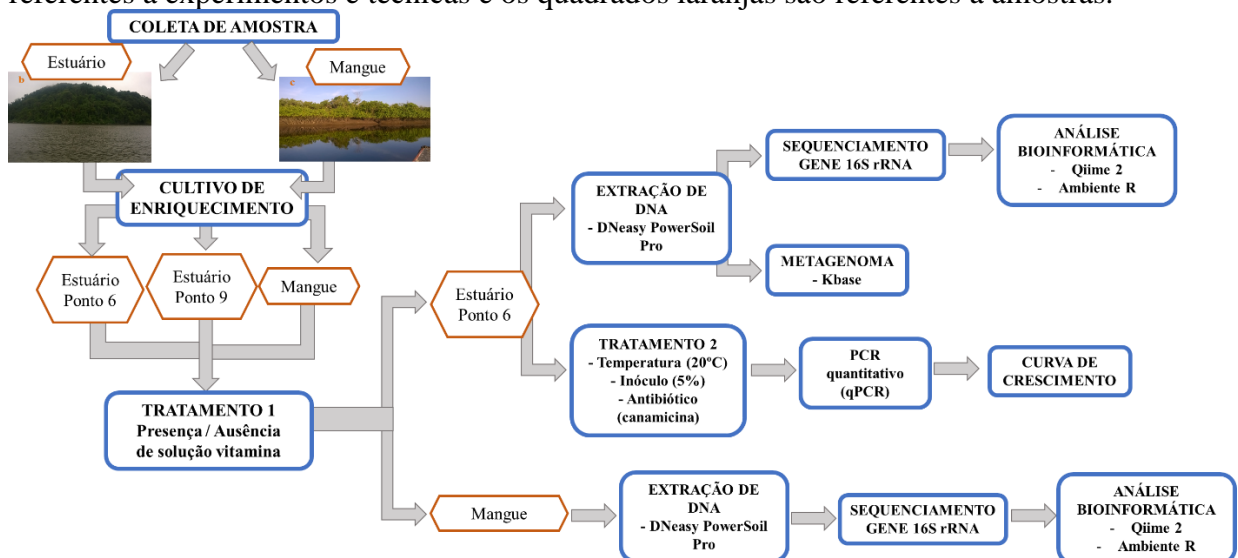
8.1 Área de coleta

O sistema estuarino Cananéia-Iguapé está localizado na costa sul do estado de São Paulo, com extensão de 110 km. A Área é composta pelas ilhas Iguape, Comprida, Cardoso e Cananéia e possui uma área coberta por vegetação de mangue de aproximadamente 150km² (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2001; ARA, 2004; ROVAI et al., 2020). O sistema é conectado ao Atlântico Sul pelas enseadas de Icapara ao norte e Cananéia ao sul. Em 1999 foi reconhecida pela UNESCO como uma área de proteção ambiental. A região possui importância por ser berço de diversas espécies marinhas e terrestres e por possuir uma diversidade de ecossistemas, como manguezais, estuários, canais lagunares, bancos de areias e rios (MARCONDES, 2017; PRADO et al., 2019).

8.2 Desenho experimental

Para alcançar os objetivos propostos para este capítulo, o desenho experimental combinou diversas técnicas, incluindo cultivo por enriquecimento, tratamentos para otimizar as condições de cultivos em relação ao protocolo padrão (descrito a seguir), extração de DNA, sequenciamento do gene 16S rRNA, PCR quantitativo, curva de crescimento e metagenoma, conforme descrito no fluxograma a seguir (Figura 30).

Figura 30 - Fluxograma da metodologia empregada no estudo. Os quadrados azuis são referentes a experimentos e técnicas e os quadrados laranjas são referentes a amostras.



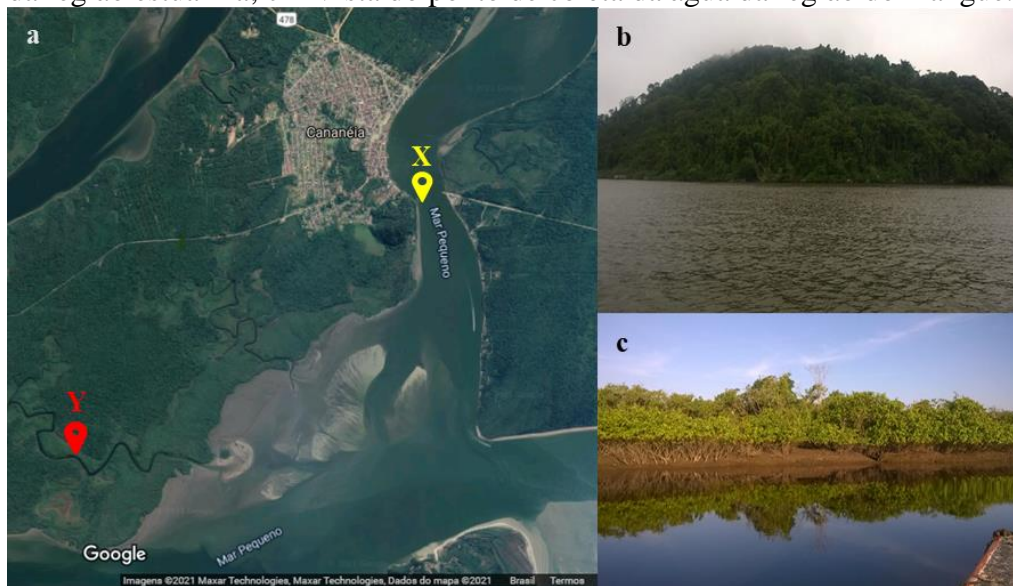
Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

8.3 Amostras

A coleta foi realizada no estuário de Cananéia, com apoio do Instituto Oceanográfico

(IO-USP) e a Base de Pesquisa “Dr. João de Paiva Carvalho”. Amostras de água foram coletadas em dois pontos de estuário (Figura 31), utilizando garrafas de Nansen nas profundidades de 0 m (superfície), 8 m (meio) e 14 m (fundo). Adicionalmente, uma amostra de água foi coletada na área de mangue, na profundidade de 0-5 cm. Todas as amostras foram armazenadas a 4°C até inoculação (Quadro 2).

Figura 31 – Imagem de satélite da cidade de Cananéia. a – Mapa da região da cidade de Cananéia, ícone amarelo (X) indica Mar Pequeno, local da coleta de água no estuário, o ícone vermelho (Y) indica o local da coleta de água do mangue; b – Vista do ponto de coleta da água da região estuarina; c – Vista do ponto de coleta da água da região do mangue.



Fonte: a – Google Maps, 2021; b e c Fonte: Alice de Moura Emílio, 2019.

Quadro 2 – Descrição das amostras coletadas na área do Estuário de Cananéia.

Identificação	Código	Local	Amostra	Data
Mangue	MAN	Mangue - Cananéia	água	11/06/2019
Ponto 6-superfície	#6S	Estuário Cananéia	água	13/06/2019
Ponto 6-meio	#6M	Estuário Cananéia	água	13/06/2019
Ponto 6-fundo	#6F	Estuário Cananéia	água	13/06/2019
Ponto 9-superfície	#9S	Estuário Cananéia	água	13/06/2019
Ponto 9-meio	#9M	Estuário Cananéia	água	13/06/2019
Ponto 9-fundo	#9F	Estuário Cananéia	água	13/06/2019

Fonte: Alice de Moura Emílio, 2019.

8.4 Meio de cultura, condições de cultivo e acompanhamento de crescimento por quantificação de parâmetros químicos

O cultivo por enriquecimento foi realizado em 20 mL de meio basal *Fresh Water* na concentração de 1x (JUNG et al., 2011), contendo de tampão HEPES (10 mM), bicarbonato de sódio (0,2 mM), cloreto de amônio (0,5 mM), FeNaEDTA (7,5 µM), elementos traços (20 µL) e solução de vitaminas (20 µL). A descrição da composição das soluções do meio basal *Fresh*

Water, do elemento traço e da vitamina estão nas tabelas do anexo 1. As diferentes soluções foram preparadas, esterilizadas e estocadas separadamente, como descrita por Tourna e colaboradores (2011), e combinadas no dia de inoculação. Após combinar as soluções estoque, o meio de cultivo pronto foi filtrado em filtro 0,22 µm e armazenado em tubo de polipropileno. Um volume de 2 mL (10% referente ao volume total do cultivo) de amostras de água foi empregado para inóculo. Os meios inoculados foram incubados no escuro, em aerobiose, sem agitação à 26°C, sendo esta a condição padrão de incubação dos cultivos.

Tabela 2.1 – Concentrações do meio de cultura *Fresh Water* e suplemento.

Reagente/Solução	Concentração final	Volume final
Meio <i>Fresh Water</i>	1x	20 mL
Tampão HEPES	10 mM	200 µL
Bicarbonato de sódio	0,2 mM	40 µL
FeNaEDTA	7,5 µM	20 µL
Cloreto de amônia	0,5 mM	10 µL
Solução de elemento traço	1:1000 v/v	20 µL
Solução de vitamina	1:1000 v/v	20 µL

Fonte: Alice de Moura Emílio, 2019.

Como controle positivo foi utilizada a cultura de *Nitrososphaera viennensis*, obtida no *Archaea Biology and Ecogenomics Unit* (Universidade de Viena, Áustria). *N. viennensis* foi cultivada em meio *Fresh Water*, como descrito acima, com as seguintes modificações: cloreto de amônio na concentração de 1 mM; adição de piruvato de sódio e o antibiótico sulfato de canamicina (0,2mg/ml); inóculo de 0,1% (200 µL). O tempo de incubação foi de duas semanas, à 37°C no escuro, em aerobiose e sem agitação.

O crescimento dos micro-organismos oxidadores de amônia foi monitorado a cada duas semanas por meio da determinação de concentração de amônio (KANDELER; GERBER, 1988), de nitrito e nitrato (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). Essas determinações foram baseadas em métodos colorimétricos (Anexo 2) e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro Denovix DS-11 FX (DeNovix Inc.).

8.5 Tratamentos e curva de crescimento

Como apresentado na figura 29, algumas variações nas condições de cultivo foram realizadas em diferentes momentos, ao longo do processo de enriquecimento. As seguintes condições foram testadas:

1. Presença e ausência de solução de vitaminas;
2. Redução da temperatura de incubação de 26°C para 20°C;
3. Redução da concentração do inóculo de 10% para 5%;

4. Adição de antibiótico canamicina (0,1 mg/mL) na presença de piruvato de sódio;

Essas modificações foram realizadas com intuito de promover o enriquecimento de arqueias oxidadoras de amônia, de acordo com a literatura, e o princípio de cada modificação será detalhada na sessão de resultados e discussão.

Em estágios avançados de enriquecimento, foi realizado um experimento com culturas selecionadas para obter a curva de crescimento, como demonstrado no esquema da figura 30. Os experimentos ocorreram em triplicata. O crescimento foi monitorado por quantificação das concentrações de amônio, nitrato e nitrito a cada três dias. Além das culturas de enriquecimento, foram realizados também controles: positivo (*N. viennensis*) e negativo (sem inóculo), em triplicata.

8.6 Extração de DNA

Para extração de DNA, 4 ml de cultura foram centrifugadas por 30 minutos a 4°C à 14000 rpm e, após descarte do sobrenadante, os precipitados de células foram armazenados a -80°C até o momento da extração. A extração foi realizada utilizando o kit *DNeasy PowerSoil Pro* (Qiagen-Thermo Fisher), com as seguintes modificações do protocolo: não foram utilizadas as esferas para rompimento das células, e o tempo no aparelho disruptor foi diminuído de 10 para 2 minutos. Após a extração, o DNA foi quantificado no Qubit 4 (Invitrogen-Thermo Fisher), utilizando o *Qubit dsDNA HS Assay kit* (Invitrogen-Thermo Fisher). A qualidade foi analisada por espectrofotômetro, utilizando o equipamento Denovix DS-11 FX (DeNovix Inc.), e o DNA extraído foi armazenado a -20°C.

8.7 Sequenciamento do gene 16S rRNA e análise bioinformática

Para verificação da diversidade microbiana presente nos cultivos do ponto 6-fundo e mangue, e para a avaliação do progresso do enriquecimento, foi feito o sequenciamento do gene 16S rRNA na plataforma Illumina Miseq com método *paired-end* 2x 250bp, utilizando os primers 515F 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3', 926R 5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3' (QUINCE et al., 2011; PARADA; NEEDHAM; FUHRMAN, 2015). O sequenciamento foi realizado pela empresa *Zymo Research*, utilizando o protocolo descrito no item 4.1.4. A análise do sequenciamento foi feita através da plataforma Qiime 2, versão 2020.8 (BOLYEN et al., 2019), e a análise estatística no ambiente R (R CORE TEAM, 2018), como descrito no item 3.1.3.

8.8 PCR quantitativo

A quantificação dos genes *amoA* e 16S rRNA, empregando a técnica de PCR quantitativo foi utilizada para avaliar estratégia de cultivo que mais beneficiou o enriquecimento de AOA. Para a realização desse método foram utilizados o DNA do cultivo ponto 6-fundo, na condição padrão de incubação, e dos tratamentos descritos no item 8.5. A técnica foi realizada no equipamento *QuantStudio 3* (Applied Biosystems), com o volume total da reação 10 μ L, sendo a concentração final do mix de 1X de Power Sybr Green (ThermoFischer Scientific), 0,2 mg/ml BSA, 0,9 μ L água estéril, 1 μ M primer *Forward*, 1 μ M primer *Reverse* e 2 μ L de DNA.

Para a amplificação do gene *amoA* de arqueias foram usados os primers Arch *amoA1F* (STAATGGTCTGGCTTAGACG) e Arch *amoA2R* (GCGGCCATCCATCTGTATGT) (FRANCIS et al., 2005). As condições de amplificação de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 40 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, e a curva de *melting* (desnaturação) com modo *Step and hold*, 95°C por 15 segundos, 57°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos com dissociação 0,7°C/s. Para o gene 16S rRNA os primers utilizados foram 515FY (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) e 806R (GGACTACVSGGGTATCTAAT) (QUINCE et al., 2011; CAPORASO et al., 2011). A curva de amplificação foi realizada com a desnaturação inicial 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 40 segundos, 50°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e a curva de *melting* no modo *Continuous*, 95°C por 15 segundos; 60°C por 1 minuto; 95°C por 15 segundos com dissociação 0,5°C/s.

A quantificação dos genes nas amostras foi realizada por curva de regressão contra a curva padrão para cada gene analisado. A curva padrão foi construída utilizando produtos de PCR obtidos a partir de amplificações dos respectivos genes da cultura *Nitrososphaera vienenses*. Os fragmentos foram purificados utilizando o kit *PureLink* (Invitrogen) e diluídos por diluição seriada no fator de 1:10. Para a curva foi utilizado seis pontos em triplicatas nas seguintes concentrações: gene *amoA* de 10⁻¹ a 10⁻⁶, e gene 16S rRNA de 10⁻³ a 10⁻⁸. Foram realizados também controles negativos para cada experimento. Para determinar o número de cópias do gene de interesse nas amostras foi utilizado os valores de Cts (*cycle threshold*) obtidos em cada reação e a quantidade de DNA nas amostras. A eficiência da amplificação e correlação logarítmica foi obtido automaticamente do equipamento.

8.9 Metagenoma

Os resultados de sequenciamento do gene 16S rRNA apontaram que houve enriquecimento de arqueias oxidadoras de amônia no cultivo da amostra do ponto 6-fundo, em condição padrão de incubação (ver resultados para mais informações). Após essa confirmação, esse cultivo foi selecionado para análise metagenômica. O DNA foi extraído e quantificado como descrito no item 8.6. O sequenciamento do DNA foi realizado na plataforma Illumina NextSeq 2x100, com a cobertura de 50 milhões de clusters, pela empresa NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, São Paulo).

Os dados do sequenciamento do metagenoma foram analisados na plataforma *web* Kbase (ARKIN et al., 2018). A qualidade do sequenciamento foi verificada por *Assess Read Quality with FastQC* v. 0.11.5 e, em seguida, as sequências foram cortadas por *Trim Reads with Trimmomatic* v. 0.36 (BOLGER; LOHSE; BJÖRN, 2014) e a qualidade analisada novamente. A predição taxonômica das sequências foi realizada com o aplicativo *Classify Taxonomy of Metagenomic Reads with Kaiju* v. 1.7.3 (MENZEL; KIM; KROGH, 2016).

A montagem das sequências em *contigs* foi executada empregando os seguintes programas: *MEGAHIT* v. 1.2.9 (parâmetros *meta-sensitive* e *meta-large*) (LI et al., 2015); *IDBA-UD* v.1.1.3 (PENG et al., 2012); *HydridSPAdes* v.3.13.0 (parâmetros *standard* e *metagenomic*) (ANTIPOV et al., 2016); *MetaSpades* v. 3.13.0 (NURK et al., 2017). Para a escolha do melhor resultado foram levadas em consideração as principais informações, como o número de *contigs* e os valores de N50 e L50, além da qualidade dos *contigs* sendo feita a comparação dos diferentes montadores utilizando os aplicativos *QUAST* v. 4.4 (GUREVICH et al., 2013) e *Compare Assembled Contig Distributions* v. 1.1.2.

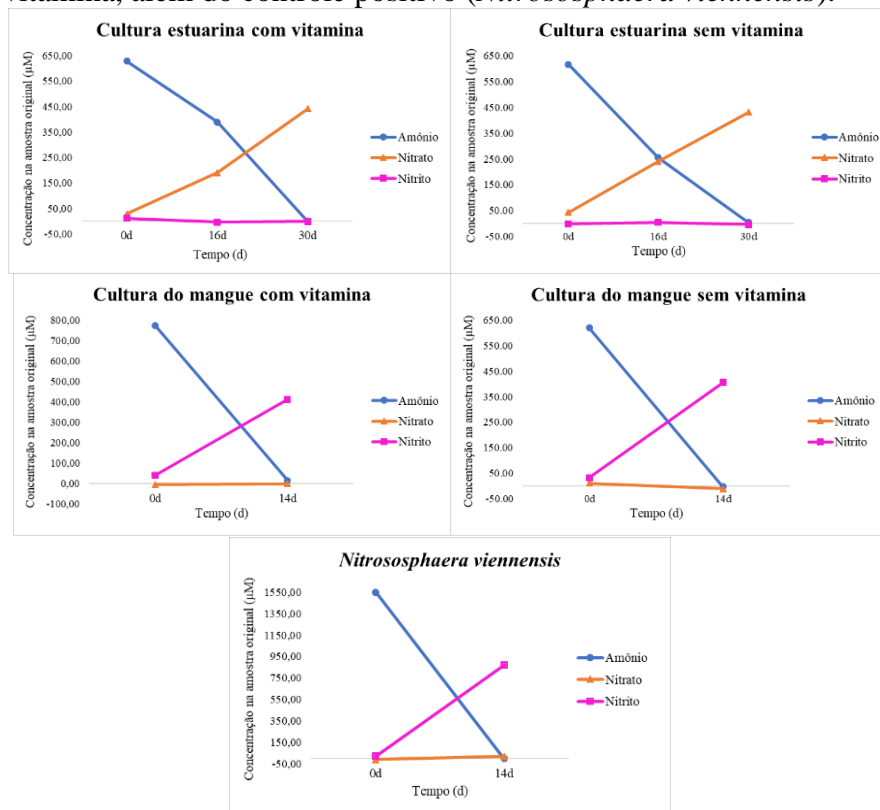
Os agrupamentos dos *contigs* em *bins* (ou genomas) foram realizados com os diferentes montadores *MaxBin2* v.2.2.4 (WU; SIMMONS; SINGER, 2016), *CONCOCT* v. 1.1 (ALNEBERG et al., 2014), *MetaBAT* v. 1.7 (KANG et al., 2015), e otimizador *DasTool* v. 1.1.2 (parâmetros *diamond* e *blast*) (SIEBER et al., 2018). A qualidade dos genomas foi verificada com *Assess Genome Quality with CheckM* v. 1.0.18 (PARKS et al., 2015), gerando os valores de completude e contaminação, genes marcadores presente com uma única cópia no genoma, além de prover uma identificação taxonômica aproximada. O programa *CheckM* foi utilizado como o fator de escolha para o melhor resultado dentre os montadores de *bins*. Para a taxonomia dos genomas foi utilizado o *Classify Microbes with GTBD-tk* v. 1.7.0, release 202 (CHAUMEIL et al., 2019; PARKS et al., 2020). Os genomas montados no *DasTool* com o parâmetro *blast* foram extraídos pelo *Extract bins as assemblies from binned contigs* v. 1.0.2.

A anotação funcional foi feita utilizando os seguintes programas: *Annotate and Distill Assemblies with DRAM* v. 0.0.2 (SHAFFER et al., 2020), *Annotate Microbial Assemblies with RASTtk* v. 1.073 (BRETTIN et al., 2015) e *Annotate Assembly and Re-annotate Genomes with PROKKA* v. 1.14.5 (SEEMANN, 2014). O perfil funcional do metagenoma total foi gerado pelo aplicativo *Run Fama Read Profiling* v. 1.1, utilizando os bancos de dados das enzimas ativas de carboidratos e do ciclo do nitrogênio. As árvores filogenéticas de bactérias e arqueias foram criadas utilizando o programa *Insert genome into speciestree* v. 2.2.0, com o resultado da anotação feita pelo RAST.

Após a análise geral do metagenoma, o genoma de arqueia denominado *bin 27* foi analisado em maior profundidade. Com ele foi realizada a reconstrução do mapa das vias metabólicas pela ferramenta web *Kegg Mapper - Reconstruct* (KANEHISA; SATO; KAWASHIMA, 2022). O perfil funcional foi anotado pelo *Run Fama Genome Profiling* v. 1.1.1, utilizando os bancos de dados das enzimas ativas de carboidratos e do ciclo do nitrogênio.

Além disso, foi realizada a análise de genômica comparativa do bin de arqueia, Bin.27, com os genomas obtidos do banco de dados *GenBank* (BENSON et al., 2013), *Nitrosarchaeum AC2* (NZ_CP030847), *Candidatus Nitrosarchaeum limnia* SFB1 (CM001158.1), *Nitrosarchaeum koreenses MY1* (GCF_000220175.1), *Candidatus Nitrosarchaeum limnia* BG20 (GCA_000241145.2) e *Nitrosopumilus sp. SJ* (GCF_000328945.1). A escolha dos genomas citados acima foi baseada no resultado da árvore filogenética. As ferramentas web usadas para comparação foram os índices de similaridade de nucleotídeos e aminoácidos, *Average nucleotide identity - ANI* e *Average aminoacid identity - AAI* (RODRIGUEZ; KONSTANTINIDIS, 2014), e a hibridização DNA-DNA utilizando *Genome to genome Distance - GGDC*, versão 3.0 (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013).

Figura 33 – Gráfico da transformação do nitrogênio pela determinação de amônio, nitrato e nitrito pelo tempo em dias, dos cultivos do ponto 6-fundo e mangue com solução de vitamina e sem solução vitamina, além do controle positivo (*Nitrososphaera viennensis*).

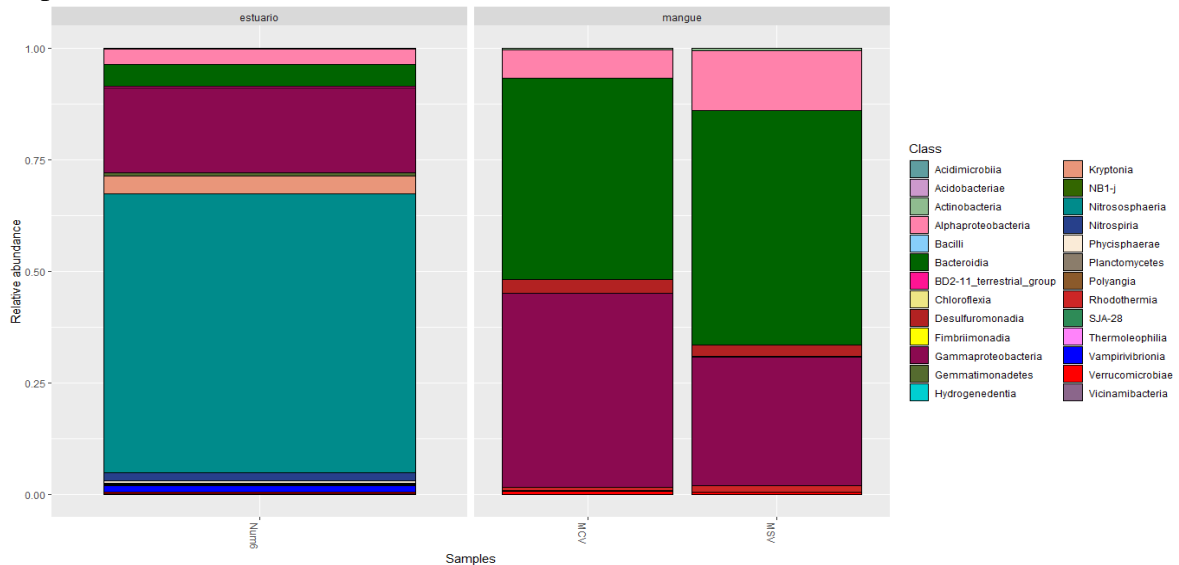


Fonte: Alice de Moura Emílio, 2020.

9.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA

Para investigar a composição das comunidades dos enriquecimentos, após 11 meses de repiques sucessivos, foi realizado o sequenciamento do gene 16S rRNA dos cultivos de enriquecimentos do mangue (com e sem solução de vitamina) e do ponto 6-fundo com solução vitamina. O resultado do sequenciamento mostrou que as culturas de mangue com e sem vitamina apresentaram uma comunidade muito semelhante, com alterações na abundância de alguns grupos. As classes dominantes nessas culturas foram Bacteroidia, Gammaproteobacteria e Alphaproteobacteria, não havendo a presença de arqueias nessas comunidades (Figura 34). Já na cultura ponto 6-fundo, denominada estuário, teve como classe dominante Nitrososphaeria, que abrange as arqueias oxidantes de amônia, seguida da Gammaproteobacteria, além da classe Nitrospira, grupo de bactérias que possui táxons oxidadoras de nitrito (Figura 34). As classes dominantes de Bacteria na cultura foram dominantes também no ambiente *in situ* do mangue, principalmente no sedimento, como demonstrado por Luo e colaboradores (2021). No estuário as arqueias oxidantes de amônia (ZOU; LIU; LI, 2020), e as bactérias Bacteroidia, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Nitrospira foram predominantes na água e sedimento desse ecossistema (ZHANG et al., 2014).

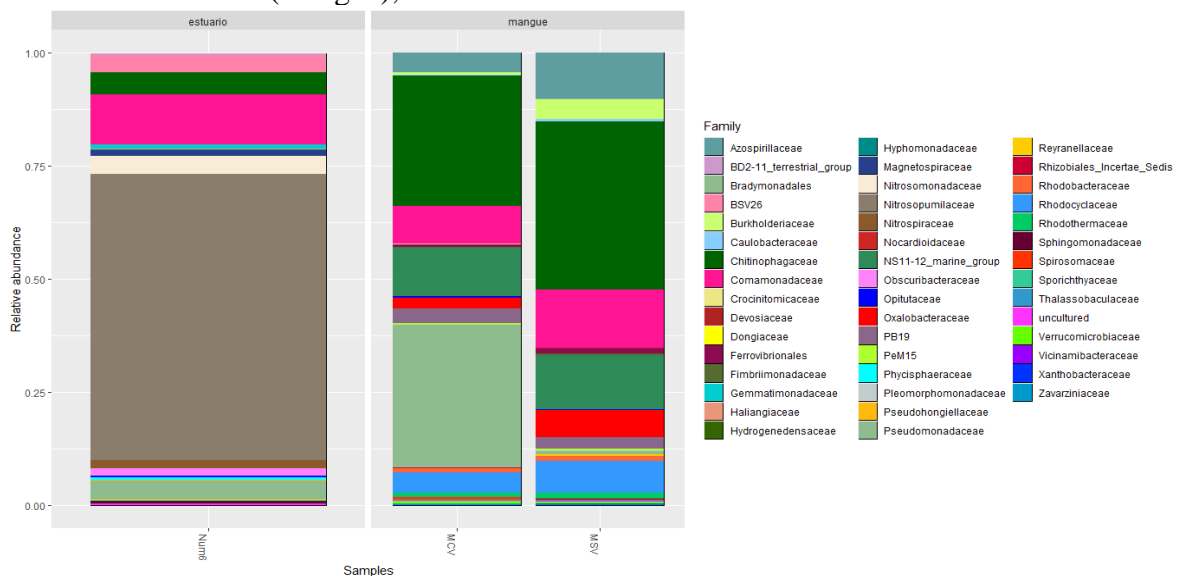
Figura 34 – Gráfico de abundância relativa em nível taxonômico de classe dos cultivos ponto 6-fundo (estuário, Num6) e mangue com e sem vitamina (mangue, MCV e MSV), respectivamente.



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2020.

No nível taxonômico de família, o resultado da amostra estuarina ponto 6-fundo teve a presença de Nitrosopumilaceae e Nitrosomonadaceae, arqueia e bactéria oxidante de amônia, respectivamente, e de Nitrospiraceae, que inclui bactérias oxidantes de nitrito. Nitrosopumilaceae correspondeu a cerca de 63% de toda a comunidade, já a Nitrosomonadaceae a aproximadamente 4%, e Nitrospiraceae a quase 2% (Figura 35). As culturas de mangue tiveram a predominância das famílias Chitinophagaceae, Comamonadaceae e NS11-12-marine-group.

Figura 35 – Gráfico de abundância relativa dos cultivos do ponto 6-fundo (estuário), mangue com e sem vitamina (mangue), no nível taxonômico de família.



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2020.

A presença de Nitrospiraceae pode justificar a ausência da concentração de nitrito observada nas medições dos parâmetros químicos do cultivo ponto 6-fundo, provavelmente pelo rápido consumo do substrato por esse micro-organismo. Fussel e colaboradores (2011) descreveram na plataforma oceânica da Namíbia altas taxas de oxidação de nitrito, no entanto as bactérias oxidadoras de nitrito apresentaram baixa abundância oceano, indicando a eficiência desse grupo de bactérias na oxidação do nitrito ou a presença de outros organismos nesse processo. Como relatado por Kim e colaboradores (2021), as arqueias oxidantes de amônia possuem interações com diversos organismos, sendo com as bactérias oxidantes de nitrito uma relação obrigatória devido à disponibilidade de substrato que as arqueias fornecem a elas. Além dessa relação, a Nitrospiraceae promove a retirada do nitrito do ambiente que, em altas concentrações, juntamente com pH baixo, em alguns casos, se mostrou tóxico para bactérias e arqueias oxidantes de amônia (STEIN; ARP, 1998; LEHTOVIRTA-MORLEY et al., 2013).

As culturas do mangue apresentaram predominância de bactérias heterotróficas, algumas sendo fixadoras de nitrogênio como, Azospirillaceae (LAVRINENKO et al., 2010), Xanthobacteraceae (OREN, 2014a) e Rhodocyclaceae (OREN, 2014b). Outra função de destaque realizada foi a redução de nitrato para nitrito por Rhodobacteraceae (PUJALTE et al., 2014) e *Thalassobacterium* (ZHANG; HWANG; CHO, 2008). A família Chitinophagaceae foi descrita por Wu e colaboradores (2019) e Gomez-Alvarez e colaboradores (2013) sendo uma bactéria oxidante de amônia, podendo significar que algumas espécies pertencentes a esse grupo são capazes de realizar essa reação, porém o gênero classificado nas culturas de mangue, *Edaphobaculum*, não possui descrição na literatura de executar essa função (CAO et al., 2017).

9.3 Abundância dos genes 16S rRNA e *amoA* dos cultivos em tratamento

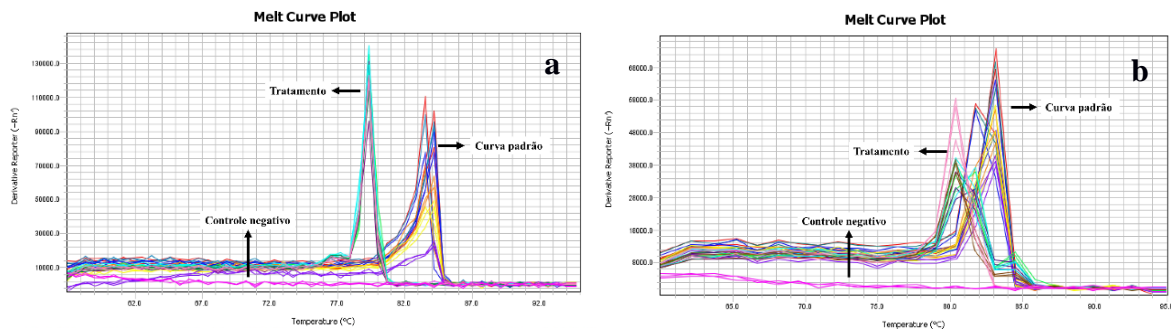
Após confirmação da presença de AOA no cultivo do ponto 6-fundo, foram realizadas alterações adicionais na metodologia de cultivo, como descrito no item 8.5 da metodologia, com o intuito de otimizar o enriquecimento. Para monitorar o enriquecimento de AOA nos cultivos, utilizou-se a técnica de PCR quantitativo para quantificar o gene *amoA*. O número de cópias de gene 16S rRNA também foi quantificado e utilizado para fazer a razão *amoA*/16S rRNA. Desta forma, foi possível verificar a proporção da comunidade composta por AOA.

Na quantificação do gene *amoA*, a temperatura da curva de dissociação das amostras tratadas foi de 79,43°C e da curva padrão foi de 84,19°C. A eficiência foi de 85% e a regressão logarítmica (R^2) de 0,98. A quantificação do gene 16S rRNA, a temperatura da curva de dissociação das culturas foi de 81,13°C e a da curva padrão foi de 83,04°C. A eficiência foi de

143% e regressão logarítmica (R^2) de 0,99 (Figura 36).

O comportamento das curvas de dissociação apresentou a diferença entre as sequências moleculares das amostras tratadas e do padrão, indicando serem de duas espécies diferentes. A curva de dissociação foi utilizada para verificar a diferenciação entre linhagens como relatados nos estudos de *Escherichia coli* (NJAGE; BUYS, 2020), de vírus (WAN et al., 2016), de *Leishmania* (TSUKAYAMA et al., 2013) e marfim de elefante (KITPIPIT et al., 2016). Outro fator que corrobora com os resultados encontrados no qPCR foi a identificação taxonômica da arqueia da cultura ponto 6-fundo, pertencente à família Nitrosopumilaceae, já a espécie da curva padrão pertence à família Nitrososphaeraceae.

Figura 36 – Curva de dissociação do PCR quantitativo das culturas do ponto 6-fundo com tratamento e curva padrão (espécies *N. viennensis*) dos genes *amoA* (a) e gene 16S rRNA (b).



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

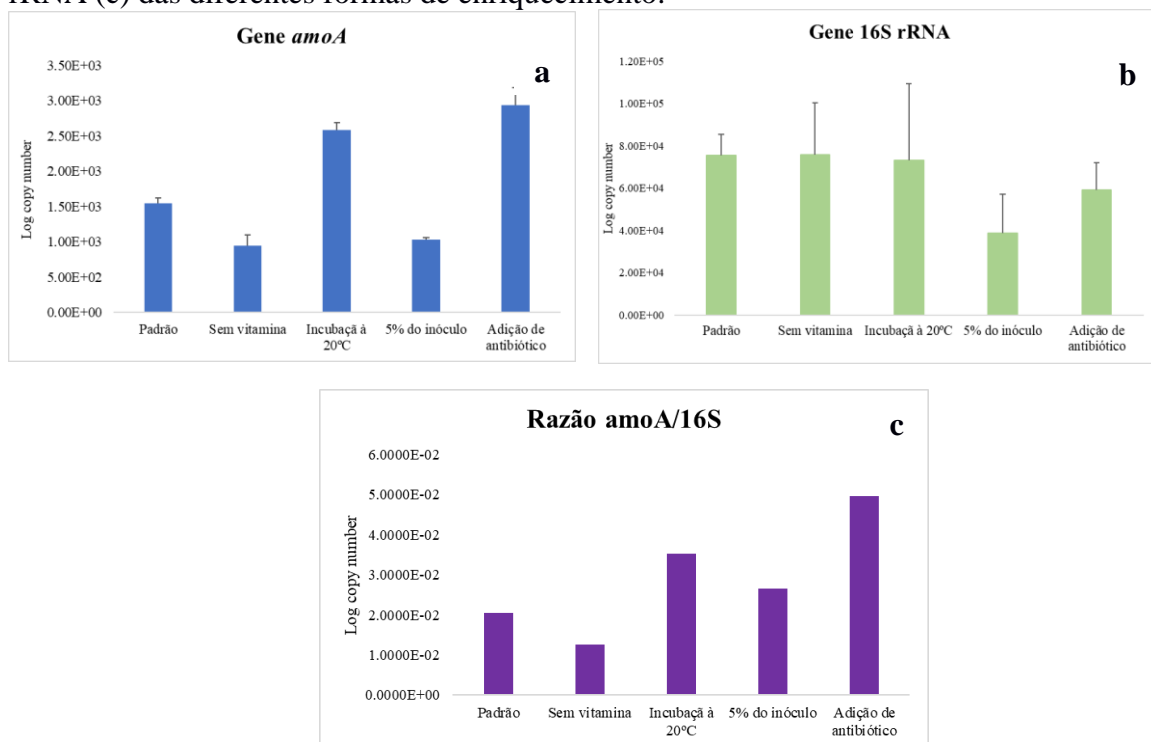
Com os dados obtidos pelo qPCR foi realizado o cálculo do número de cópia dos genes de interesse para avaliar a estratégia que mais favoreceu os cultivos. O número de cópias do gene *amoA* mostrou variação entre as diferentes estratégias de cultivo, sendo a adição de antibiótico e a incubação à 20°C os que levaram a maior quantidade do gene, e a ausência de solução vitamina teve o menor valor de número de cópias para o gene *amoA* (Figura 36). Já para o gene 16S rRNA, os enriquecimentos que apresentaram maior quantidade do gene foram condição padrão (incubada à 26°C), sem adição de solução de vitamina e incubada à 20°C. E as culturas com inóculo à 5% e com adição de antibiótico apresentaram os menores valores.

A média calculada da razão entre os dois genes analisados mostrou que todas as culturas responderam as estratégias de enriquecimento, comparadas à condição padrão. Porém os cultivos com antibiótico e a incubação à 20°C exibiram os maiores valores da razão, sendo assim esses tratamentos apresentaram a tendências que favoreceram o enriquecimento (Figura 37). Esse resultado se deve a possível limitação do crescimento da comunidade bacteriana pela utilização do antibiótico aminoglicosídeo que age, principalmente, em Gram-negativas e algumas Gram-positivas (PUBCHEM, 2022), sem a ação em arqueias. E a diminuição da

temperatura de incubação dificultando a proliferação de bactérias e beneficiou a comunidade as arqueias. O trabalho de Liu e colaboradores (2019) verificou a influência de diferentes antibióticos, sendo um deles a canamicina, no aumento de número de cópias do gene do 16S rRNA e da abundância das arqueias (*Nitrosocosmicus*) nos cultivos de enriquecimento, e Abby e colaboradores (2018) também observaram o aumento das arqueias no cultivo após a aplicação de diversas estratégias, que foram o aumento da temperatura de incubação, antibióticos, diluição e filtração.

Os tratamentos de 5% de inóculo e ausência da solução vitamina não foram eficazes na otimização do enriquecimento (Figura 37). Porém para Abby e colaboradores (2018), o cultivo de *Ca. Nitrosocaldus cavascurensis* foi beneficiado pela diminuição do volume do inóculo e omissão de solução vitamina, mas eles destacaram que a transferência do inóculo para um novo meio após atingir a fase exponencial foi crucial para o aumento da arqueia no enriquecimento, e para Tourna e colaboradores (2011) a presença de vitamina teve efeito basal.

Figura 37 – Média do número de cópias ng de DNA pelo método de qPCR dos genes *amoA* (a) para arqueias, 16S rRNA (b) e média da razão entre os resultados dos genes *amoA* e 16S rRNA (c) das diferentes formas de enriquecimento.



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

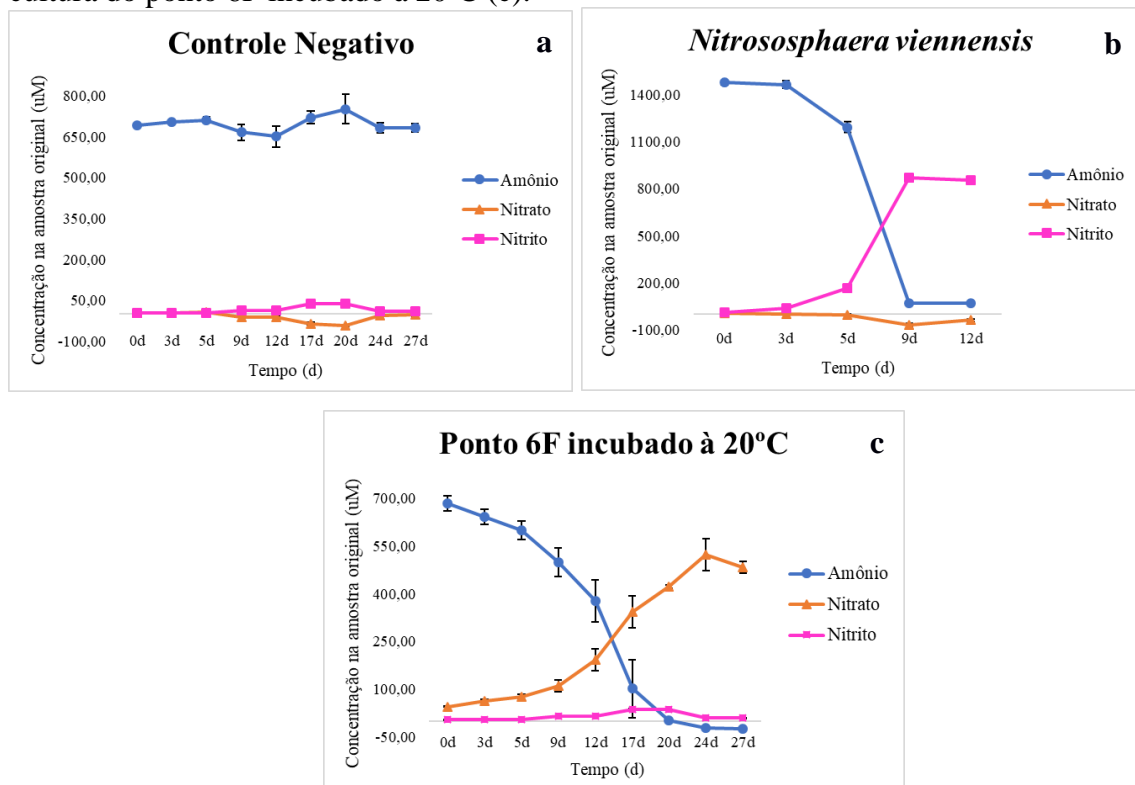
9.4 Curva de crescimento da cultura estuarina

Baseando-se nos resultados do qPCR as culturas que apresentaram melhores condições foram realizadas curvas de crescimento em triplicata e a quantificação dos substratos de

amônio, nitrato e nitrito, essas culturas foram: condição padrão, incubação à 20°C e adição de antibiótico. O crescimento foi acompanhado durante um mês com coleta de alíquotas duas vezes por semana, para os cultivos de enriquecimento selecionados, juntamente com controle negativo. Para o controle positivo o período de acompanhamento foi duas semanas, com duas alíquotas coletadas semanalmente. Esses intervalos foram estabelecidos devido a observação do comportamento das culturas durante os períodos de repiques sucessivos. Para representação gráfica dos resultados foi realizado o cálculo da média, desvio padrão e erro padrão dos valores das curvas no período de tempo determinado em dias.

A cultura com incubação à 20°C apresentou o consumo de amônio concomitante ao aumento na concentração de nitrato durante as primeiras três semanas. Já a curva do nitrito se manteve se próxima ao zero. No controle negativo o amônio permaneceu com valores altos, e o nitrito e nitrato próximos ao zero. Enquanto isso, o controle positivo teve o consumo total da amônia registrado no início da segunda semana, sendo acompanhado pelo aumento da curva de nitrito, ao mesmo tempo que o nitrato teve valores negativos ou próximos de zero (Figura 38).

Figura 38 – Gráfico de concentração em μM de amônio, nitrito e nitrato pelo tempo em dias, das amostras de controle negativo (a), controle positivo (*Nitrososphaera viennensis*) (b) e cultura do ponto 6F incubado à 20°C (c).

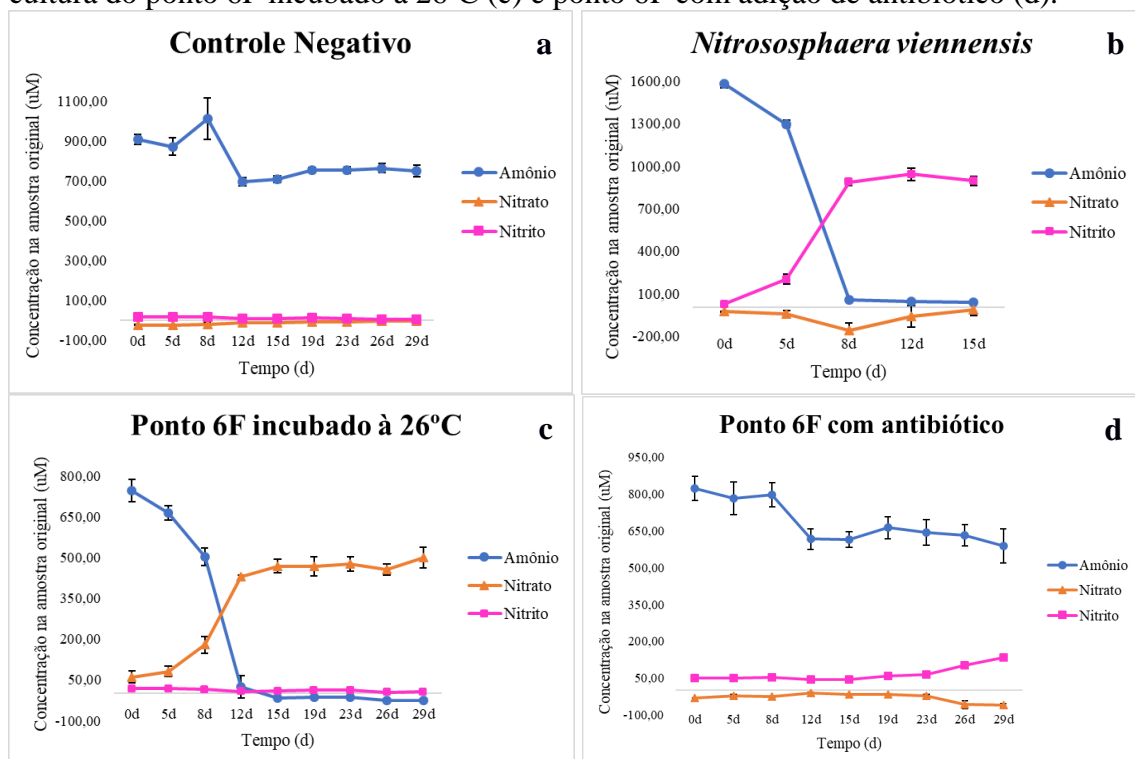


Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

Para cultura de enriquecimento com incubação à 26°C (condição padrão de incubação)

o consumo de amônio e o aumento na concentração de nitrato foram simultâneos no período das duas primeiras semanas. Já a cultura com adição de antibiótico houve uma leve variação nas curvas de amônio e nitrito durante o estudo, porém não foi possível verificar com mais precisão sua curva de crescimento devido ao período do experimento. O controle positivo apresentou o consumo total da amônia junto com a crescente concentração do nitrito no início da segunda semana, ao mesmo tempo que o nitrato teve valores negativos ou próximos de zero (Figura 39).

Figura 39 – Gráfico de concentração em μM de amônio, nitrito e nitrato pelo tempo em dias, das amostras de controle negativo (a), controle positivo (*Nitrososphaera viennensis*) (b) e cultura do ponto 6F incubado à 26°C (c) e ponto 6F com adição de antibiótico (d).



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

A curva de crescimento mostrou que os enriquecimentos incubados a 20°C e 26°C não apresentaram a curva de nitrito, mesmo esse sendo um produto da oxidação da amônia. Porém isso se deve a presença de bactéria oxidante de nitrito na cultura, o que foi atestado no resultado do sequenciamento do gene 16S rRNA. O aumento nos valores da concentração nitrato se deve a rápida conversão do nitrito a nitrato realizados por essas bactérias. Cocultura realizada por Park e colaboradores (2010) demonstrou perfil gráfico semelhante com os resultados apresentados acima. Esses autores reportaram não observar aumento na concentração de nitrito, mas sim um acúmulo de nitrato durante as medições, além disso, seus resultados comprovaram a presença de bactérias oxidantes de nitrito, do gênero *Nitrospina* (PARK et al., 2010). Mas

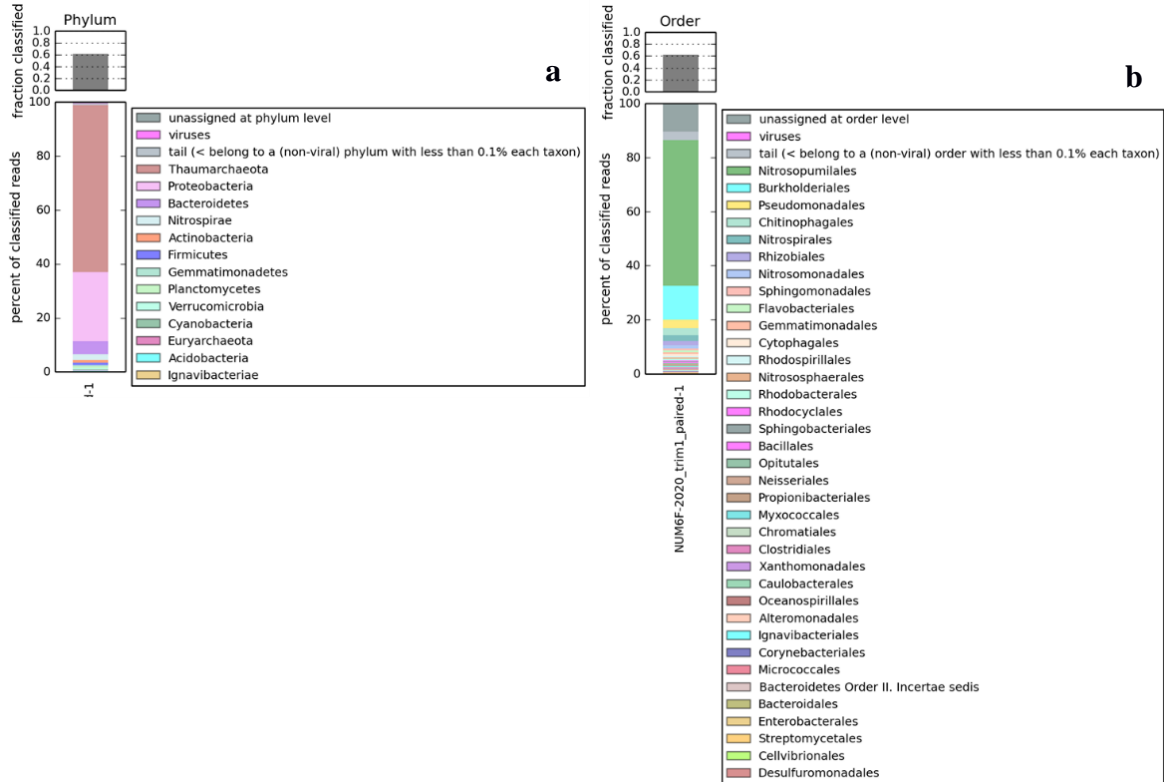
após a adição de antibióticos nas culturas houve a alteração das concentração, passando a presenciar o acúmulo de nitrito.

Já a cultura com adição de antibiótico não mostrou resultados conclusivos durante o período do experimento, mesmo apresentando ao final da análise uma tendencia no aumento da curva de nitrito e declino na curva do amônio. A conclusão desse resultado se deve a observações de quantificações anteriores desse mesmo tratamento, em que houve o acúmulo da concentração de nitrito em relação ao consumo do amônio, como visto no gráficos da Figura 40 do Anexo 3, com isso, pode se especular sobre a ação do antibiótico na bactéria oxidante de nitrito. E apresenta uma determinação colorimétrica semelhante ao apresentado pela cultura de *Nitrososphaera viennensis* (Figura 39b).

9.5 Metagenoma

Após analisar os resultados do sequenciamento do gene 16S rRNA das culturas, foi selecionado para análise metagenômica o cultivo do estuário ponto 6-fundo em condição padrão, o único a apresentar arqueia. A análise do metagenoma foi designada para avaliar a taxonomia da comunidade como um todo e o potencial funcional da arqueia presente no cultivo. Inicialmente foi realizada a predição taxonômica do metagenoma (Figura 41), sendo 60% das sequências utilizadas para classificação. De acordo com a classificação do banco de dados *RefSeq Complete Genomes, proGenomes, NCBI BLAST nr, NCBI BLAST nr+euk*. Foi demonstrando que o filo predominante foi Thaumarchaeota e a ordem com maior percentual de sequências foi a Nitrosopumilales, corroborando com os resultados do sequenciamento do gene 16S rRNA. Além disso observou-se a presença da ordem Nitrospirales que também foi detectada no sequenciamento de 16S rRNA.

Figura 41 - Predição taxonômica por meio das sequências do programa Kaiju, nos níveis taxonômicos de Filo (a) e Ordem (b).



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2021.

Para avaliação do perfil funcional as sequências do metagenoma foram analisadas utilizando a ferramenta *Run Fama Read Profiling*. Inicialmente a análise usou o conjunto de dados contendo genes relacionados ao ciclo do nitrogênio, confirmando a presença de genes da oxidação de amônia. Quando analisado o perfil taxonômico ao qual esses genes pertenciam, foi verificado que eram exclusivas do domínio Archaea. Também foi observada a presença de genes ligados aos processos de desnitrificação e, redução de nitrato, e além do gene para urease, porém classificados dentro do domínio Bacteria.

Os *contigs* foram formados com diferentes montadores, e obteve-se o melhor resultado com o MetaSpades: pois apresentou o menor número de *contigs* (6.696), maior valor de N50 (92.285), e menor valor de L50 (245). Essas foram as principais características para escolher o melhor resultado entre todos os montadores, pois quanto maior o *contig* mais informação possuirá e, menos *contigs* seriam necessários para montagens das *bins*, o que diminuiria a chance de ter erros nos genomas. Na tabela 2.8 foi demonstrado a comparação da qualidade entre todos os montadores utilizados.

Tabela 2.8 – Comparação dos resultados dos montadores de *contigs* MetaSPAdes, HybridSPAdes, IDBA e Megahit.

Assembly	Number of Contigs	Longest Contig (bp)	N50	L50	Contigs > 106	Sum Length (bp) Contigs
NUM6F_metaSPAdes	6696	2379095	92285	245	9	15749897
NUM6F_MEGAHIT_metalarge	9131	1839564	45178	420	5	8209277
NUM6F_MEGAHIT_metasensitive	8962	1793173	46061	413	6	8863169
NUM6F_IDBA-UD	9795	729570	27985	682	0	0
NUM6F-standard_HybridSPAdes	22753	2263124	69833	371	9	13493668
NUM6F-metagenomic_HybridSPAdes	20834	2379095	69217	322	9	15749897

Fonte: Alice de Moura Emílio, 2021.

Foram utilizados diversos montadores de *bins*, demonstrados na tabela 2.9. Dentre todos o melhor foi o DasTool com parâmetro *blast*, pois analisando os resultados da qualidade foi o que apresentou maior quantidade de *bins* com completude superior a 90%.

Tabela 2.9 – Resultados dos montadores de *bins* MaxBin, CONCOCT, MetaBat2 e DasTool, com as principais características para comparação.

Montadores	Números of bins	Input contigs	Binned contigs	Total nucleotídeos nos contigs
NUM6F- HYDRID_MAXBIN2	31	20834	6241	132489653
NUM6F-mETASPADES_MAXBIN2	31	6696	6240	132551510
NUM6F- CONCOT	43	6696	6695	142840422
NUM6F- METABAT2	39	6696	6020	0
NUM6F- DASTOOL-DIAMOND	34	6696	5497	136776413
NUM6F- DASTOOL-BLAST	34	6696	5497	136776413

Fonte: Alice de Moura Emílio, 2021.

Para determinar a qualidade dos *bins* (alta, média e baixa qualidade) foram usados os parâmetros definidos por Parks et al. (2017) e Bowers et al. (2017): alta qualidade $\geq 90\%$ completude e contaminação $< 5\%$; média qualidade completude $\geq 50\%$ e $< 10\%$ contaminação; e baixa qualidade $< 50\%$ de completude e contaminação $> 10\%$. Utilizando o programa *CheckM* foi possível observar que, dos 34 genomas montados, 29 foram de alta qualidade e todos pertencentes ao domínio Bacteria. Quatro *bins* tiveram média qualidade, sendo uma pertencente ao domínio Archaea, e três ao domínio Bacteria. Apenas uma teve baixa qualidade, a qual foi classificada dentro do domínio Archaea (Tabela 2.10).

Tabela 2.10 – Qualidades dos *bins* pelo montador *Dastool* (parâmetro *blast*), com índice de completude e contaminação.

Genoma	Classificação	Completo (%)	Contaminação (%)
bin.001	c__Betaproteobacteria	98.26	2.23
bin.002	g__ <i>Pseudomonas</i>	98.8	1.04
bin.003	o__Rhodospirillales	99.8	4.64
bin.004	c__Alphaproteobacteria	73.12	11.85
bin.005	c__Betaproteobacteria	96.15	0.83
bin.006	c__Deltaproteobacteria	85.32	2.8
bin.007	k__Bacteria	93.92	4.7
bin.008	k__Bacteria	96.76	3.18
bin.009	k__Bacteria	96.59	0
bin.010	k__Bacteria	97.81	0.55
bin.011	k__Bacteria	96.58	4.27
bin.012	o__Actinomycetales	98.53	0.26
bin.013	p__Bacteroidetes	99.51	0.49
bin.014	c__Betaproteobacteria	98.18	0.95
bin.015	p__Bacteroidetes	99.51	0.74
bin.016	p__Bacteroidetes	99.51	0.49
bin.017	k__Bacteria	93.94	2.73
bin.018	k__Bacteria	97.8	4.4
bin.019	o__Burkholderiales	99.77	0
bin.020	o__Burkholderiales	91.38	1.9
bin.021	k__Bacteria	52.23	4.62
bin.022	o__Sphingomonadales	98	1.08
bin.023	c__Gammaproteobacteria	91.13	2.04
bin.024	o__Burkholderiales	98.6	0.7
bin.025	k__Bacteria	97.25	3.3
bin.026	o__Rhizobiales	80.26	3.31
bin.027	k__Archaea	98.06	6.8
bin.028	o__Burkholderiales	96.28	2.37
bin.029	c__Betaproteobacteria	98.01	2.61
bin.030	k__Archaea	48.06	0
bin.031	o__Sphingomonadales	99.25	0.31
bin.032	p__Bacteroidetes	99.51	0
bin.033	k__Bacteria	98.63	2.88
bin.034	c__Alphaproteobacteria	96.89	1.63

Fonte: Alice de Moura Emílio, 2021.

A classificação taxonômica das *bins* foi realizada pelo GTDB-Tk, versão 207. Das 34 *bins*, apenas duas (*bins* 027 e 030) foram classificadas no domínio Archaea pertencentes à classe Nitrososphaeria e ambas foram classificadas até o gênero *Nitrosarchaeum* (Quadro 2). Também foi possível observar o gênero *Nitrospira*, no *bin* 008 (Quadro 2), confirmando a presença dessa bactéria no cultivo, corroborando com os resultados do sequenciamento do gene 16S rRNA.

Quadro 3 – Classificação taxonômica dos bins pelo programa GTDB-Tk.

User Genome	Classification
bin.001.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Burkholderiales;f UKL13-2;g FEB-7;s
bin.002.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f Pseudomonadaceae;g Pseudomonas E;s Pseudomonas E hunanensis
bin.003.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhodospirillales;f Casp-alpha2;g ;s
bin.004.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Caulobacteriales;f Hyphomonadaceae;g UBA7672;s
bin.005.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Burkholderiales;f SG8-39;g JAABQT01;s
bin.006.fa	d Bacteria;p Myxococcota;c Polyangia;o Haliangiales;f Haliangiaceae;g UBA2376;s
bin.007.fa	d Bacteria;p Acidobacteriota;c Vicinamibacteria;o Vicinamibacteriales;f SCN-69-37;g SYFT01;s
bin.008.fa	d Bacteria;p Nitrospirota;c Nitrospira;o Nitrospirales;f Nitrospiraceae;g Nitrospira F;s
bin.009.fa	d Bacteria;p Planctomycetota;c Phycisphaerae;o Phycisphaerales;f SM1A02;g REDD01;s
bin.010.fa	d Bacteria;p Bacteroidota;c UBA10030;o UBA10030;f UBA8401;g UBA8401;s
bin.011.fa	d Bacteria;p Cyanobacteria;c Vampirovibrionia;o Obscuribacteriales;f Obscuribacteriaceae;g ;s
bin.012.fa	d Bacteria;p Actinobacteriota;c Actinomycetia;o Propionibacteriales;f Nocardioidaceae;g Nocardioides;s
bin.013.fa	d Bacteria;p Bacteroidota;c Bacteroidia;o Chitinophagales;f Chitinophagaceae;g VBAS01;s
bin.014.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Burkholderiales;f UKL13-2;g FEB-7;s
bin.015.fa	d Bacteria;p Bacteroidota;c Bacteroidia;o Chitinophagales;f Chitinophagaceae;g SpSt-398;s
bin.016.fa	d Bacteria;p Bacteroidota;c Bacteroidia;o Chitinophagales;f Chitinophagaceae;g JJ008;s
bin.017.fa	d Bacteria;p Bacteroidota;c Rhodothermia;o Rhodothermales;f UBA10348;g ;s
bin.018.fa	d Bacteria;p Gemmatimonadota;c Gemmatimonadetes;o Longimicrobiales;f UBA6960;g SZUA-318;s
bin.019.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Burkholderiales;f Burkholderiaceae;g Hydrogenophaga;s
bin.020.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Burkholderiales;f Burkholderiaceae;g ;s
bin.021.fa	d Bacteria;p Verrucomicrobiota;c Verrucomicrobiae;o Opitutales;f Opitutaceae;g ;s
bin.022.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Sphingomonadales;f Sphingomonadaceae;g Sphingomonas;s
bin.023.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f Pseudohongiellaceae;g UBA5078;s
bin.024.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Burkholderiales;f Burkholderiaceae;g Piscinibacter;s
bin.025.fa	d Bacteria;p Gemmatimonadota;c Gemmatimonadetes;o Gemmatimonadales;f Gemmatimonadaceae;g PNKF01;s
bin.026.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Kaistiaceae;g Bauldia;s
bin.027.fa	d Archaea;p Thermoproteota;c Nitrososphaeria;o Nitrososphaerales;f Nitrosopumilaceae;g Nitrosarchaeum A;s
bin.028.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Burkholderiales;f Burkholderiaceae;g ;s
bin.029.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Burkholderiales;f SG8-39;g SG8-39;s
bin.030.fa	d Archaea;p Thermoproteota;c Nitrososphaeria;o Nitrososphaerales;f Nitrosopumilaceae;g Nitrosarchaeum A;s
bin.031.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Sphingomonadales;f Sphingomonadaceae;g Sphingorhabdus B;s
bin.032.fa	d Bacteria;p Bacteroidota;c Bacteroidia;o Chitinophagales;f Chitinophagaceae;g Flavipsychrobacter;s
bin.033.fa	d Bacteria;p Verrucomicrobiota;c Verrucomicrobiae;o Opitutales;f Opitutaceae;g ER46;s
bin.034.fa	d Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Bin65;f Bin65;g SBBV01;s

Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

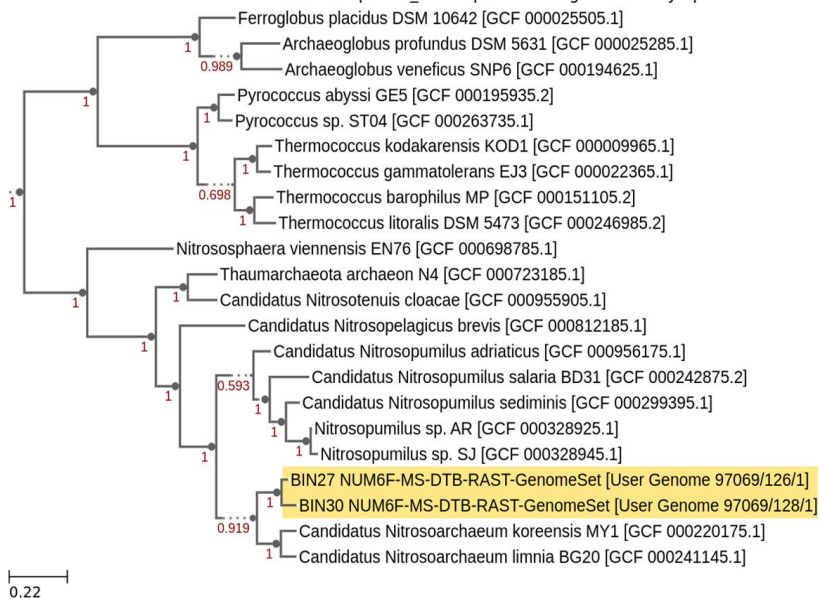
Baseando-se na anotação funcional foi realizada a construção das árvores filogenômicas de bactérias e de arqueias, separadamente. Na árvore filogenômica das bactérias, a bin 008 formou grupo monofilético com a espécie *Nitrospira moscoviensis*, na classificação taxonômica do sequenciamento do gene 16S rRNA da mesma cultura também obteve a mesma espécie. É uma bactéria oxidadora de nitrito, isolada de cultura de enriquecimento, originalmente amostrada em tubo de ferro corroído de um sistema de aquecimento (EHRICH et al., 1995). Apresentam metabolismo quimiolitotrófico, realiza a fixação de carbono, pode utilizar o hidrogênio e cianato como fontes alternativas de energia e elétrons quando não há a disponibilidade do nitrito (KOCH et al., 2014; PALATINSZKY et al., 2015; LEUNG et al., 2022), foi descrita por Koch e colaboradores (2015) sua capacidade de hidrolisar ureia em amônia. As espécies de *Nitrospira* ocupam uma diversidade de nichos ecológicos, sendo encontradas em ambiente terrestre (FREITAG et al., 2005), marinho (WATSON et al., 1986), água doce (HOVANEC et al., 1998), sedimento (ALTMANN et al., 2003) e fontes geotérmicas (LEBEDEVA et al., 2010). Na literatura não há registros da interação, em enriquecimentos, entre a espécie *N. moscoviensis* e as arqueias oxidantes de amônia, porém esse microorganismos foram descritos na composição da comunidade microbiana em ambientes como,

solo agrícola (HUANG et al., 2021) e em fazendas de camarão (BROWN et al., 2013; SRITHEP et al., 2014).

A construção da árvore filogenômica das arqueia (Figura 42), foi possível inferir que os *bins* de interesse formaram grupo monofilético com as espécies *Ca. Nitrosoarchaeum koreensis* MY1, isolada de solo agrícola da Coréia do Sul (KIM et al., 2011; JUNG et al., 2018) e *Ca. Nitrosarchaeum limnia* BG20, sequenciada de amostras de sedimento do estuário da Baía de São Francisco (MOSIER et al., 2012).

Figura 42 - Árvore filogenômica dos genomas do domínio Archaea.

BINs-27-30-Archaea-NUM6F-MS-DTB-Rast.Species_Tree: Species Tree generated by Species Tree Builder



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

9.5.1 Perfil funcional do genoma da arqueia

Para a *bin* 027, foi realizada a descrição das vias metabólicas usando o *Kegg Mapper Reconstruction* a partir da anotação funcional gerada pelo DRAM. Foi verificado no metabolismo do nitrogênio a presença das subunidades de *ammonia monooxygenase* dos genes *amoA*, *amoB* e *amoC*, responsáveis pela oxidação de amônia em hidroxilamina, porém o gene da hidroxilamina oxidoreductase não foi identificado, essa enzima tem o papel de oxidar a hidroxilamina em nitrito (Quadro 3). Foi detectado o gene *nirK*, codifica a enzima nitrito reductase e transforma nitrito em óxido nítrico. Outra análise feita foi para esse genoma o perfil funcional pelo *Run Fama Genome Profiling* com conjunto de dados dos genes do ciclo de nitrogênio confirmando os resultados obtidos pelo *Kegg* com a presença dos genes *amoABC* e *nirK*. Não foram detectados os genes da urease, que poderia indicar uma incapacidade de utilizar ureia como substrato alternativo para produção de energia. Zou e colaboradores (2020) observaram que AOA encontradas nos estuários não apresentaram o gene *ureC* codificante da

urease devido a quantidade significativa de amônia nessas regiões. Em enriquecimentos de amostra de outros ambientes como fontes termais (ABBY et al., 2018), solo agrícola (STIEGLMEIER et al., 2014) e ambiente marinho (KITZINGER et al., 2018) as arqueias apresentam esse gene.

Continuando com a investigação das vias metabólicas, foi verificada a presença de genes para a fixação de carbono utilizando a via hidroxipropionato-hidroxiбутirato. Dentre os genes codificadores de enzimas dessa via, foram encontrados metilmalonil-CoA mutase, 4-hidroxiбutiril-CoA desidratase, metilmalonil-CoA/etilmalonil-CoA epimerase, acetil-CoA carboxilase e propionil-CoA carboxilase. Para o metabolismo de carbono foi verificado a presença dos genes chaves dos ciclos ácido tricarboxílico, gliconeogênese e a via pentose fosfato (Quadro 3). Esses ciclos foram comumente observados nas espécies como *Nitrosopumilus maritimus* (WALKER et al., 2010; KONNEKE et al., 2014), *Cenarchaeum symbiosum* (HALLAM et al., 2006) e *Candidatus Nitrosocaldus cavacurensis* (ABBY et al., 2018). A fixação do carbono e a oxidação de amônia realizada pelos micro-organismos quimiolitautotróficos, impulsionam a produção primária, principalmente no oceano profundo, disponibilizando matéria orgânica em um ambiente afótico (HERNDL et al., 2005; YAKIMOV et al., 2011; ZHONG et al., 2020).

Quaro 4 – Descrição dos genes e enzimas dos metabolismos do nitrogênio, carbono e da via de fosforilação oxidativa encontrados no *bin 027*.

<i>Bin 027</i>	
Metabolismo Nitrogenio	
Denitrificação	
<i>nirK</i>	nitrito redutase
Nitrificação	
<i>amoA</i>	subunidades A da amônia monooxigenase
<i>amoB</i>	subunidades B da amônia monooxigenase
<i>amoC</i>	subunidades C da amônia monooxigenase
Metabolismo Carbono	
Glicolise/Gliconeogenese	
<i>pgi</i>	glicose-6-fosfato isomerase
<i>fbp</i>	frutose-1,6-bisfosfatase I
<i>gap2</i>	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (NAD(P))
<i>pgk</i>	fosfoglicerato quinase
<i>gpm</i>	Fosfoglicerato mutase independente de 2,3-bifosfoglicerato
<i>ppdK</i>	piruvato, ortofosfato diquinase
<i>eno</i>	enolase
<i>Aldo</i>	frutose-bifosfato aldolase, classe I
Ciclo do ácido tricarbóxico	
<i>pckA</i>	fosfoenolpiruvato carboxicinas (ATP)
<i>korABCD</i>	2-oxoglutarato/2-oxoácido ferredoxina oxidoreductase subunidade alfa
<i>glhA</i>	citrato sintase
<i>mdh</i>	malato desidrogenase
<i>sdhABCD</i>	subunidade da flavoproteína succinato desidrogenase (ubiquinona)
<i>frdABCD</i>	subunidade fumarato redutase flavoproteína
<i>sucCD</i>	subunidade alfa da succinil-CoA sintetase
Via pentose fosfato	
<i>gck</i>	glicerato 2-quinase
<i>rpiAB</i>	ribose 5-fosfato isomerase A
<i>prs</i>	ribose fosfato pirofosfoquinase
<i>tktAB</i>	transcetolase
<i>talAB</i>	transaldolase
Piruvato	
<i>gloB</i>	hidroxiacilglutaciona hidrolase
<i>acyP</i>	acilfosfatase
Fixação do Carbono	
<i>accB/accA/accC</i>	acetil-CoA carboxilase biotina carboxila proteína transportadora
<i>K18602</i>	semialdeído málico redutase
<i>K18594</i>	3-hidroxi propionil-CoA sintetase (formadora de ADP)
<i>K15052</i>	propionil-CoA carboxilase
<i>epi</i>	metilmalonil-CoA/etilmalonil-CoA epimerase
<i>mut</i>	metilmalonil-CoA mutase
<i>K15016</i>	enoil-CoA hidratase / 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase
<i>abfD</i>	4-hidroxi butiril-CoA desidratase / vinilacetil-CoA-Delta-isomerase
Fosforilação oxidativa	
<i>nuoK</i>	NADH-quinona oxidoreductase subunidade K
<i>nuoL</i>	NADH-quinona oxidoreductase subunidade L
<i>sdhA</i>	succinato desidrogenase / fumarato redutase, subunidade flavoproteína
<i>cox10/ctaB</i>	heme o sintase
<i>cox15/ctaA</i>	heme uma sintase
<i>ppa</i>	pirofosfatase inorgânica
<i>atpA</i>	Subunidade A da ATPase transportadora de H ⁺ /Na ⁺ do tipo V/A
<i>atpB</i>	Subunidade B de ATPase transportadora de H ⁺ /Na ⁺ do tipo V/A
<i>atpC</i>	Subunidade C de transporte de H ⁺ /Na ⁺ do tipo V/A
<i>atpD</i>	Subunidade D da ATPase transportadora de H ⁺ /Na ⁺ do tipo V/A
<i>atpE</i>	Subunidade E transportadora de H ⁺ /Na ⁺ do tipo V/A
<i>atpF</i>	Subunidade F da ATPase transportadora de H ⁺ /Na ⁺ do tipo V/A
<i>atpG</i>	Subunidade G da ATPase transportadora de H ⁺ /Na ⁺ do tipo V/A
<i>atpH</i>	Subunidade H da ATPase transportadora de H ⁺ /Na ⁺ do tipo V/A
<i>atpM</i>	Subunidade M da ATPase transportadora de H ⁺ /Na ⁺ do tipo V/A
<i>atpI</i>	Subunidade I da ATPase transportadora de H ⁺ /Na ⁺ do tipo V/A

Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

As vias metabólicas completas observadas por essa análise foram a biossíntese do cofator F₄₂₀, responsável por participar da transferência de elétrons no metabolismo de metanogênicos (WALSH, 1986; DEPPENMEIER, 2002), e pela fluorescência de linhagens da arqueia *Methanobacterium* (CHEESEMAN; TOMS-WOOD; WOLFE, 1972). Essa via já foi descrita em outras espécies de AOA como, *Nitrosphaera viennesis* (KEROU et al., 2016) por análise genômica e, *Candidatus Nitrososphaera gargensis*, cujo essa espécie produziu quantidade suficiente para ser detectado através de microscopia de fluorescência (SPANG et al., 2012), porém sua função nas AOA ainda é incerta. A outra via completa foi a biossíntese de siroheme, que são porfirina contendo ferro, encontrada em diversos procariotos (LAYER, 2021), sendo relatado em genomas das AOA encontradas no rio Amazonas (PINTO et al., 2020). Siroheme é necessária como um cofator para reação que catalisa a assimilação de sulfato produzindo sulfeto, e na assimilação de nitrato produzindo amônia, realizadas pelas enzimas sulfito redutase e nitrito redutase, respectivamente (DIETL et al., 2018; PENNINGTON et al., 2020; WEERTH; DAILEY, JR.; MEDLOCK, 2021). A biossíntese de cobalamina (vitamina B12) teve a via praticamente completa, exceto pela ausência do gene *cobK*. Foi descrita na espécie *Nitrosopumilus cobalaminigenes*, sintetizando grande quantidade de cobalamina (QIN et al., 2017b), Doxey e colaboradores (2014) observaram que as arqueias oxidantes de amônia são importantes produtoras de cobalamina no ambiente marinho.

9.5.2 Genômica comparativa

Para comparação genômica foi utilizada a *bin* 027 da arqueia oxidante de amônia da cultura. Além disso, a escolha dos genomas de referência foi baseada nos resultados obtidos da árvore filogenômica, foram selecionadas as espécies dos gêneros *Nitrosarchaeum* e *Nitrosopumilus* do banco de dados GenBank.

Inicialmente as características comparadas foram os locais de amostragem que esses genomas foram obtidos, o tamanho do genoma em números de pares de base, a qualidade, números de *contigs*, quantidade conteúdo G+C, número total de genes, descrito no quadro 4.

Quadro 5 – Características gerais para a comparação genômica entre a *bin 027* e os genomas de referência do banco de dados GenBank.

Classificação	<i>Nitrosarchaeum</i>	<i>Nitrosarchaeum</i>	<i>Candidatus Nitrosarchaeum limnium</i>	<i>Nitrosarchaeum koreense</i>	<i>Candidatus Nitrosarchaeum limnium</i>	<i>Nitrosopumilus sp.</i>
Linhagem	<i>BIN 027</i>	AC2	SFB1	MY1	BG20	SJ
ID Genbank	-	NZ_CP030847	CM001158.1	GCF_000220175.1	GCA_000241145.2	GCF_000328945.1
Origem amostra	cultura de enriquecimento - água do estuário de Cananéia	sedimento - Lago Acton dos EUA	cultura de enriquecimento - sedimento do estuário da Baía de São Francisco	cultura de enriquecimento - solo	estuário da Baía de São Francisco	cultura de enriquecimento - sedimento marinho - <i>East Sea</i> da Coreia do Sul
Total sequencias (bp)	1,691,536	1,720,730	1,743,235	1,607,695	1,855,559	1,650,825
Contigs (QUAST)	19	1	1	1	343	15
N50 (QUAST)	372,840	1,720,730	1,772,718	1,607,695	16,259	166,117
L50 (QUAST)	245	1	1	1	34	4
G+C % (QUAST)	34.39	32.81	32.46	32.67	32.49	34.2
Compleitude (%)	98.06	100	98.06	100	99.03	96.12
Contaminação (%)	6.8	0	0	0	5.83	0
Genes (total)	2,240	2,142	2,171	1,947	2,495	2,046

Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

Os genomas de referência vieram de amostras de sedimento marinho e solo. O tamanho das sequências por bp foi de 1.6 Mbp para *bin 027*, *Nitrosarchaeum koreense* e *Nitrosopumilus*. Todos apresentaram um pequeno número de *contigs*, exceto pelo *Candidatus Nitrosarchaeum limnium* BG20 com 343 *contigs*. A *bin 027* teve maior quantidade de conteúdo G+C comparados aos demais, 34,39%. Foi feita a comparação entre os dados resultantes do QUAST dos genomas referência com o genoma estudado. Os genomas verificados apresentaram completude acima de 95%, e sem contaminação, exceto pelos *Candidatus Nitrosarchaeum limnium* linhagem BG20 e a *bin 027* que tiveram índice de contaminação acima de 5%.

Os índices de similaridade empregados para a análise de comparação genômica foram o ANI (*average nucleotide identity*), AAI (*average amino-acid identity*) e DDH (*DNA-DNA hybridization*). Os resultados do ANI indicaram que essa arqueia estaria na mesma divisão, que significaria na família Nitrosopumilaceae, mas não pertenceriam ao mesmo gênero dos demais genomas, pois os valores de identidade ficaram abaixo de 80%. De acordo com Rodriguez e Konstantinidis (2014) para serem considerados da mesma espécie os genomas deveriam compartilhar acima de 80% de identidade. O resultado de AAI a arqueia estaria na mesma divisão do genoma de *Nitrosopumilus*, pois o valor foi de 70%, mas pertenceria ao mesmo gênero da *Nitrosarchaeum* com resultado acima de 75% (Tabela 2.11). O DDH ficou abaixo de 30% para todas as comparações sugerindo que a *bin* não pertence as mesmas espécies, como descrito por Wayne e colaboradores (1987) e Meier-Kolthoff et al., (2013), valores $\geq 70\%$ similaridade para considerar da espécie e subespécie.

Tabela 2.11 – Descrição dos dados estatísticos de comparação genômica pelos métodos de ANI, AAI e DDH, dos genomas de referência dos gêneros *Nitrosarchaeum* e *Nitrosopumilus* com *bin* 027.

Access Number	Reference Genome	DDH (%)	ANI (%)	AAI (%)
NZ_CP030847	<i>Nitrosarchaeum</i> sp. strain AC2	25,7	78,27	76,70
CM001158.1	<i>Candidatus Nitrosarchaeum limnia</i> strain SFB1	24,1	78,5	76,30
GCF_00220175.1	<i>Nitrosarchaeum koreense</i> strain MY1	26,10	78,21	76,79
GCA_000241145.2	<i>Candidatus Nitrosarchaeum limnia</i> strain BG20	14,30	78,30	77,25
GCF_000328945.1	<i>Nitrosopumilus</i> sp. strain SJ	15,20	79,88	70,42

Fonte: Alice de Moura Emílio, 2022.

10 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi realizado o enriquecimento de amostras do estuário de Cananéia para obtenção de cultura de arqueias oxidantes de amônia, juntamente com as análises utilizando métodos independentes de cultivo. Com os resultados foi possível concluir que:

- No cultivo da amostra do estuário, foi observada o enriquecimento de micro-organismos relacionados às etapas da nitrificação, com predominância de um grupo de arqueia da família Nitrosopumilaceae, além das bactérias das famílias Nitrospiraceae e Nitrosomonadaceae.
- A partir do sequenciamento metagenômico foi reconstruído o genoma de arqueia oxidante de amônia, obtendo informações sobre vias metabólicas dos ciclos do nitrogênio e do carbono, além da biossíntese de cofatores e vitaminas.
- A análise genômica comparativa da arqueia de oxidante de amônia (genoma 027), permitiu sua classificação como pertencente à família Nitrosopumilaceae. A classificação filogenética identificou que o genoma pode representar, possivelmente, um novo gênero, sendo o primeiro descrito no sistema estuarino Cananéia-Iguapé.
- Este trabalho apresenta a primeira descrição de arqueia oxidante de amônia por meio de cultivo em ambiente estuarino do Brasil, colaborando para expandir o conhecimento dessas arqueias no Oceano Atlântico Sudoeste. Além disso, para estudos futuros sugere-se, o avanço no perfil metabólico, compreensão da relação entre a bactéria oxidante de nitrito e a AOA, e se possível, a obtenção da cultura pura de arqueia.

REFERÊNCIAS

- ABBY, S. S. et al. *Candidatus Nitrosocaldus cavascurensis*, an Ammonia Oxidizing, Extremely Thermophilic Archaeon with a Highly Mobile Genome. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 28, jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29434576/>>. Acesso em: 06 dez. 2018.
- ABREU, A. et al. Priorities for ocean microbiome research. **Nature Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 937–947, jun. 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41564-022-01145-5>>. Acesso em: 01 fev. 2023.
- ACINAS, S. G. et al. Deep ocean metagenomes provide insight into the metabolic architecture of bathypelagic microbial communities. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, maio 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s42003-021-02112-2>>. Acesso em: 17 mai. 2022.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. 14ª rodada de licitações: Bacia de Santos. Brasil, 18 set. 2017. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/exploracao-e-producao-de-oleo-e-gas/rodadas-de-licitacoes/14-rodada-de-licitacoes/bacia-de-santos>>. Acesso em: 10 maio 2019.
- AGOGUÉ, H. et al. Water mass-specificity of bacterial communities in the North Atlantic revealed by massively parallel sequencing. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 2, p. 258–274, 1 jan. 2011.
- AL-AJEEL, S. et al. Ammonia-oxidizing archaea and complete ammonia-oxidizing *Nitrospira* in water treatment systems. **Water Research X**, v. 15, p. 100131, maio 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589914722000020>>. Acesso em: 12 mai. 2022.
- ALI, M. et al. Physiological characterization of anaerobic ammonium oxidizing bacterium “*Candidatus Jettenia caeni*”. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 2172–2189, dez. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25367004/>>. Acesso em: 04 fev. 2023.
- ALNEBERG, J. et al. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. **Nature Methods**, v. 11, n. 11, p. 1144–1146, 1 nov. 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nmeth.3103>>.
- ALONSO-SÁEZ L. et al. Role for urea in nitrification by polar marine Archaea. **PNAS**, [s.l.], v. 109, n. 44, p. 17989-17994, out. 2012. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1201914109>. Acesso em: 30 out. 2018.
- ALTMANN, D. et al. In situ distribution and activity of nitrifying bacteria in freshwater sediment. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 798–803, set. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12919415/>>. Acesso em: 05 fev. 2023.
- ALVES JUNIOR, N. et al. Microbial community diversity and physical–chemical features of the Southwestern Atlantic Ocean. **Archives of Microbiology**, v. 197, n. 2, p. 165–179, set. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25205422/>>. Acesso em: 07 jan. 2023.
- ALVES, R. J. E. et al. Unifying the global phylogeny and environmental distribution of ammonia-oxidising archaea based on amoA genes. **Nature Communications**, [s.l.], v. 9, n. 1,

p.1-17, abr. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-018-03861-1>>. Acesso em: 6 out. 2018.

AMANO-SATO, C. et al. Archaeal distribution and abundance in water masses of the Arctic Ocean, Pacific sector. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 69, n. 2, p. 101–112, abr. 2013. Disponível em: <<https://www.int-res.com/abstracts/ame/v69/n2/p101-112/>>.

ANDERSON, M. J.; WILLIS, T. J. Canonical analysis of principal coordinates: a useful method of constrained ordination for ecology. **Ecology**, v. 84, n. 2, p. 511–525, fev. 2003. Disponível em: <<https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1890/0012-9658%282003%29084%5B0511%3ACAOPCA%5D2.0.CO%3B2>>. Acesso em: 20 dez. 2022.

ARA, K. Temporal Variability and Production of the Planktonic Copepod Community in the Cananéia Lagoon Estuarine System, São Paulo, Brazil. **Zoological Studies**, [s.l.], v. 43, n. 2, p. 179-186, jan. 2004. Disponível em: <<http://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/43.2/179.pdf>>.

ARÍSTEGUI, J. et al. Microbial oceanography of the dark ocean's pelagic realm. *Limnology and Oceanography*, v. 54, n. 5, p. 1501–1529, 21 jun. 2009. Disponível em: <<https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.4319/lo.2009.54.5.1501>>. Acesso em: 13 fev. 2023.

ARKIN, A. P. et al. KBase: The United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 566–569, jul. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nbt.4163>>. Acesso em: 17 set. 2021.

ASSINE, M. L.; CORRÊA, F. S.; CHANG, H. Migração de depocentros na Bacia de Santos: importância na exploração de hidrocarbonetos. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 38, n. 2, p. 111-127, jun. 2008. Disponível em: <<https://www.ppegeo.igc.usp.br/index.php/rbg/article/view/8166/7446>>.

AYLWARD, F. O.; SANTORO, A. E. Heterotrophic Thaumarchaea with Small Genomes Are Widespread in the Dark Ocean. **mSystems**, v. 5, n. 3, jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32546674/>>. Acesso em: 23 mar. 2020.

BAKER, B. J. et al. Diversity, ecology and evolution of Archaea. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 887–900, maio 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41564-020-0715-z>>. Acesso em: 04 mai. 2020.

BANCHI, E. et al. Sediment Features and Human Activities Structure the Surface Microbial Communities of the Venice Lagoon. **Frontiers Marine Science**, [s. l.], v. 8, dez. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2021.762292/full#B164>>. Acesso em: 20 jul. 2023.

BARBOSA, H. R.; GOMEZ, J. G. C.; TORRES, B. B. Metabolismo. In: BARBOSA, H. R.; GOMEZ, J. G. C.; TORRES, B. B. **Microbiologia Básica: bacteriologia**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2018. Capítulo 3. p. 59 – 129.

BAR-ON, Y. M.; MILO, R. The Biomass Composition of the Oceans: A Blueprint of Our Blue Planet. **Cell**, v. 179, n. 7, p. 1451–1454, dez. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31835026/>>. Acesso em: 01 fev. 2023.

BAUMAS, C. M. J. et al. Mesopelagic microbial carbon production correlates with diversity across different marine particle fractions. **The ISME Journal**, v. 15, n. 6, p. 1695–1708, jan.

2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41396-020-00880-z>>. Acesso em: 07 jan. 2023.

BAYER, B. et al. *Nitrosopumilus adriaticus* sp. nov. and *Nitrosopumilus piranensis* sp. nov., two ammonia-oxidizing archaea from the Adriatic Sea and members of the class Nitrososphaeria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 1892–1902, jul. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30938665/>>. Acesso em: 03 fev. 2020.

BEAM, J. P. et al. Niche specialization of novel Thaumarchaeota to oxic and hypoxic acidic geothermal spring of Yellowstone National Park. **The ISME Journal**, Londres, v. 8, n. 4, p. 938-951, abr. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/24196321/>>. Acesso em: 6 out. 2018.

BEMAN, J. M.; POPP, B. N.; FRANCIS, C. A. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. **The ISME Journal**, v. 2, n. 4, p. 429–441, 17 jan. 2008. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ismej2007118#Sec8>>.

BENDIA, A. G. et al. First description of archaeal communities in carbonate-rich seafloor and subseafloor sediments from the Southwestern Atlantic slope. **Ocean and Coastal Research**, v. 70, n. suppl 2, out. 2022. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/ocr/a/nfkZz3vGPhPdNx8ztkwKGnv/?lang=en>>. Acesso em: 01 fev. 2023.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 36-42, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531190/pdf/gks1195.pdf>>. Acesso em: 8 nov. 2018.

BERG, C. et al. Chemoautotrophic growth of ammonia-oxidizing Thaumarchaeota enriched from a pelagic redox gradient in the Baltic Sea. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 15 jan. 2015. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00786/full>>. Acesso em: 03 abr. 2019.

BERGMAN, B. et al. *Trichodesmium*– a widespread marine cyanobacterium with unusual nitrogen fixation properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 3, p. 286–302, maio 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3655545/>>. Acesso em: 02 fev. 2023.

BERGO, N. M. et al. Spatial patterns of microbial diversity in Fe-Mn deposits and associated sediments in the Atlantic and Pacific oceans. **Science of The Total Environment**, v. 837, p. 155792, set. 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969722028893?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

BISANZ, J. E. **qiime2R**: Importing QIIME2 artifacts and associated data into R sessions. 2018. Disponível em: <<https://github.com/jbisanz/qiime2R>>.

BOLGER, A.; LOHSE, M.; BJÖRN, U. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 ago. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24695404/>>.

BOLHUIS, H.; CRETOIU, M. S. What is so Special About Marine Microorganisms? Introduction to the Marine Microbiome—From Diversity to Biotechnological Potential. In: STAL, L.; CRETOIU, M. S. (eds.). *The Marine Microbiome*. **Springer eBooks**, p. 3–20, 1 jan. 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-33000-6_1>. Acesso em: 17 set. 2022.

BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 37, p. 852-857, jul. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41587-019-0209-9>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

BONIN, P.; GILEWICZ, M.; BERTRAND, J. C. Denitrification by a marine bacterium *Pseudomonas nautica* strain 617. **Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie**, v. 138, n. 3, p. 371–383, maio 1987. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0769260987901256>>. Acesso em: 05 fev. 2023.

BOWERS, R. M. et al. Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 725–731, ago. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nbt.3893>>.

BRAGA, E. S. et al. Nutrient distributions over the Southwestern South Atlantic continental shelf from Mar del Plata (Argentina) to Itajaí (Brazil): Winter–summer aspects. **Continental Shelf Research**, v. 28, n. 13, p. 1649–1661, jul. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278434308001015>>. Acesso em: 21 nov. 2022.

BRAGA, E. S.; MÜLLER, T. J. Observation of regeneration of nitrite, phosphate and silicate during upwelling off Ubatuba, Brazil, 23°S. **Continental Shelf Research**, v.18, p. 915-922, 1998.

BRAGA, E. S.; NIENCHESKI, L. F. H. 2006. Composição das massas de água e seus potenciais produtivos na área entre o Cabo de São Tomé (RJ) e o Chuí (RS). In: ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B.; MADUREIRA, L. S. P. (org). *O ambiente oceanográfico da plataforma continental e do talude na região sudeste-sul do Brasil*. São Paulo: Editora da USP, p. 161-218.

BRAKER, G. et al. Community Structure of Denitrifiers, Bacteria, and Archaea along Redox Gradients in Pacific Northwest Marine Sediments by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Nitrite Reductase (*nirS*) and 16S rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1893–1901, abr. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11282647/>>.

BRANDINI, F. P. Hydrography and characteristics of the phytoplankton in shelf and oceanic waters off southeastern Brazil during winter (July/August 1982) and summer (February/March 1984). **Hydrobiologia**, v. 196, n. 2, p. 111–148, maio 1990. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00006105>>. Acesso em: 07 jan. 2023.

BRETTAR, I.; CHRISTEN, R.; HÖFLE, M. G. *Shewanella denitrificans* sp. nov., a vigorously denitrifying bacterium isolated from the oxic-anoxic interface of the Gotland Deep in the central Baltic Sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2211–2217, 1 nov. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12508890/>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

BRETTIN, T. et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, 10 fev. 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep08365>>.

BROCHIER-ARMANET, C. et al. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 245–252, mar. 2008. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro1852>>. Acesso em: 31 out. 2018.

BROWN, M. N. et al. Ammonia-oxidizing archaea and nitrite-oxidizing nitrospiras in the biofilter of a shrimp recirculating aquaculture system. **FEMS Microbiology Ecology**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 17–25, 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsec/article/83/1/17/466220>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

BU, C. et al. Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium in the Yellow River Estuary: Rates, Abundance, and Community Diversity. **Scientific reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, jul. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5533712/>>. Acesso em: 5 jul. 2023.

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 1 jul. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4927377/>>.

CALLIERI, C. et al. Distribution patterns and environmental correlates of Thaumarchaeota abundance in six deep subalpine lakes. **Aquatic Sciences**, [s.l.], v. 78, n. 2, p.215-225, ago. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00027-015-0418-3>. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00027-015-0418-3>>. Acesso em: 27 mar. 2019.

CAMPOS, E. J. D. Circulação oceânica em grande escala e as mudanças climáticas. In: HARARI, Joseph (org.). *Noções de Oceanografia*. São Paulo: Instituto Oceanográfico, 2021. E-book. Cap. 11: p. 239-251.

CAO, M. et al. *Edaphobaculum flavum* gen. nov., sp. nov., a member of family Chitinophagaceae, isolated from grassland soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 4475–4481, 1 nov. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28920838/>>.

CAPONE, D. G. Trichodesmium, a Globally Significant Marine Cyanobacterium. **Science**, v. 276, n. 5316, p. 1221–1229, 1997. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.276.5316.1221> >. Acesso em: 02 fev. 2023.

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, [s.l.], v. 108, n. 1, p. 4516-4522, jun. 2011. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/108/Supplement_1/4516 >. Acesso em: 20 nov. 2018.

CARANTO, J. D.; LANCASTER, K. M. Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 31, p. 8217–8222, 17 jul. 2017. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1704504114>>. Acesso em: 04 dez. 2022.

CARDOSO, A. M. et al. Archaea: potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 6, n.30, p. 71-77, jan./jun. 2003.

CARLSON, C. A. et al. Seasonal dynamics of SAR11 populations in the euphotic and mesopelagic zones of the northwestern Sargasso Sea. **The ISME Journal**, v. 3, n. 3, p. 283–295, 4 dez. 2008. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ismej2008117>>. Acesso em: 29 dez. 2022.

CARREIRA, C. et al. Genomic organization, gene expression and activity profile of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* denitrification enzymes. **PeerJ**, v. 6, p. e5603, 21 set. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6152468/>>. Acesso em: 05 fev. 2023.

CÉBRON, A.; GARNIER, J. Nitrobacter and Nitrospira genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France). **Water Research**, v. 39, n. 20, p. 4979–4992, dez. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16303163/>>. Acesso em: 11 jul. 2022.

CHARETTE, M.; SMITH, W. The Volume of Earth's Ocean. **Oceanography**, v. 23, n. 2, p. 112–114, 1 jun. 2010. Disponível em: <<https://tos.org/oceanography/article/the-volume-of-earths-ocean>>. Acesso em: 18 nov. 2022.

CHAUMEIL, P. A. et al. GTDB-Tk: A toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 36, n. 6, p. 1925-1927, nov. 2019.

CHEESEMAN, P.; TOMS-WOOD, A.; WOLFE, R. S. Isolation and Properties of a Fluorescent Compound, Factor 420, from *Methanobacterium* Strain M.o.H. **Journal of Bacteriology**, v. 112, n. 1, p. 527–531, out. 1972. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5079072/>>. Acesso em: 01 dez. 2022.

CHEN, Q. et al. Effects of environmental factors on denitrifying bacteria and functional genes in sediments of Bohai Sea, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 160, p. 111621, nov. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X20307396>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

CHEN, S. et al. Nitrification of archaeal ammonia oxidizers in a high-temperature hot spring. **Biogeosciences**, [s.l.], v. 13, n. 7, p. 2051-2060, abr. 2016. Disponível em: <<https://www.biogeosciences.net/13/2051/2016/>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

CHEN, X. et al. Bioturbation as a key driver behind the dominance of Bacteria over Archaea in near-surface sediment. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-02295-x>>. Acesso em: 20 jul. 2023.

CHO, H. et al. A Unique Benthic Microbial Community Underlying the Phaeocystis antarctica-Dominated Amundsen Sea Polynya, Antarctica: A Proxy for Assessing the Impact of Global Changes. **Frontiers in Marine Science**, v. 6, 10 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2019.00797/full#F1>>. Acesso em: 15 abr. 2023.

CIOTTI, A. M. et al. Freshwater outflow and Subtropical Convergence influence on phytoplankton biomass on the southern Brazilian continental shelf. *Continental shelf research*, v. 15, n. 14, p. 1737-1756, 1995.

CLEMENTE, P. Petroleum geology of the Campos and Santos basins, lower Cretaceous Brazilian sector of the South Atlantic margin. 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/236972647_Petroleum_geology_of_the_Campos_and_Santos_basins_Lower_Cretaceous_Brazilian_sector_of_the_South_Atlantic_margin>. Acesso em: 09 mai. 2019.

DAEBELER, A. et al. Cultivation and genomic analysis of Candidatus *Nitrosocaldus islandicus*, a novel obligately thermophilic ammonia-oxidizing Thaumarchaeon. **BioRxiv**, [s.l.], dez. 2017. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/early/2017/12/15/235028>>. Acesso em: 06 out. 2018.

DAIMS, H. et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 504–509, 26 nov. 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature16461>>. Acesso em: 16 dez. 2021.

DAIMS, H.; LÜCKER, S.; WAGNER, M. A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 9, p. 699–712, set. 2016. Disponível em: <[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X16300452#:~:text=Nitrite%2Doxidizing%2Dbacteria%20\(NOB\),fundamental%20physiological%20and%20molecular%20traits.](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X16300452#:~:text=Nitrite%2Doxidizing%2Dbacteria%20(NOB),fundamental%20physiological%20and%20molecular%20traits.)>. Acesso em: 05 fev. 2023.

DAMASHEK, J. et al. Microbial oxidation of nitrogen supplied as selected organic nitrogen compounds in the South Atlantic Bight. **ASLO - Limnology and Oceanography**, [s.l.], p. 1–14, dez. 2018. Disponível em: <<https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/lno.11089>>. Acesso em: 11 fev. 2019.

DAMSTÉ, J. S. S. et al. Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic Crenarchaeota. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 10, p. 1641–1651, out. 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002227520327838>>. Acesso em: 29 mar. 2019.

DANOVARO, R. et al. The deep-sea under global change. *Current Biology*, v. 27, n. 11, p. R461–R465, jun. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982217302178>>. Acesso em: 13 fev. 2023.

DAUMAS, R. Contribution of the water-sediment interface to the transformation of biogenic substances: application to nitrogen compounds. **Hydrobiologia**, [s. l.], v. 207, n. 1, p. 15–29, nov. 1990. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00041436>>. Acesso em: 20 jul. 2023.

de la TORRE, J. R. et al. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.810-818, mar. 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2007.01506.x>>. Acesso em: 15 out. 2018.

DE MAHIQUES, M. M. et al. Hydrodynamically driven patterns of recent sedimentation in the shelf and upper slope off Southeast Brazil. **Continental Shelf Research**, v. 24, n. 15, p. 1685–1697, out. 2004. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278434304001438>>. Acesso em: 27 dez. 2022.

DEKAS, A. E.; PORETSKY, R. S.; ORPHAN, V. J. Deep-Sea Archaea Fix and Share Nitrogen in Methane-Consuming Microbial Consortia. **Science**, v. 326, n. 5951, p. 422–426, 16 out. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19833965/>>. Acesso em: 03 fev. 2023.

DENG, F. et al. Dissimilatory nitrate reduction processes and associated contribution to nitrogen removal in sediments of the Yangtze Estuary. **Geophysical research biogeosciences**, [s. l.], v. 120, n. 8, p. 1521–1531, 2015. Disponível em: <https://agupubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/2015JG003007>. Acesso em: 6 jul. 2023.

DENNISON, C. Cupredoxins. In: ROBERTS, G. C. K. (ed.). **Encyclopedia of Biophysics**, p. 404–406, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-16712-6_37>. Acesso em: 12 dez. 2022.

DEPPENMEIER, U. The unique biochemistry of methanogenesis. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, p. 223–283, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12102556/>>. Acesso em: 01 dez. 2022.

DEVOL, A. H. Denitrification, Anammox, and N₂ Production in Marine Sediments. **Annual Review of Marine Science**, v. 7, n. 1, p. 403–423, 3 jan. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25560607/>>. Acesso em: 01 fev. 2023.

DIETL, A.-M. et al. Siroheme Is Essential for Assimilation of Nitrate and Sulfate as Well as Detoxification of Nitric Oxide but Dispensable for Murine Virulence of *Aspergillus fumigatus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 12 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6240589/>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

DMITRY ANTIPOV, D. et al. hybridSPAdes: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads. **Bioinformatics**, v. 32, n. 7, p. 1009–1015, 1 abr. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/32/7/1009/1743807?login=false>>.

DOXEY, A. C. et al. Aquatic metagenomes implicate Thaumarchaeota in global cobalamin production. **The ISME Journal**, v. 9, n. 2, p. 461–471, 15 ago. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25126756/>>. Acesso em: 16 nov. 2021.

DURBIN, A. M.; TESKE, A. P. Microbial diversity and stratification of South Pacific abyssal marine sediments. **Wiley Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 3219–3234, nov. 2011. Disponível em: <<https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1462-2920.2011.02544.x>>. Acesso em: 16 jul. 2023.

EADY, R. R. Structure–Function Relationships of Alternative Nitrogenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 3013–3030, 1 jan. 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11848850/>>. Acesso em: 02 fev. 2023.

EHRICH, S. et al. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. **Archives of Microbiology**, v. 164, n. 1, p. 16–23, jul. 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7646315/>>. Acesso em: 01 out. 2020.

FALKOWSKI, P. G. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 272–275, maio 1997. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/387272a0>>. Acesso em: 26 dez. 2022.

FENG, G. et al. Inhabitancy of active Nitrosopumilus-like ammonia-oxidizing archaea and *Nitrospira* nitrite-oxidizing bacteria in the sponge *Theonella swinhoei*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 26 abr. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep24966>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

FERREIRA, J. C. N. et al. Abundance and microbial diversity from surface to deep water layers over the Rio Grande Rise, South Atlantic. **Progress in Oceanography**, v. 201, p. 102736, fev. 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079661121002196>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

FLOMBAUM, P. et al. Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 24, p. 9824–9829, 23 maio 2013. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1307701110>>. Acesso em: 28 dez. 2022.

FRANCIS, C. A. et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 41, p. 14683–14688, 11 out. 2005. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0506625102>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

FREITAG, T. E. et al. Influence of Inorganic Nitrogen Management Regime on the Diversity of Nitrite-Oxidizing Bacteria in Agricultural Grassland Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8323–8334, dez. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16332819/>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

FRINDTE, K. et al. Microbial Response to Experimentally Controlled Redox Transitions at the Sediment Water Interface. **PloS One**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. e0143428–e0143428, 2015. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0143428>>. Acesso em: 20 jul. 2023.

FÜSSEL, J. et al. Nitrite oxidation in the Namibian oxygen minimum zone. **The ISME Journal**, v. 6, n. 6, p. 1200–1209, 15 dez. 2011. Disponível em: <[https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22170426/#:~:text=Nitrite%20oxidation%20\(%E2%89%A4372%20nM,and%20significant%20source%20of%20nitrite.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22170426/#:~:text=Nitrite%20oxidation%20(%E2%89%A4372%20nM,and%20significant%20source%20of%20nitrite.)>. Acesso em: 05 fev. 2023.

GAUTHIER, M.; et al. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a New, Extremely Halotolerant, Hydrocarbon-Degrading Marine Bacterium. **International journal of systematic bacteriology**, v. 42, n. 4, p. 568–576, 1 out. 1992. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1382536/>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

GIBLIN, A. et al. The Importance of Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium (DNRA) in the Nitrogen Cycle of Coastal Ecosystems. **Oceanography**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 124–131, 2013. Disponível em: <https://tos.org/oceanography/assets/docs/26-3_giblin.pdf>. Acesso em: 03 julho 2023.

GIOVANNELLI, D. et al. Diversity and Distribution of Prokaryotes within a Shallow-Water Pockmark Field. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-21, jun. 2016. Frontiers Media

SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00941>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00941/full>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

GOMEZ-ALVAREZ, V. et al. Pyrosequencing analysis of bench-scale nitrifying biofilters removing Trihalomethanes. **Environmental Engineering Science**, v. 30, n. 9, p. 582-588, 16 set. 2013. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ees.2013.0043>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

GOTTSHALL, E. Y. et al. Photoinhibition of comammox reaction in *Nitrospira inopinata* in a dose- and wavelength-dependent manner. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 15 dez. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9797979/>>. Acesso em: 03 jan. 2023.

GRUBER, N. The marine nitrogen cycle: overview and challenges. In: CAPONE, D. G. et al. **Nitrogen in the marine environment**. 2 ed. Oxford: Elsevier Inc, 2008, cap 1, p. 1-50. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123725226000013?via%3Dihub>>. Acesso em: 25 set. 2020.

GRUBER, N.; GALLOWAY, J. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature**, [s.l.], v. 451, n. 7176, p. 293-296, jan. 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature06592#article-info>>. Acesso em: 08 jun. 2021.

GRUBER, N.; SARMIENTO, J. L. Global patterns of marine nitrogen fixation and denitrification. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 11, n. 2, p. 235–266, 1997. Disponível em: <https://agupubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1029/97GB00077>>. Acesso em: 17 mai. 2021.

GUREVICH, A. et al. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 15 abr. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23422339/>>.

HALLAM, S. J. et al. Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 48, p. 18296–18301, 28 nov. 2006. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0608549103>>. Acesso em: 06 out. 2018.

HAN, S. et al. Nitrite-Oxidizing Bacteria Community Composition and Diversity Are Influenced by Fertilizer Regimes, but Are Independent of the Soil Aggregate in Acidic Subtropical Red Soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 8 maio 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29867799/>>. Acesso em: 05 fev. 2023.

HARARI, J. Circulação e massas d'água. In: HARARI, Joseph (org.). *Noções de Oceanografia*. São Paulo: Instituto Oceanográfico, 2021. E-book. Cap. 7: p. 147-166.

HE, H. et al. Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria Differentially Contribute to Ammonia Oxidation in Sediments from Adjacent Waters of Rushan Bay, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2 fev. 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00116/full>>. Acesso em: 23 dez. 2022.

HERNDL, G. J. et al. Contribution of Archaea to Total Prokaryotic Production in the Deep Atlantic Ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 71, n. 5, p. 2303-2309, mai. 2005. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.71.5.2303-2309.2005>>. Acesso em: 17 mai. 2021.

HESSE, R.; SCHACHT, U. Early Diagenesis of Deep-Sea Sediments. **Deep-Sea Sediments**, p. 557–713, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444530004000093#:~:text=The%20diagenesis%20of%20deep%2Dsea,water%20on%20the%20ocean%20floor.>>. Acesso em: 26 jan. 2023.

HOFER, U. The majority is uncultured. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 716–717, 1 out. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-018-0097-x>>. Acesso em: 24 jan. 2023.

HOLLIBAUGH, J. T. Oxygen and the activity and distribution of marine Thaumarchaeota. **Environmental Microbiology Reports**, v. 9, n. 3, p. 186–188, 12 maio 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28401690/>>. Acesso em: 11 fev. 2019.

HOVANEK, T. A. et al. *Nitrospira*-like Bacteria Associated with Nitrite Oxidation in Freshwater Aquaria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 258–264, jan. 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16349486/>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

HOWARTH, R. W. Nitrogen. In: MEHNER, T.; TOCKNER, K. (eds.). **Encyclopedia of Inland Waters**, p. 155–162, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128191668001389>>. Acesso em: 01 fev. 2023.

HUANG, L. et al. Ammonia-oxidizing archaea are integral to nitrogen cycling in a highly fertile agricultural soil. **ISME Communications**, [s. l.], v. 1, n. 1, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s43705-021-00020-4>>. Acesso em: 1 ago. 2023.

HURLEY, S. J. et al. Influence of ammonia oxidation rate on thaumarchaeal lipid composition and the TEX₈₆ temperature proxy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 28, p. 7762–7767, 28 jun. 2016. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1518534113>>. Acesso em: 07 fev. 2023.

HUTCHINS, D. A.; CAPONE, D. G. The marine nitrogen cycle: new developments and global change. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 7, p. 401–414, 7 fev. 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-022-00687-z>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

HUTCHINS, D. A.; FU, F. Microorganisms and ocean global change. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 6, 25 maio 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nmicrobiol201758>>. Acesso em: 01 fev. 2023.

HWANG, Y. et al. Leave no stone unturned: individually adapted xerotolerant Thaumarchaeota sheltered below the boulders of the Atacama Desert hyperarid core. **Microbiome**, v. 9, n. 1, 26 nov. 2021. Disponível em: <<https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-021-01177-9>>. Acesso em: 18 mai. 2021.

INOMURA, K.; MASUDA, T.; GAUGLITZ, J. M. Active nitrogen fixation by *Crocospaera* expands their niche despite the presence of ammonium – A case study. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 21 out. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-019-51378-4>>. Acesso em: 02 fev. 2023.

JECK, I. K. Detalhamento geomorfológico da região sul do platô de São Paulo e norte da Bacia de Pelotas a partir de dados batimétricos multifeixe. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Geologia e Geofísica Marinha, Geologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006. Disponível em: <http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=93923>. Acesso em: 16 abr. 2019.

JETTEN, M. S. M. et al. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (“anammox”) process. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 283–288, jun. 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166900002111>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

JING, H. et al. Composition and Ecological Roles of the Core Microbiome along the Abyssal-Hadal Transition Zone Sediments of the Mariana Trench. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 3, 29 jun. 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9241748/>>. Acesso em: 23 dez. 2022.

JING, H. et al. Particle-Attached and Free-Living Archaeal Communities in the Benthic Boundary Layer of the Mariana Trench. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 21 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6258811/>>. Acesso em: 06 dez. 2022.

JØRGENSEN, B. B.; MARSHALL, I. P. G. Slow Microbial Life in the Seabed. **Annual Review of Marine Science**, v. 8, n. 1, p. 311–332, 3 jan. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26209150/>>. Acesso em: 24 dez. 2022.

JØRGENSEN, B. B. et al. Sediment oxygen consumption: Role in the global marine carbon cycle. **Earth-science reviews**, [s. l.], v. 228, p. 103987–103987, 2022. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001282522200071X?ref=pdf_download&r=RR-2&rr=7ea43614fb841abd. Acesso em: 13 jul. 2023.

JØRGENSEN, S. J.; ZHAO, R. Microbial Inventory of Deeply Buried Oceanic Crust from a Young Ridge Flank. **Frontiers Microbiology**, [s. l.], v. 7, mai. 2016. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00820/full>. Acesso em: 16 jul. 2023.

JOYE, S. B.; ANDERSON, I. C. Nitrogen Cycling in Coastal Sediments. **Nitrogen in the Marine Environment**, p. 867–915, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123725226000190?via%3Dihub>>.

JUNG, M.-Y. et al. *Nitrosarchaeum koreense* gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon member of the phylum Thaumarchaeota isolated from agricultural soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 3084–3095, 1 out. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30124400/>>. Acesso em: 01 abr. 2020.

JUNG, M.-young. et al. A Mesophilic, Autotrophic, Ammonia-Oxidizing Archaeon of Thaumarchaeal Group I.1a Cultivated from a Deep Oligotrophic Soil Horizon. **Applied and**

Environmental Microbiology, [s.l.], v. 80, n. 12, p.3645-3655, abr. 2014. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.03730-13#B10>>. Acesso em: 27 mar. 2019.

JUNG, M-young. et al. Enrichment and Characterization of an Autotrophic Ammonia-Oxidizing Archaeon of Mesophilic Crenarchaeal Group I.1a from an Agricultural Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 77, n. 24, p. 8635-8647, dez. 2011. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.05787-11>>. Acesso em: 09 ago. 2021

KALANETRA, K. M.; BANO, N.; HOLLIBAUGH, J. T. Ammonia-oxidizing *Archaea* in the Arctic Ocean and Antarctic coastal waters. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 2434–2445, set. 2009. Disponível em: <<https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2009.01974.x>>. Acesso em: 30 set. 2021.

KAMP, A. et al. Diatoms respire nitrate to survive dark and anoxic conditions. **PNAS**, [s. l.], v. 108, n. 14, p. 5649–5654, 2011. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1015744108#sec-2>>. Acesso em: 5 jul. 2023.

KAMP, A. et al. Response of the Ubiquitous Pelagic Diatom *Thalassiosira weissflogii* to Darkness and Anoxia. **PLOS**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. e82605–e82605, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0082605#B12>>. Acesso em: 5 jul. 2023.

KANDELER, E.; GERBER, H. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. **Biology and Fertility of Soils**, v. 6, p. 68-72, 1988. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00257924.pdf>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

KANEHISA, M.; SATO, Y.; KAWASHIMA, M. KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data. **Tools for Protein Science**, [s.l.], v31, n. 1, p. 47-53, jan. 2022.

KANG, D. D. et al. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. **PeerJ**, v. 3, p. e1165–e1165, 27 ago. 2015. Disponível em: <<https://peerj.com/articles/1165/>>.

KARNER, M. B.; DELONG, E. F.; KARL, D. M. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. **Nature**, v. 409, n. 6819, p. 507–510, jan. 2001. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/35054051>>. Acesso em: 9 fev. 2023.

KARTAL, B. et al. *Candidatus “Anammoxoglobus propionicus”* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 39–49, jan. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16644170/>>. Acesso em: 31 mar. 2020.

KARTAL, B.; KELTJENS, J. T. Anammox Biochemistry: a Tale of Heme c Proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 12, p. 998–1011, dez. 2016. Disponível em: <[https://www.cell.com/trends/biochemical-sciences/fulltext/S0968-0004\(16\)30145-1](https://www.cell.com/trends/biochemical-sciences/fulltext/S0968-0004(16)30145-1)>. Acesso em: 03 fev. 2023.

KEMBEL, S. W. et al. O. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. **Bioinformatics**, v. 26, n. 11, p. 1463–1464, 1 jun. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/26/11/1463/203321>>. Acesso em: 23 abr. 2023.

KEMNITZ, D.; KOLB, S.; CONRAD, R. High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 60, n. 3, p. 442–448, jun. 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsec/article/60/3/442/549249>>. Acesso em: 07 fev. 2023.

KEROU, M. et al. Genomes of Thaumarchaeota from deep sea sediments reveal specific adaptations of three independently evolved lineages. **The ISME Journal**, v. 15, n. 9, p. 2792–2808, 1 abr. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41396-021-00962-6>>. Acesso em: 19 abr. 2021.

KEROU, M. et al. Proteomics and comparative genomics of *Nitrososphaera viennensis* reveal the core genome and adaptations of archaeal ammonia oxidizers. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 113, n. 49, p.7937-7946, nov. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1601212113>>. Acesso em: 01 mai. 2019.

KEUTER, S.; RINKEVICH, B. Spatial homogeneity of bacterial and archaeal communities in the deep eastern Mediterranean Sea surface sediments. **International microbiology**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 109–119, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27845498/>>. Acesso em: 13 jul. 2023.

KIM, B. K. et al. Genome Sequence of an Ammonia-Oxidizing Soil Archaeon, “*Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis*” MY1. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 19, p. 5539–5540, out. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21914867/>>.

KIM, J.-G. et al. Ammonia-oxidizing archaea in biological interactions. **Journal of Microbiology**, [s.l.], v., n., p., fev. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-021-1005-z>>. Acesso em: 21 abr. 2021.

KITPIPIT, T. et al. A novel real time PCR assay using melt curve analysis for ivory identification. **Forensic Science International**, v. 267, p. 210–217, out. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27643759/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

KITS, K. D. et al. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. **Nature**, v. 549, n. 7671, p. 269–272, 23 ago. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature23679>>. Acesso em: 05 fev. 2023.

KITZINGER, K. et al. Cyanate and urea are substrates for nitrification by Thaumarchaeota in the marine environment. **Nature Microbiology**, [s.l.], v. 4, n.2, p. 234-243, dez. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41564-018-0316-2>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

KLAWONN, I. et al. Untangling hidden nutrient dynamics: rapid ammonium cycling and single-cell ammonium assimilation in marine plankton communities. **The ISME Journal**, v. 13, n. 8, p. 1960–1974, 25 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41396-019-0386-z>>. Acesso em: 07 jan. 2023.

KLINCK, J. M. et al. Water-mass properties and circulation on the west Antarctic Peninsula Continental Shelf in Austral Fall and Winter 2001. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 51, n. 17-19, p. 1925–1946, ago. 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0967064504001171>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

KLOOS, K. et al. DNA-probing indicates the occurrence of denitrification and nitrogen fixation genes in *Hyphomicrobium*. Distribution of denitrifying and nitrogen fixing isolates of

Hyphomicrobium in a sewage treatment plant. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 18, n. 3, p. 205–213, nov. 1995. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsec/article/18/3/205/443735>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

KOBAYASHI, S. et al. Nitric Oxide Production from Nitrite Reduction and Hydroxylamine Oxidation by Copper-containing Dissimilatory Nitrite Reductase (NirK) from the Aerobic Ammonia-oxidizing Archaeon, *Nitrososphaera viennensis*. **Microbes and Environments**, v. 33, n. 4, p. 428–434, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6308003/>>. Acesso em: 08 nov. 2022.

KOCH, H. et al. Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 36, p. 11371–11376, 24 ago. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26305944/>>. Acesso em: 01 out. 2020.

KOCH, H. et al. Growth of nitrite-oxidizing bacteria by aerobic hydrogen oxidation. **Science**, v. 345, n. 6200, p. 1052–1054, 29 ago. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25170152/>>. Acesso em: 25 ago. 2020.

KOCH, H.; VAN KESSEL, M. A. H. J.; LÜCKER, S. Complete nitrification: insights into the ecophysiology of comammox *Nitrospira*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 177–189, 10 nov. 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-018-9486-3>>. Acesso em: 05 fev. 2023.

KÖNNEKE, M. et al. Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO₂ fixation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 22, p. 8239–8244, 19 maio 2014. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1402028111>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

KÖNNEKE, M. et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature**, [s.l.], v. 437, n. 7058, p.543-546, set. 2005. Springer Nature. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature03911>>. Acesso em: 15 out. 2018.

KOZLOWSKI, J. A. et al. Pathways and key intermediates required for obligate aerobic ammonia-dependent chemolithotrophy in bacteria and Thaumarchaeota. **The ISME Journal**, Londres, v. 10, n. 8, p. 1836-1845, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ismej20162.pdf>>. Acesso em: 06 out. 2018.

KRISTENSEN, E. Organic matter diagenesis at the oxic/anoxic interface in coastal marine sediments, with emphasis on the role of burrowing animals. **Hydrobiologia**, v. 426, n. 1, p. 1–24, 2000. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1003980226194>>. Acesso em: 16 jul. 2023.

KUENEN, J. G. Anammox bacteria: from discovery to application. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 320–326, abr. 2008. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro1857>>. Acesso em: 27 jan. 2023.

KUMAR, N. et al. Geologic History and Origin of Sao Paulo Plateau (Southeastern Brazilian Margin), Comparison with the Angolan Margin, and the Early Evolution of the Northern South Atlantic. In: SUPKO, P. R. et al., **Initial reports of the deep sea drilling Project**, v.39, Government Printing Office, 1977, p. 927 -945. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Geologic-History-and-Origin-of-Sao-Paulo-Plateau->

of-Kumar-Gamb%C3%B4a/2d6acc21012dec6c13f6bfd3f3c818c78ccda7d>. Acesso em: 2 nov. 2022.

KUMAR, N.; GAMBÔA, L. A. P. Evolution of the São Paulo Plateau (southeastern Brazilian margin) and implications for the early history of the South Atlantic. **Geological Society of America Bulletin**, v. 90, n. 3, p. 281, 1979.

KUYPERS, M. M. M. et al. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. **Nature**, v. 422, n. 6932, p. 608–611, abr. 2003. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature01472>>.

KUYPERS, M. M. M.; MARCHANT, H. K.; KARLTAL, B. The microbial nitrogen-cycling network. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. p. 263-276, fev. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro.2018.9>>. Acesso em: 08 set. 2020.

LALZAR, M. et al. Sediment Microbiota as a Proxy of Environmental Health: Discovering Inter- and Intra-kingdom Dynamics along the Eastern Mediterranean Continental Shelf. **American Society of Microbiology Journals**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36645271/>>. Acesso em: 15 jul. 2023.

LAM, P. et al. Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, [s.l.], v. 106, n. 12, p. 4752–4757, mar. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2649953/>>. Acesso em: 5 jul. 2023.

LAU, E. et al. Diversity and relative abundance of ammonia- and nitrite-oxidizing microorganisms in the offshore Namibian hypoxic zone. **PLOS ONE**, v. 14, n. 5, p. e0217136, 21 maio 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6529010/>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

LAVRINENKO, K. et al. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 2832–2837, 1 dez. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20081019/>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

LAYER, G. Heme biosynthesis in prokaryotes. In: AVERILL-BATES, D.; BULTYNCK, G.; SCHMITZ, M. L. (eds.). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1868, n. 1, p. 118861, jan. 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488920302196>>.

LEARMAN, D. R. et al. Biogeochemical and microbial variation across 5500 km of Antarctic surface sediment implicates organic matter as a driver of benthic Community structure. **Frontiers in Microbiology**, Lausana, v. 7, n. 284, p. 1-11, mar. 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00284/full>>. Acesso em: 30 out. 2018.

LEBEDEVA, E. V. et al. Isolation and characterization of a moderately thermophilic nitrite-oxidizing bacterium from a geothermal spring. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 75, n. 2, p. 195–204, 8 dez. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21138449/>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

LEE, J. A.; FRANCIS, C. A. Spatiotemporal Characterization of San Francisco Bay Denitrifying Communities: a Comparison of *nirK* and *nirS* Diversity and

Abundance. **Microbial Ecology**, v. 73, n. 2, p. 271–284, 5 out. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27709247/>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

LEHTOVIRTA-MORLEY, L. A. et al. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, [s.l.], v. 108, n. 38, p. 15892-15897, set. 2011. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/108/38/15892>>. Acesso em: 15 out. 2018.

LEHTOVIRTA-MORLEY, L. A. et al. Effect of nitrification inhibitors on the growth and activity of *Nitrosotalea devanattera* in culture and soil. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 62, p. 129-133, fev. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003807171300031X>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

LEHTOVIRTA-MORLEY, L. E. Ammonia oxidation: Ecology, physiology, biochemistry and why they must all come together. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 9, 13 mar. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29668934/>>. Acesso em: 06 fev. 2020.

LEUNG, P. M. et al. A nitrite-oxidising bacterium constitutively consumes atmospheric hydrogen. **The ISME Journal**, v. 16, n. 9, p. 2213–2219, 25 jun. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35752717/>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

LI, A. et al. Characterization and Genome Analysis of a Nicotine and Nicotinic Acid-Degrading Strain *Pseudomonas putida* JQ581 Isolated from Marine. **Marine Drugs**, v. 15, n. 6, p. 156, 31 maio 2017. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-3397/15/6/156>>. Acesso em: 04 out. 2022.

LI, D. et al. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct *de Bruijn* graph. **Bioinformatics**, v. 31, n. 10, p. 1674–1676, 15 maio 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25609793/>>.

LI, M. et al. Distinct distribution patterns of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in sediment and water column of the Yellow River estuary. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 25 jan. 2018a. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-20044-6>>. Acesso em: 27 jan. 2023.

LI, F. et al. Genome-scale metabolic model analysis indicates low energy production efficiency in marine ammonia-oxidizing archaea. **AMB Express**, v. 8, n. 1, 27 jun. 2018b. Disponível em: <<https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-018-0635-y>>. Acesso em: 07 fev. 2023.

LI, M. et al. Distinct distribution patterns of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in sediment and water column of the Yellow River estuary. **Nature**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2018c. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-20044-6#Sec8>>. Acesso em: 13 jul. 2023.

LI, R. et al. Multiple factors govern the biogeographic distribution of archaeal community in mangroves across China. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 231, p. 106414, dez. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272771419301702#:~:text=Organic%2>>

Omatter%2C%20total%20carbon%20and,diversity%20in%20mangroves%20across%20China .>. Acesso em: 30 set. 2020.

LI, S.; JIANG, Z.; JI, G. Effect of sulfur sources on the competition between denitrification and DNRA. **Environmental Pollution**, v. 305, p. 119322–119322, 1 jul. 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026974912200536X?via%3Dihub>>. Acesso em: 6 jul. 2023.

LIU, Q. et al. Light and temperature control the seasonal distribution of thaumarchaeota in the South Atlantic bight. **The ISME Journal**, v. 12, n. 6, p. 1473–1485, 14 fev. 2018b. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41396-018-0066-4>>. Acesso em: 06 out. 2018.

LIU, X. et al. Diversity and distribution of Archaea in global estuarine ecosystems. **Science of The Total Environment**, v. 637-638, p. 349–358, out. 2018a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969718316486?via%3Dihub>>. Acesso em: 01 set. 2020.

LIU, Y. et al. Distribution of sediment ammonia-oxidizing microorganisms in plateau freshwater lakes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 10, p. 4435–4444, 8 jan. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25567515/>>. Acesso em: 27 jan. 2023.

LOCHTE, K.; TURLEY, C. M. Bacteria and cyanobacteria associated with phytodetritus in the deep sea. **Nature**, v. 333, n. 6168, p. 67–69, maio 1988. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/333067a0>>. Acesso em: 28 dez. 2022.

LÖSCHER, C. R. et al. Production of oceanic nitrous oxide by ammonia-oxidizing archaea. **Biogeosciences**, v. 9, n. 7, p. 2419–2429, 4 jul. 2012. Disponível em: <<https://bg.copernicus.org/articles/9/2419/2012/#:~:text=Production%20of%20oceanic%20nitrous%20oxide%20by%20ammonia%20oxidizing%20archaea,-C.%20R.%20L.%20C3%B6scher1&text=Abstract.,the%20view%20on%20oceanic%20nitrification.>>. Acesso em: 08 mar. 2019.

LOUCA, S.; PARFREY, L. W.; DOEBELI, M. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. **Science**, v. 353, n. 6305, p. 1272–1277, 15 set. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27634532/>>. Acesso em: 01 fev. 2023.

LU, S. et al. Influence of photoinhibition on nitrification by ammonia-oxidizing microorganisms in aquatic ecosystems. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 19, n. 3, p. 531–542, 26 jun. 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11157-020-09540-2#:~:text=Photoinhibition%20of%20ammonia%20oxidation%20occurs,archaea%20are%20sensitive%20to%20light.>>. Acesso em: 24 dez. 2022.

LU, S. et al. Review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in freshwater ponds. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 16 nov. 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11157-018-9486-x>>. Acesso em: 06 fev. 2023.

LUO, H. et al. Single-cell genomics shedding light on marine Thaumarchaeota diversification. **The ISME Journal**, v. 8, n. 3, p. 732–736, 1 mar. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3930325/>>.

LUO, Z. et al. Depth-dependent variability of biological nitrogen fixation and diazotrophic communities in mangrove sediments. **Microbiome**, v. 9, n. 1, 27 out. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34702367/>>. Acesso em: 04 out. 2022.

MAHMOUDI, N. et al. Microbial community composition and diversity in Caspian Sea sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 1, p. 1–11, 5 dez. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4399438/>>. Acesso em: 06 dez. 2022.

MARCONDES, E. A. N. Environmental protection área of Cananéia-Iguape-Peruíbe. **Ramsar Information Sheet**, São Paulo, v. 2310, set. 2017. Disponível em: <https://rsis.ramsar.org/RISapp/files/RISrep/BR2310RIS_1709_en.pdf>. Acesso em: 09 ago. 2021.

MARTENS-HABBENA, W. et al. The production of nitric oxide by marine ammonia-oxidizing archaea and inhibition of archaeal ammonia oxidation by a nitric oxide scavenger. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 17, n. 7, p. 2261–2274, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1462-2920.12677>>. Acesso em: 07 mar. 2019.

MARTENS-HABBENA, W. et al. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. **Nature**, v. 461, n. 7266, p. 976–979, 30 set. 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature08465>>. Acesso em: 16 dez. 2021.

MASUDA, T. et al. Ammonium uptake and dinitrogen fixation by the unicellular nanocyanobacterium *Crocospaera watsonii* in nitrogen-limited continuous cultures. **Limnology and Oceanography**, v. 58, n. 6, p. 2029–2036, 1 nov. 2013. Disponível em: <<https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.4319/lo.2013.58.6.2029>>. Acesso em: 02 fev. 2023.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217–e61217, 22 abr. 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061217>>.

MEADOR, T. B. et al. Carbon recycling efficiency and phosphate turnover by marine nitrifying Archaea. **Science Advances**, [s.l.], v. 6, n. 19, p. 1–9, mai. 2020. Disponível em: <<https://advances.sciencemag.org/content/6/19/eaba1799.abstract>>. Acesso em: 17 mai. 2021.

MEDINA-CHÁVEZ, N. O.; TRAVISANO, M. Archaeal Communities: The Microbial Phylogenomic Frontier. **Frontiers in Genetics**, v. 12, 26 jan. 2022. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.693193/full>>. Acesso em: 06 fev. 2023.

MEHTA, M. P.; BAROSS, J. A. Nitrogen Fixation at 92°C by a Hydrothermal Vent Archaeon. **Science**, v. 314, n. 5806, p. 1783–1786, 15 dez. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17170307/#:~:text=A%20methanogenic%20archaeon%20isolated%20from,limit%20of%20biological%20nitrogen%20fixation.>>. Acesso em: 03 fev. 2023.

MEHTA, M. P.; BUTTERFIELD, D. A.; BAROSS, J. A. Phylogenetic Diversity of Nitrogenase (*nifH*) Genes in Deep-Sea and Hydrothermal Vent Environments of the Juan de Fuca Ridge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 960–970, fev. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12571018/>>. Acesso em: 03 fev. 2023.

MEIER-KOLTHOFF, J. P. et al. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 1, 21 fev. 2013. Disponível em: <<https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-14-60>>. Acesso em: 17 set. 2021.

MENZEL, P.; KIM L. NG; KROGH, A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, 13 abr. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ncomms11257>>.

MERBT, S. N. et al. Differential photoinhibition of bacterial and archaeal ammonia oxidation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 327, n. 1, p. 41–46, 2 dez. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22093004/>>. Acesso em 15 out. 2018.

MEYERS, P. A. Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic, and paleoclimatic processes. In: **Organic Geochemistry**, MINOR, E.; ROWLAND, S.; WALTERS, C. (eds.), v. 27, n. 5-6, p. 213–250, nov. 1997. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0146638097000491>>. Acesso em: 27 dez. 2022.

MICHOTÉY, V.; MÉJEAN, V.; BONIN, P. Comparison of Methods for Quantification of Cytochrome *cd₁*-Denitrifying Bacteria in Environmental Marine Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1564–1571, abr. 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10742243/>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

MIRALLES-ROBLEDILLO, J. M. et al. Distribution of Denitrification among Haloarchaea: A Comprehensive Study. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, p. 1669, 4 ago. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34442748/>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple e Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 62-71, jan. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11178938/>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

MITRA, A.; ZAMAN, S. **Basics of Marine and Estuarine Ecology**. SpringerLink, 2016.

MOHRIAK, W. U. Bacias Sedimentares da Margem Continental Brasileira. In: BIZZI, L. A. et al. **Geologia, tectônica e recursos minerais do Brasil**: texto, mapas e SIG. Brasília: CPRM - Serviço Geológico do Brasil, 2003. Cap. 3. p. 87-157. Disponível em: <<http://www.cprm.gov.br/publique/Recursos-Minerais/Apresentacao/Livro---Geologia%2C-Tectonica-e-Recursos-Minerais-do-Brasil-3489.html>>. Acesso em: 14 maio 2019.

MOORE C. M. et al. Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. **Nature Geoscience**, [s.l.], v. 6, n. 9, 701-710, set. 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ngeo1765#rightslink>>. Acesso em: 17 mai. 2021.

MOREIRA, J. L. P. et al. Bacia de Santos. **Boletim de Geociências da Petrobras**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 531-549, maio - novembro. 2007.

MOREIRA, D. L.; JONCK, C. R. **Projeto Santos**: caracterização química, física, biológica e geológica do sistema bentônico da Bacia de Santos. 2019a.

MOREIRA, D. L.; JONCK, C. R. **Projeto Santos**: caracterização química, física, biológica e geológica do sistema pelágico da Bacia de Santos. 2019b.

MOROZ, L. L.; KOHN A. B. Parallel evolution of Nitric Oxide signaling: Diversity of synthesis and memory pathways. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, n. 1, p. 2008, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21622160/>>.

MORRIS, R. M. et al. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 806–810, dez. 2002. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature01240>>. Acesso em: 29 dez. 2022.

MOSIER, A. C. et al. Genome Sequence of “*Candidatus Nitrosoarchaeum limnia*” BG20, a Low-Salinity Ammonia-Oxidizing Archaeon from the San Francisco Bay Estuary. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 8, p. 2119–2120, 15 abr. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22461554/>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

MOSIER, A. C.; FRANCIS, C. A. Denitrifier abundance and activity across the San Francisco Bay estuary. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 5, p. 667–676, 9 abr. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23766254/>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

MOSIER, A. C.; FRANCIS, C. A. Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 3002–3016, nov. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18973621/>>. Acesso em: 05 jan. 2021.

MÜLLER, A. et al. Endospores of thermophilic bacteria as tracers of microbial dispersal by ocean currents. **The ISME Journal**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1153–1165, jun. 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ismej2013225>>. Acesso em: 20 jul. 2023.

MÜLLER, O. et al. Spatiotemporal Dynamics of Ammonia-Oxidizing Thaumarchaeota in Distinct Arctic Water Masses. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 9, n. 24, p.1-13, jan. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00024>. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00024/full>>. Acesso em: 3 abr. 2019.

NAYFACH, S. et al. A genomic catalog of Earth’s microbiomes. **Nature Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 499–509, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41587-020-0718-6>>. Acesso em: 09 dez. 2022.

NETTO JUNIOR, J. P. B. Hidrografia e massas de água da plataforma continental sudeste brasileira em 26° 45’ S. **Ufpr.br**, 2012.

NEALSON, K. H. Sediment reactions defy dogma. **Nature**, v. 463, n. 7284, p. 1033–1034, fev. 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/4631033a>>. Acesso em: 16 jul. 2023.

NJAGE, P. M. K.; BUYS, E. A High Resolution DNA Melting Curve Analysis for the Rapid and Efficient Molecular Diagnostics of Extended Spectrum β -Lactamase Determinants from Foodborne *Escherichia coli*. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 90, 9 jan. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31936584/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

NOWKA, B.; DAIMS, H.; SPIECK, E. Comparison of Oxidation Kinetics of Nitrite-Oxidizing Bacteria: Nitrite Availability as a Key Factor in Niche Differentiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 745–753, 15 jan. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25398863/>>. Acesso em: 05 fev. 2023.

NUNOURA, T. et al. Hadal biosphere: Insight into the microbial ecosystem in the deepest ocean on Earth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 11, 23 fev. 2015.

Disponível em:
<<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1421816112#:~:text=In%20this%20study%2C%20unexpected%20microbial,the%20deepest%20ocean%20on%20Earth.>>. Acesso em: 23 dez. 2022.

NUNOURA, T. et al. Microbial Diversity in Sediments from the Bottom of the Challenger Deep, the Mariana Trench. **Microbes and Environments**, v. 33, n. 2, p. 186–194, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6031389/>>. Acesso em: 23 dez. 2022.

OCHSENREITER, T. et al. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 787–797, set. 2003. Disponível em: <<https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1462-2920.2003.00476.x>>. Acesso em: 07 fev. 2023.

OFFRE, P.; SPANG, A.; SCHLEPER, C. Archaea in Biogeochemical Cycles. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 437–457, 8 set. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23808334/#:~:text=Archaea%20thus%20play%20crucial%20roles,nitrite%20is%20performed%20by%20Thaumarchaeota.>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

OHLENDIECK, U. et al. The significance of nitrogen fixation to new production during early summer in the Baltic Sea. **Biogeosciences**, v. 4, n. 1, p. 63–73, 18 jan. 2007. Disponível em: <<https://bg.copernicus.org/articles/4/63/2007/>>. Acesso em: 02 fev. 2023.

OKAFOR, N. **Environmental Microbiology of Aquatic and Waste Systems**. SpringerLink, 2011. 123-148 p.

OKSANEN, J. et al. vegan: Community ecology package. 2022. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>>.

ORCUTT, B. N. et al. Microbial ecology of the dark ocean above, at, and, below, the seafloor. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 75, n. 2, p. 361-422, jun. 2011. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/MMBR.00039-10>>. Acesso em: 30 mar. 2020.

OREN, A. The Family Rhodocyclaceae. **The Prokaryotes**, p. 975–998, 2014b. Disponível em: <https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-30197-1_292>. Acesso em: 12 dez. 2022.

OREN, A. The Family Xanthobacteraceae. **The Prokaryotes**, p. 709–726, 2014a. Disponível em: <https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-30197-1_258>. Acesso em: 12 dez. 2022.

ORSI, W. D. Ecology and evolution of seafloor and subseafloor microbial communities. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 11, p. 671–683, nov. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-018-0046-8>>. Acesso em: 16 jul. 2023.

PACHIADAKI, M. G.; et al. Major role of nitrite-oxidizing bacteria in dark ocean carbon fixation. **Science**, v. 358, n. 6366, p. 1046–1051, 23 nov. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29170234/>>. Acesso em: 06 abr. 2020.

PAJARES, S.; BOHANNAN, B. J. M. Ecology of Nitrogen Fixing, Nitrifying, and Denitrifying Microorganisms in Tropical Forest Soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 5 jul. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27468277/>>. Acesso em: 06 fev. 2023.

PAJARES, S.; RAMOS, R. Processes and Microorganisms Involved in the Marine Nitrogen Cycle: Knowledge and Gaps. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 6, n. 739, p. 1-33, nov. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2019.00739/full>>. Acesso em: 31 mar. 2020.

PALATINSZKY, M. et al. Cyanate as an energy source for nitrifiers. **Nature**, [s.l.], v. 524, n. 7563, p. 105-121, ago. 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature14856.pdf>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

PARADA, A. E.; NEEDHAM, D. M.; FUHRMAN, J. A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 18, n. 5, p.1403-1414, out. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.13023>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1462-2920.13023>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

PARK, B.-j. et al. Cultivation of Autotrophic Ammonia-Oxidizing Archaea from Marine Sediments in Coculture with Sulfur-Oxidizing Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 76, n. 22, p.7575-7587, nov. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/aem.01478-10>>. Acesso em: 6 out. 2018.

PARKS, D. H. et al. A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 38, abr. 2020.

PARKS, D. H. et al. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 11, p. 1533–1542, 11 set. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41564-017-0012-7>>. Acesso em: 17 mai. 2022.

PARKS, D. H. et al. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Research**, v. 25, n. 7, p. 1043–1055, 1 jul. 2015. Disponível em: <<https://genome.cshlp.org/content/25/7/1043.long>>.

GOMES, P. C. et. al. Tectonic Evolution of the Outer High of Santos Basin, Southern São Paulo Plateau, Brazil, and Implications for Hydrocarbon Exploration. In: GAO, D. (aut.). **Tectonics and Sedimentation: Implications for Petroleum Systems. American Association of Petroleum Geologists eBooks**, p. 125–142, 1 jan. 2012. Disponível em: <<https://pubs.geoscienceworld.org/aapg/books/book/1243/chapter-abstract/107053971/Tectonic-Evolution-of-the-Outer-High-of-Santos?redirectedFrom=fulltext>>. Acesso em: 09 mai. 2019.

PEARSON, A. et al. Factors Controlling the Distribution of Archaeal Tetraethers in Terrestrial Hot Springs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 11, p. 3523–3532, jun. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2423032/>>. Acesso em: 07 fev. 2023.

PENG, Y. et al. IDBA-UD: a *de novo* assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. **Bioinformatics**, v. 28, n. 11, p. 1420–1428, 1 jun. 2012.

Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/28/11/1420/266973?login=false>>.

PENNINGTON, J. M. et al. Siroheme synthase orients substrates for dehydrogenase and chelatase activities in a common active site. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 13 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-020-14722-1>>.

PEOPLES, L. M. et al. Microbial Community Diversity Within Sediments from Two Geographically Separated Hadal Trenches. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 15 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00347/full>>. Acesso em: 06 dez. 2022.

PESTER, M. et al. *NxrB* encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing *Nitrospira*. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 3055–3071, 8 nov. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24118804/>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

PESTER, M.; SCHLEPER, C.; WAGNER, M. The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. **Current Opinion in Microbiology**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.300-306, jun. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527411000555>>. Acesso em: 6 out. 2018.

PETRO, C. et al. Marine Deep Biosphere Microbial Communities Assemble in Near-Surface Sediments in Aarhus Bay. **Frontiers Microbiology**, [s. l.], v. 10, abr. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00758/full#B9>>. Acesso em: 20 jul. 2023.

PINTO, O. H. B. et al. Genome-resolved metagenomics analysis provides insights into the ecological role of Thaumarchaeota in the Amazon River and its plume. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, 15 jan. 2020. Disponível em: <<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-020-1698-x>>. Acesso em: 27 abr. 2020.

PITCHER, A. et al. Core and Intact Polar Glycerol Dibiphytanyl Glycerol Tetraether Lipids of Ammonia-Oxidizing Archaea Enriched from Marine and Estuarine Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3468–3477, 15 maio 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3126447/>>. Acesso em: 07 fev. 2023.

PITCHER, A. SCHOUTEN, S. DAMSTÉ, J. S. S. In situ production of crenarchaeol in two California hot spring. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 75, n. 13, p. 4443-4451, jul. 2009. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.02591-08>>. Acesso em: 09 ago. 2021.

PRADO, H. M. et al. The Valo Grande channel in the Cananéia-Iguape estuary-lagoon complex (SP, Brazil): environmental history, ecology, and future perspectives. **Ambiente & Sociedade**, São Paulo, v. 22, p. 1-24, 2019. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/asoc/a/FnXFqNGWWjN5nsCXGsfmVSN/?lang=en>>. Acesso em: 09 ago. 2021.

PRESTON, C. M. et al. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**,

[s.l.], v. 93, n. 13, p. 6241-6246, 1996. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/93/13/6241.short>>. Acesso em: 6 out. 2018.

PUBCHEM. Kanamycin. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kanamycin#section=Pharmacology-and-Biochemistry>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

PUJALTE, M. J. et al. The Family Rhodobacteraceae. **The Prokaryotes**, p. 439–512, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-30197-1_377>. Acesso em: 12 dez. 2022.

PURKHOLD, U. et al. Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and *amoA* Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5368–5382, dez. 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11097916/>>. Acesso em: 06 fev. 2023.

QIN, W. et al. Influence of oxygen availability on the activities of ammonia-oxidizing archaea. **Environmental Microbiology Reports**, v. 9, n. 3, p. 250–256, 1 jun. 2017a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28211189/>>. Acesso em: 08 mar. 2019.

QIN, W. et al. Marine ammonia-oxidizing archaeal isolates display obligate mixotrophy and wide ecotypic variation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 34, p. 12504–12509, 11 ago. 2014. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1324115111>>. Acesso em: 21 out. 2018.

QIN, W. et al. *Nitrosopumilus maritimus* gen. nov., sp. nov., *Nitrosopumilus cobalaminigenes* sp. nov., *Nitrosopumilus oxycliniae* sp. nov., and *Nitrosopumilus ureiphilus* sp. nov., four marine ammonia-oxidizing archaea of the phylum Thaumarchaeota. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5067–5079, 1 dez. 2017b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29034851/>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database Project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 590-596, jan. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531112/>>. Acesso em: 02 nov. 2018.

QUINCE, C. et al. Removing Noise From Pyrosequenced Amplicons. **Bmc Bioinformatics**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.1-18, jan. 2011. Disponível em: <<https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-12-38>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. 2018.

RAVISHANKARA, A. R.; DANIEL, J. S.; PORTMANN, R. W. Nitrous Oxide (N₂O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century. **Science**, v. 326, n. 5949, p. 123–125, 2 out. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19713491/>>. Acesso em: 05 fev. 2023.

REJI, L. et al. Differential co-occurrence relationships shaping ecotype diversification within Thaumarchaeota populations in the coastal ocean water column. **The ISME Journal**, v. 13, n. 5, p. 1144–1158, 4 jan. 2019a. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41396-018-0311-x>>. Acesso em: 12 mai. 2022.

REJI, L et al. Depth distributions of nitrite reductase (nirK) gene variants reveal spatial dynamics of thaumarchaeal ecotype populations in coastal Monterey Bay. **Wiley Environmental Microbiology**, v. 21, n. 11, p. 4032–4045, 9 ago. 2019b. Disponível em: <<https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.14753>>.

RINKE, C. A rank-normalized archaeal taxonomy based on genome phylogeny resolves widespread incomplete and uneven classifications. **BioRxiv**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 12-27, mar. 2020. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.01.972265v1.article-info>>. Acesso em: 27 mai. 2020.

RIOS-DEL TORO, E. E.; CERVANTES, F. J. Anaerobic ammonium oxidation in marine environments: contribution to biogeochemical cycles and biotechnological developments for wastewater treatment. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 18, n. 1, p. 11–27, 5 jan. 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11157-018-09489-3>>. Acesso em: 03 fev. 2023.

ROBINSON, C. et al. Mesopelagic zone ecology and biogeochemistry – a synthesis. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 57, n. 16, p. 1504–1518, ago. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0967064510000846>>. Acesso em: 24 abr. 2020.

RODRIGUEZ-R, L. M.; KONSTANTINIDIS, K. T. Bypassing Cultivation to Identify Bacterial Species. **Microbe**, n. 3, v. 9, p. 111-118, 2014.

ROVAI, A. S. et al. Ecosystem-level carbon stocks and sequestration rates in mangroves in the Cananéia-Iguape lagoon estuarine system, southeastern Brazil. **Forest Ecology and Management**, [s.l.], v. 479, p. 1-13, ago. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118553>>. Acesso em: 09 ago. 2021.

RUMSEY, D. J. Looking for links: correlation and regression. In: RUMSEY, D. J. **Statistics for dummies**. 2021. p. 279-294.

SANTORO, A. E. et al. Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 1068–1079, abr. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18266758/>>. Acesso em: 06 jun. 2020.

SANTORO, A. E.; CASCIOTTI, K. L.; FRANCIS, C. A. Activity, abundance and diversity of nitrifying archaea and bacteria in the central California Current. **Wiley Environmental Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 1989–2006, 23 mar. 2010. Disponível em: <<https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2010.02205.x>>.

SANTORO, A. E.; CASCIOTTI, K. L. Enrichment and characterization of ammonia-oxidizing archaea from the open ocean: phylogeny, physiology and stable isotope fractionation. **The ISME Journal**, v. 5, n. 11, p. 1796–1808, 12 maio 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ismej201158>>.

SANTORO, A. E. et al. Isotopic signature of N₂O Produced by marine ammonia-oxidizing archaea. **Science**, [s.l.], v. 333, n. 6047, p. 1282-1285, set. 2011. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/333/6047/1282>>. Acesso em: 07 mar. 2019.

SANTORO, A. E. et al. Genomic and proteomic characterization of “*Candidatus Nitrosopelagicus brevis*”: an ammonia-oxidizing archaeon from the open ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, [s.l.], v. 112, n. 4, p. 1173-1178, jan. 2015. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/112/4/1173>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

SANTORO, A. E. et al. Thaumarchaeal ecotype distributions across the equatorial Pacific Ocean and their potential roles in nitrification and sinking flux attenuation. **Limnology and Oceanography**, [s.l.], v. 62, n. 5, p. 1984-2003, set. 2017. Disponível em: <<https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/lno.10547>>. Acesso em: 01 mar. 2019.

SANTORO, A. E. et al. Planktonic Marine Archaea. *Annual Review of Marine Science*, Califórnia, v. 11, n. 1, p. 131-158, jan. 2019. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-marine-121916-063141>>. Acesso em: 21 fev. 2019.

SANTSCHI, P. H. et al. Chemical processes at the sediment-water interface. *Marine Chemistry*, [s. l.], v. 30, p. 269–315, 1990. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0304420390900760>. Acesso em: 20 jul. 2023.

SAUDER, L. A. et al. Cultivation and characterization of *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare*, an ammonia-oxidizing archaeon from a municipal wastewater treatment system. **The ISME Journal**, v. 11, n. 5, p. 1142–1157, 14 fev. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ismej2016192>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

SCHAUBERGER, C. et al. Microbial community structure in hadal sediments: high similarity along trench axes and strong changes along redox gradients. **The ISME Journal**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 3455–3467, jun. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41396-021-01021-w#Sec19>>. Acesso em: 20 jul. 2023.

SCHLEPER, C. Ammonia oxidation: different niches for bacteria and archaea? **The ISME Journal**, Londres, v. 4, n. 9, p.1092-1094, jul. 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ismej2010111>>. Acesso em: 9 out. 2018.

SCHLEPER, C.; NICOL, G. W. Ammonia-oxidising archaea: physiology, ecology and evolution. **Advances In Microbial Physiology**, [s.l.], v. 57, n. 1, p.1-41, 2010. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-381045-8.00001-1>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123810458000011?via%3Dihub>>. Acesso em: 21 mar. 2019.

SCHMID, M. et al. *Candidatus “Scalindua brodae”*, sp. nov., *Candidatus “Scalindua wagneri”*, sp. nov., Two New Species of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 529–538, jan. 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202004702192>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

SCHOUTEN, S. et al. Distributional variations in marine crenarchaeotal membrane lipids: a new tool for reconstructing ancient sea water temperatures? **Earth and Planetary Science Letters**, v. 204, n. 1-2, p. 265–274, nov. 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012821X02009792>>. Acesso em: 07 fev. 2023.

SCHREIBER, F. et al. Mechanisms of transient nitric oxide and nitrous oxide production in a complex biofilm. **The ISME Journal**, v. 3, n. 11, p. 1301–1313, 11 jun. 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ismej200955>>. Acesso em: 03 fev. 2023.

SCHREIBER, F. et al. Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: biological pathways, chemical reactions, and novel technologies. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00372/full>>. Acesso em: 03 fev. 2023.

SCHRENK, M. O.; HUBER, J. A.; EDWARDS, K. J. Microbial Provinces in the Subseafloor. **Annual Review of Marine Science**, v. 2, n. 1, p. 279–304, jan. 2010. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-marine-120308-081000>>. Acesso em: 16 jul. 2023.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 15 jul. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24642063/>>.

SEMEDO, M. et al. Depth profile of nitrifying archaeal and bacterial communities in the remote oligotrophic waters of the north Pacific. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v.12, n. 624071, p. 1-18, fev. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.624071/full#refer1>>. Acesso em: 04 mai. 2021.

SERGEY NURK, S. et al. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome Research**, v. 27, n. 5, p. 824–834, 1 maio 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28298430/>>.

SHAFFER, M. et al. DRAM for distilling microbial metabolism to automate the curation of microbiome function. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. 16, p. 8883–8900, 18 set. 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/48/16/8883/5884738?login=false>>.

SHAPLEIGH, J. P. Denitrifying Prokaryotes. In: ROSENBERG, E. et al. (eds). **The Prokaryotes**, p. 405–425, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-30141-4_71>. Acesso em: 04 fev. 2023.

SHARP, J. H. The distributions of inorganic nitrogen and dissolved and particulate organic nitrogen in the sea. In: CARPENTER, E. G.; CAPONE, D. G. (eds) **Nitrogen in the Marine Environment**, p. 1–35, 1983. Academic Press, New York

SHEARS, J. H.; WOOD, P. M. Spectroscopic evidence for a photosensitive oxygenated state of ammonia mono-oxygenase. **Biochemical Journal**, v. 226, n. 2, p. 499–507, 1 mar. 1985. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1144737/>>. Acesso em: 03 jan. 2023.

SHEN, J.-P. et al. A review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chinese soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00296/full>>. Acesso em: 06 fev. 2023.

SHI, Y. et al. Effect of salinity on the community structure and ecological functions of Archaea in Liaohe Estuary. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 675, n. 1,

p. 012016, 1 fev. 2021. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/675/1/012016>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

SIEBER, C. M. K. et al. Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy. **Nature microbiology**, v. 3, n. 7, p. 836–843, 28 maio 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41564-018-0171-1>>.

SIGNORI, C. N. et al. Microbial diversity and community structure across environmental gradients in Bransfield Strait, Western Antarctic Peninsula. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 647, p. 1-12, dez. 2014. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00647/full>>. Acesso em: 21 dez. 2018.

SILVA, M. P. 1995. Caracterização físico-química das massas de água da Baía de Santos durante o projeto COROAS. Verão e Inverno de 1993. 1995. 135f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Oceanografia, Oceanografia, Universidade de São Paulo, 1995.

SILVEIRA, I. C. A. DA et al. A corrente do Brasil ao largo da costa leste brasileira. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 48, n. 2, p. 171–183, 2000.

SIMPSON, G. L. et al. **permute**: Functions for Generating Restricted Permutations of Data. 2022. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=permute>>.

SINTES, E. et al. Archaeal amo A gene diversity points to distinct biogeography of ammonia-oxidizing Crenarchaeota in the ocean. **Wiley Environmental Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 1647–1658, mai. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3712475/>>.

SINTES, E. et al. Geographic Distribution of Archaeal Ammonia Oxidizing Ecotypes in the Atlantic Ocean. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 9 fev. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4746290/>>. Acesso em: 06 dez. 2018.

SMITH, J. M.; CHAVEZ, F. P.; FRANCIS, C. A. Ammonium Uptake by Phytoplankton Regulates Nitrification in the Sunlit Ocean. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108173, 24 set. 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0108173>>. Acesso em: 05 jan. 2023.

SMITH, J. W. et al. Differential contributions of archaeal ammonia oxidizer ecotypes to nitrification in coastal surface waters. **The ISME Journal**, v. 8, n. 8, p. 1704–1714, 20 fev. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4817602/>>.

SOLER-JOFRA, A.; PÉREZ, J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Hydroxylamine and the nitrogen cycle: A review. **Water Research**, v. 190, p. 116723, fev. 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135420312574>>. Acesso em: 03 fev. 2023.

SOLLAI, M. et al. Archaeal Sources of Intact Membrane Lipid Biomarkers in the Oxygen Deficient Zone of the Eastern Tropical South Pacific. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 11 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00765/full>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

SONG, G.-W. et al. Anammox, denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in the East China Sea sediment. **Biogeosciences**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 6851–6864, 2013. Disponível em: <https://bg.copernicus.org/articles/10/6851/2013/>. Acesso em: 3 jul. 2023.

SOUZA, M. C. A. A Corrente do Brasil ao largo de Santos: medições diretas. 2000. 178f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Oceanografia Física, Oceanografia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/21/21132/tde-10092003-094250/publico/Dissertacao_MariaCristina.pdf>. Acesso em: 2 nov. 2022.

SPANG, A. et al. The genome of the ammonia-oxidizing *Candidatus Nitrososphaera gargensis*: insights into metabolic versatility and environmental adaptations. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 12, p. 3122–3145, 12 out. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23057602/>>. Acesso em: 27 mar. 2019.

SPETH, D. R. et al. Draft Genome of *Scalindua rubra*, Obtained from the Interface Above the Discovery Deep Brine in the Red Sea, Sheds Light on Potential Salt Adaptation Strategies in Anammox Bacteria. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 1, p. 1–5, 10 jan. 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-017-0929-7>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

SPIECK, E. et al. Defining Culture Conditions for the Hidden Nitrite-Oxidizing Bacterium Nitrolancea. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 10 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01522/full>>. Acesso em: 05 fev. 2023.

SRITHEP, P. et al. Communities of ammonia-oxidizing bacteria, ammonia-oxidizing archaea and nitrite-oxidizing bacteria in shrimp ponds. **BMC**, [s.l.], v. 65, n. 1, p. 267–278, abr. 2014. Disponível em: <https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13213-014-0858-3#Sec2>. Acesso em: 1 ago. 2023.

STAHL, D. A.; de la TORRE, J. R. Physiology and Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.83-101, out. 2012. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150128>. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-micro-092611-150128>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

STEIN, L. Y. Insights into the physiology of ammonia-oxidizing microorganisms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 49, p. 9–15, abr. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30236860/>>. Acesso em: 07 fev. 2023.

STEIN, L. Y.; ARP, D. J. Loss of Ammonia Monooxygenase Activity in Nitrosomonas europaea upon Exposure to Nitrite. **Applied and Environmental**, [s.l.], v. 64, n. 10, p. 4098-4102, out. 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106612/>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. The nitrogen cycle. **Current Biology**, [s.l.], v. 26, n. 3, p. 94-98, fev. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26859274/>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

STEIN, L. Y.; YUNG, Y. L. Production, isotopic composition, and atmospheric fate of biologically produced nitrous oxide. **Annual Review of Earth Planetary Sciences**, v. 31, p. 329–356, jan. 2003. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.earth.31.110502.080901>>. Acesso em: 03 fev. 2023.

STEMPFHUBER, B. et al. Spatial Interaction of Archaeal Ammonia-Oxidizers and Nitrite-Oxidizing Bacteria in an Unfertilized Grassland Soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 22 jan. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26834718/>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

STIEGLMEIER, M. et al. Nitrososphaera viennensis gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum Thaumarchaeota. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt_8, p. 2738–2752, 1 ago. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4129164/>>. Acesso em: 01 abr. 2020.

STIEGLMEIER, M.; ALVES, R. J. E.; SCHLEPER, C. The phylum thaumarchaeota. In: **The prokaryotes**. Berlim: Springer, 2014. p. 347-362. Disponível em: <https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-642-38954-2_338>. Acesso em: 6 out. 2018.

STRAMMA, L.; ENGLAND, M. On the water masses and mean circulation of the South Atlantic Ocean. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 104, n. C9, p. 20863–20883, 15 set. 1999. Disponível em: <<https://agupubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1029/1999JC900139>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

STROUS, M. et al. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. **Nature**, v. 440, n. 7085, p. 790–794, abr. 2006. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature04647>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

STROUS, M. et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 446–449, jul. 1999. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/22749>>. Acesso em: 27 jan. 2023.

SUBRAMANIAM, A. et al. Detecting Trichodesmium blooms in SeaWiFS imagery. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 49, n. 1-3, p. 107–121, jan. 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0967064501000960>>. Acesso em: 02 fev. 2023.

SUN, W. et al. Distribution, Diversity, and Abundance of Nitrite Oxidizing Bacteria in the Subterranean Estuary of the Daya Bay. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, 17 fev. 2022. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2022.822939/full>>.

SUNAGAWA, S. et al. Structure and function of the global ocean microbiome. **Science**, v. 348, n. 6237, 22 maio 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25999513/>>. Acesso em: 08 nov. 2022.

SUNAGAWA, S. et al. Structure and function of the global ocean microbiome. **Science**, v. 348, n. 6237, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25999513/>>. Acesso em: 08 nov. 2022.

SWAN, B. K. et al. Genomic and Metabolic Diversity of Marine Group I Thaumarchaeota in the Mesopelagic of Two Subtropical Gyres. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95380, 17 abr. 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0095380>>. Acesso em: 01 mai. 2019.

TAGLIARO, G.; JOVANE, L. O relevo oceânico. In: HARARI, J. (org.). *Noções de Oceanografia*. São Paulo: Instituto Oceanográfico, 2021. E-book. Cap. 3: p. 71-84

TANG, W. et al. Revisiting the distribution of oceanic N₂ fixation and estimating diazotrophic contribution to marine production. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 19 fev. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-019-08640-0>>. Acesso em: 02 fev. 2023.

TEIRA, E. et al. Distribution and activity of Bacteria and Archaea in the deep water masses of the North Atlantic. **Limnology and Oceanography**, v. 51, n. 5, p. 2131–2144, 1 set. 2006. Disponível em: <<https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.4319/lo.2006.51.5.2131>>. Acesso em: 03 jan. 2023.

TIEDJE, J. M. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: ZEHNDER, A. J. B. (ed.). **Environmental Microbiology of anaerobes**. John Wiley and Sons, Nova Iorque, p. 179-244, 1988. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/James-Tiedje/publication/255948382_Ecology_of_denitrification_and_dissimilatory_nitrate_reduction_to_ammonium/links/557073be08ae7d0f5f90188d/Ecology-of-denitrification-and-dissimilatory-nitrate-reduction-to-ammonium.pdf>.

TOLAR, B. B. Oxidation of urea-derived nitrogen by thaumarchaeota-dominated marine nitrifying communities. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 19, n. 12, p. 4838-4850, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1462-2920.13457>>. Acesso em: 30 out. 2018.

TOLAR, B. B.; KING, G. M.; HOLLIBAUGH, J. T. An Analysis of Thaumarchaeota Populations from the Northern Gulf of Mexico. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3620491/>>. Acesso em: 30 set. 2021.

TOMLINSON, G. A.; JAHNKE, L. L.; HOCHSTEIN, L. I. *Halobacterium denitrificans* sp. nov., an Extremely Halophilic Denitrifying Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 66–70, 1 jan. 1986. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11542071/#:~:text=Halobacterium%20denitrificans%20was%20one%20of,by%20the%20production%20of%20dinitrogen.>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

TOURNA, M. et al. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 20, p. 8420–8425, 27 abr. 2011. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1013488108>>. Acesso em: 06 out. 2018.

TSUKAYAMA, P. et al. A FRET-Based Real-Time PCR Assay to Identify the Main Causal Agents of New World Tegumentary Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, p. e1956, 3 jan. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23301111/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. The lagoon region and estuary ecosystem of Cananéia, Brazil. In: SEELIGER, U.; KJERFVE, B (eds.). **Coastal marine ecosystems of Latin America**. 1 ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001, cap 9, p. 119-130. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-662-04482-7.pdf>>. Acesso em: 09 ago. 2021.

URAKAMI, T. et al. Characterization and Description of *Hyphomicrobium denitrificans* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 3, p. 528–532, 1 jul. 1995.

Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-45-3-528>. Acesso em: 04 fev. 2023.

VAJRALA, N. et al. Hydroxylamine as an intermediate in ammonia oxidation by globally abundant marine archaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 3, p. 1006–1011, 31 dez. 2012. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1214272110>. Acesso em: 01 mai. 2019.

VALENTIN, J. L.; ANDRE, D. L.; JACOB, S. A. Hydrobiology in the Cabo Frio (Brazil) upwelling: two-dimensional structure and variability during a wind cycle. In: **Continental Shelf Research**, FONES, G.; VALLE-LEVINSON, A. (eds.) v. 7, n. 1, p. 77–88, jan. 1987. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0278434387900653>. Acesso em: 16 jan. 2023.

VAN DE VOSSENBERG, J. et al. Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 3120–3129, nov. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18462401/>. Acesso em: 04 fev. 2023.

VAN DEN BERG et al. Fermentative Bacteria Influence the Competition between Denitrifiers and DNRA Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 5 set. 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01684/full>. Acesso em: 6 jul. 2023.

VAN KESSEL, M. A. H. J. et al. Complete nitrification by a single microorganism. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 555–559, 26 nov. 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature16459>. Acesso em: 05 fev. 2023.

VAN NIFTRIK, L.; JETTEN, M. S. M. Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria: Unique Microorganisms with Exceptional Properties. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 3, p. 585–596, set. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22933561/>. Acesso em: 04 fev. 2023.

VARELA, M. et al. Latitudinal trends of Crenarchaeota and Bacteria in the meso- and bathypelagic water masses of the Eastern North Atlantic. **Environmental Microbiology**, v. 0, n. 0, p. 110-124, jan. 2008. Disponível em: <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-2920.2007.01437.x>. Acesso em: 03 jan. 2023.

VIANA, R. P. C. Impactos da halocinese na interpretação sísmica em uma porção distal da Bacia de Santos. 2018. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Geociências, Geologia e Geofísica, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/328925581_IMPACTOS_DA_HALOCINESE_N_A_INTERPRETACAO_SISMICA_EM_UMA_PORCAO_DISTAL_DA_BACIA_DE_SANTOS. Acesso em: 09 mai. 2019.

VIEIRA, R. F. Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas. Brasília, DF: **Embrapa**, p. 41-42, 2017.

VIEIRA, C. M. Nutrientes como traçadores químicos de massas de água e indicadores de processos biogeoquímicos ao longo de uma seção transversal na costa sul do Brasil. 2018. 111 f. Tese (Doutorado) – Curso de Oceanografia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/21/21137/tde-01022019-103250/pt-br.php>>.

VISSERS, E. W. et al. Seasonal and vertical distribution of putative ammonia-oxidizing thaumarchaeotal communities in an oligotrophic lake. **FEMS Microbiology Ecology**, [s.l.], v. 83, n. 2, p.515-526, nov. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22984895>>. Acesso em: 27 mar. 2019.

VOSS et al. The marine nitrogen cycle: recent discoveries, uncertainties and the potential relevance of climate change. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, [s.l.], v. 368, n. 1621, p. 1-11, jul. 2013. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rstb.2013.0121> >. Acesso em: 09 jun. 2021.

WALKER, C. B. et al. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 19, p. 8818–8823, 26 abr. 2010. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0913533107>>. Acesso em: 06 out. 2018.

WALSH, C. Naturally occurring 5-deazaflavin coenzymes: biological redox roles. **Accounts of Chemical Research**, v. 19, n. 7, p. 216–221, 1986. doi:10.1021/ar00127a004

WALSH, E. A. et al. Bacterial diversity and community composition from seasurface to seafloor. **The ISME Journal**, v. 10, n. 4, p. 979–989, 2 out. 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ismej2015175>>. Acesso em: 25 dez. 2022.

WAN, Z. et al. A Melting Curve-Based Multiplex RT-qPCR Assay for Simultaneous Detection of Four Human Coronaviruses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, p. 1880, 23 nov. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27886052/>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

WANG, J. et al. Archaea Dominate the Ammonia-Oxidizing Community in Deep-Sea Sediments of the Eastern Indian Ocean—from the Equator to the Bay of Bengal. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 16 mar. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5352681/>>. Acesso em: 17 mai. 2021.

WANG, M. et al. Diversity of Pelagic and Benthic Bacterial Assemblages in the Western Pacific Ocean. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 10 set. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7533643/>>. Acesso em: 28 dez. 2022.

WANG, Y.; LI, Q. Competition and interaction between DNRA and denitrification in composting ecosystems: insights from metagenomic analysis. **Bioresource Technology**, v. 381, p. 129140–129140, 1 ago. 2023. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852423005667#b0085>>. Acesso em: 6 jul. 2023.

WARD, B. B. et al. Denitrification as the dominant nitrogen loss process in the Arabian Sea. **Nature**, v. 461, n. 7260, p. 78–81, set. 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature08276>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

WATSON, S. W. et al. *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. **Archives of Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 1–7, fev. 1986. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00454947>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

WAYNE, L. G. et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International journal of systematic bacteriol.**, v. 37, n. 4, p. 463-464, out. 1987.

WEERTH, R. S.; DAILEY, JR., H. A.; MEDLOCK, A. E. Cofactors and Coenzymes | Porphyrin Metabolism in Prokaryotes. In: **Encyclopedia of Biological Chemistry III**, JEZ, J. (ed.), p. 386–394, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012819460700075X>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

WEI, T.; SIMKO, V. R package corrplot: Visualization of a correlation matrix. 2021. Disponível em: <<https://github.com/taiyun/corrplot>>.

WEMHEUER, F. et al. Primary Production in the Water Column as Major Structuring Element of the Biogeographical Distribution and Function of Archaea in Deep-Sea Sediments of the Central Pacific Ocean. *Archaea*. **Hindawi Archaea**, [s. l.], v. 2019, p. 1–12, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6421829/>>. Acesso em: 13 jul. 2023.

WICKHAM, H. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. **SpringerLink**, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-24277-4>>.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, nov. 1977. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.74.11.5088>>. Acesso em: 07 fev. 2023.

WOESE, C. R.; MAGRUM, L. J.; FOX, G. E. Archaeobacteria. **Journal of Molecular Evolution**, v. 11, n. 3, p. 245–252, set. 1978. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01734485>>. Acesso em: 06 fev. 2023.

WU, C. et al. Nitrogen Fixation by *Trichodesmium* and unicellular diazotrophs in the northern South China Sea and the Kuroshio in summer. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 5 fev. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-20743-0>>. Acesso em: 02 fev. 2023.

WU, J. et al. Niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea and related autotrophic carbon fixation potential in the water column of the South China Sea. **iScience**, v. 25, n. 5, p. 104333, maio 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004222006046>>. Acesso em: 27 dez. 2022.

WU, L. et al. Cooperation between partial-nitrification, complete ammonia oxidation (comammox), and anaerobic ammonia oxidation (anammox) in sludge digestion liquid for nitrogen removal. **Environmental Pollution**, v. 254, p. 112965, nov. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31401520/>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

WU, Y.; SIMMONS, B. A.; SINGER, S. W. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 32, n. 4, p. 605–607,

15 fev. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/32/4/605/1744462?login=false>>.

XIA, F. et al. Ubiquity and Diversity of Complete Ammonia Oxidizers (Comammox). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 24, 15 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30315079/>>. Acesso em: 05 fev. 2023.

YAKIMOV, M. M. et al. Contribution of crenarchaeal autotrophic ammonia oxidizers to the dark primary production in Tyrrhenian deep waters (Central Mediterranean Sea). **The ISME Journal**, v. 5, n. 6, p. 945–961, 6 jan. 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ismej2010197>>. Acesso em: 25 abr. 2020.

YANG, X. et al. Niche differentiation among comammox (*Nitrospira inopinata*) and other metabolically distinct nitrifiers. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 14 set. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36187961/>>. Acesso em: 03 out. 2022.

YILMAZ, P. et al. Expanding the World of Marine Bacterial and Archaeal Clades. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 8 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4705458/>>. Acesso em: 28 dez. 2022.

YU, T. et al. Difference of nitrogen-cycling microbes between shallow bay and deep-sea sediments in the South China Sea. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 447–459, nov. 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-017-8594-9>>. Acesso em: 25 dez. 2022.

ZEHR, J. P. Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 162–173, abr. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X10002155>>. Acesso em: 02 fev. 2023.

ZEHR, J. P.; KUDELA, R. M. Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems. **Annual Review of Marine Science**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 197-225, jan. 2011. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-marine-120709-142819>>. Acesso em: 31 jan. 2021.

ZEHR, J. P.; MELLON, M. T.; ZANI, S. New Nitrogen-Fixing Microorganisms Detected in Oligotrophic Oceans by Amplification of Nitrogenase (*nifH*) Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3444–3450, set. 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9726895/>>. Acesso em: 02 fev. 2023.

ZENG, X.; ALAIN, K.; SHAO, Z. Microorganisms from deep-sea hydrothermal vents. **Marine Life Science & Technology**, v. 3, n. 2, p. 204–230, 22 jan. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s42995-020-00086-4>>. Acesso em: 05 abr. 2021.

ZHALNINA, K. V. et al. Genome sequence of *Candidatus Nitrososphaera evergladensis* from group I.1b enriched from Everglades soil reveals novel genomic features of the ammonia-oxidizing archaea. **PLoS ONE**, [s.l.], v.9, n. 7, p. 1-15, jul. 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0101648>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

ZHANG, C.-J. et al. Diversity, metabolism and cultivation of archaea in mangrove ecosystems. **Marine Life Science & Technology**, v. 3, n. 2, p. 252–262, 2 dez. 2020.

Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s42995-020-00081-9>>. Acesso em: 31 mai. 2022.

ZHANG, G. I.; HWANG, C. Y.; CHO, B. C. *Thalassobaculum litoreum* gen. nov., sp. nov., a member of the family Rhodospirillaceae isolated from coastal seawater. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 58, n. 2, p. 479–485, 1 fev. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18218953/>>.

ZHANG, W. et al. Toward Understanding the Dynamics of Microbial Communities in an Estuarine System. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e94449, 14 abr. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24732211/>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

ZHANG, X. et al. Metagenomics Reveals Microbial Diversity and Metabolic Potentials of Seawater and Surface Sediment From a Hadal Biosphere at the Yap Trench. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 12 out. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30369913/>>. Acesso em: 01 jun. 2021.

ZHAO, R. et al. Nitrifier abundance and diversity peak at deep redox transition zones. **Nature**, [s. l.], v. 9, n. 1, jun. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-019-44585-6>>. Acesso em: 16 jul. 2023.

ZHAO, R. et al. Ammonia-oxidizing archaea have similar power requirements in diverse marine oxic sediments. **The ISME Journal**, v. 15, n. 12, p. 3657–3667, 1 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41396-021-01041-6>>. Acesso em: 27 dez. 2022.

ZHAO, R. et al. Indigenous Ammonia-Oxidizing Archaea in Oxic Subseafloor Oceanic Crust. **mSystems**, [s. l.], v. 5, n. 2, mar. 2020. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/mSystems.00758-19>>. Acesso em: 16 jul. 2023.

ZHONG, H. et al. Novel insights into the Thaumarchaeota in the deepest oceans: their metabolism and potential adaptation mechanisms. **Microbiome**, v. 8, n. 1, 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-020-00849-2>>. Acesso em: 20 mai. 2020.

ZHU, D. et al. Microbial diversity and community structure in deep-sea sediments of South Indian Ocean. **Environmental Science and pollution research**, [s. l.], v. 29, n. 30, p. 45793–45807, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-022-19157-3?error=cookies_not_supported&code=f526ccfa-3995-41d2-aa3a-52b592ab00e2>. Acesso em: 15 jul. 2023.

ZIMMER, W.; STEPHAN, M. P.; BOTHE, H. Denitrification by *Azospirillum brasilense* Sp 7. **Archives of Microbiology**, v. 138, n. 3, p. 206–211, jul. 1984. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00402121>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

ZOU, D. et al. Genomic Characteristics of a Novel Species of Ammonia-Oxidizing Archaea from the Jiulong River Estuary. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 18, set. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32631866/>>. Acesso em: 07 out. 2020.

ZOU, D.; LIU, H.; LI, M. Community, Distribution, and Ecological Roles of Estuarine Archaea. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 2060, p. 1-18, ago. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.02060/full>>. Acesso em: 01 set. 2020.

ANEXO 1

O meio basal *Fresh Water*, após adicionados os reagentes e homogeneizado o meio foi autoclavado e armazenado à 4°C (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Concentrações dos componentes do meio basal *Fresh Water* (concentração final 10x).

Reagente/Solução	Concentração final	Volume final
Cloreto de sódio	171,1 mM	5 g
Cloreto de potássio	67 mM	2,5 g
Cloreto de magnésio	19,6 mM	2 g
Fosfato de potássio monobásico	14,7 mM	1 g
Cloreto de cálcio	6,8 mM	0,5 g
Água Milli Q	-	500 mL

Fonte: JUNG et al., 2011.

Para a solução vitamina foram adicionados os reagentes, homogeneizado, e depois foi filtrado e armazenado à 4°C no escuro, frasco coberto com papel alumínio (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Concentrações dos componentes da solução vitamina.

Reagente/Solução	Concentração final	Volume final
Cloreto de colina	14,32 mM	1 g
Pirodoxina HCl	0,48 mM	0,05 g
Tiamina HCl	0,14 mM	0,025 g
Riboflavina	0,13 mM	0,025 g
Ácido Nicotínico	0,40 mM	0,025 g
Ácido D-pantotênico	0,20 mM	0,025 g
Ácido 4-aminobenzóico	0,36 mM	0,025 g
Biotina	0,08 mM	0,01 g
Ácido fólico	0,04 mM	0,01 g
Vitamina B12	0,007 mM	0,005 g
Água Milli Q	-	500 mL

Para a solução de elementos traços foram adicionados os reagentes, homogeneizado, e depois foi filtrado e armazenado à 4°C no escuro, frasco coberto com papel alumínio (Tabela 2.4)

Tabela 2.4 – Concentrações dos componentes da solução de elementos traços.

Reagente/Solução	Concentração final	Volume final
Cloreto de cobalto	0,8 mM	47,5 mg
Sulfato de zinco	0,5 mM	36 mg
Cloreto de manganês	0,5 mM	25 mg
Ácido bórico	0,5 mM	7,5 mg
Cloreto de níquel	0,1 mM	6 mg
Cloreto de cobre	0,01 mM	0,5 mg
Ácido Clorídrico	100 mM	2 mL
Água Milli Q	-	246,75 mL

ANEXO 2

A determinação colorimétrica da concentração de nitrito foi produzida a partir da curva de calibração (Tabela 2.5) com a solução de nitrito de sódio (NaNO_2). As amostras foram preparadas em tubo de eppendorf com adição de adicionando o meio basal *Fresh Water* na concentração de 1x (780 μL) e 20 μL de cultura. Para a colorimetria foi adicionado solução de sulfanilamida/NED (200 μL) nos tubos com a curva de calibração e nas amostras. Após agitado os tubos e foram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente, no escuro. A leitura foi realizada em cubeta e ajustada a medida de absorbância para 545 nm no aparelho Denovix DS-11 FX (DeNovix Inc.).

Tabela 2.5 – Curva de calibração para determinação da concentração de nitrito nas culturas por enriquecimento de arqueias oxidadoras de amônia.

Concentração do padrão	Meio Fresh Water (1x)	Solução de calibração NaNO_2
1000 μM	780 μL	20 μL
800 μM	784 μL	16 μL
400 μM	792 μL	8 μL
200 μM	796 μL	4 μL
100 μM	798 μL	2 μL
50 μM	799 μL	1 μL
0 μM	800 μL	0 μL

Para a determinação de amônio, inicialmente foi produzida a curva de calibração (Tabela 2.6) com a solução de cloreto de amônia (NH_4Cl) (1mM). O preparo das amostras foi realizado em tubo de eppendorf adicionando o meio basal *Fresh Water* na concentração de 1x (400 μL) e 200 μL de amostra da cultura. Ao final dessa etapa foram adicionados, em todos os padrões e nas culturas, o reagente COR (300 μL) e a solução de oxidação (120 μL). Homogeneizado e incubado durante 30 minutos em temperatura ambiente, no escuro. Realizada a leitura em cubeta e ajustada a medida de absorbância para 660 nm no aparelho Denovix DS-11 FX (DeNovix Inc.).

Tabela 2.6 – Curva de calibração para determinação da concentração de amônio nas culturas por enriquecimento de arqueias oxidadoras de amônia.

Concentração do padrão	Meio Fresh Water (1x)	Solução de calibração NH_4Cl
1000 μM	400 μL	200 μL
800 μM	440 μL	160 μL
400 μM	520 μL	80 μL
200 μM	560 μL	40 μL
100 μM	580 μL	20 μL
50 μM	590 μL	10 μL
25 μM	595 μL	5 μL
0 μM	600 μL	0 μL

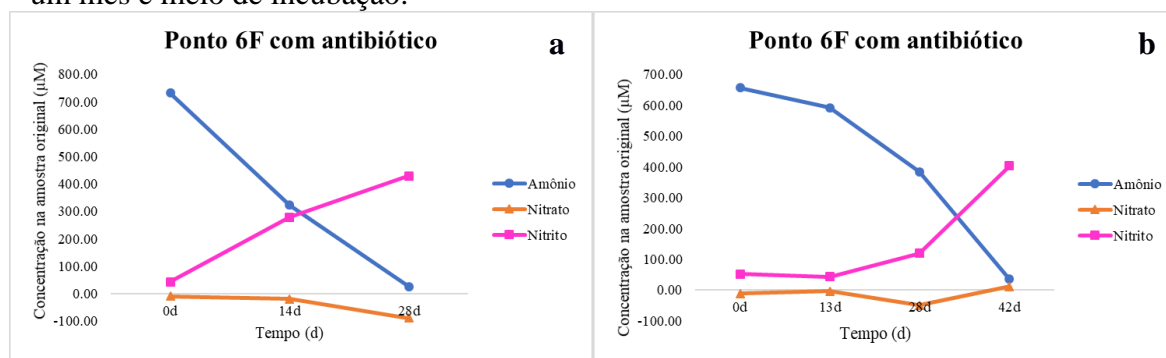
A quantificação da concentração de nitrato foi preparada a curva de calibração (Tabela 2.7) com a solução de nitrato de sódio (NaNO_3) ($100\mu\text{M}$). Preparo das amostras com a adição do $780\mu\text{L}$ meio basal *Fresh Water* na concentração de 1x ($270\mu\text{l}$) e $30\mu\text{L}$ de amostra. Adicionado nos padrões e nas amostras o reagente 1 ($300\mu\text{L}$) e reagente 2 ($300\mu\text{L}$). Homogeneizado e incubado durante 90 minutos à 37°C , no escuro. A leitura foi realizada com auxílio de cubeta e ajustada a medida de absorbância para 540nm no aparelho Denovix DS-11 FX (DeNovix Inc.).

Tabela 2.7 – Curva de calibração para determinação da concentração de nitrato nas culturas por enriquecimento de arqueias oxidadoras de amônia.

Concentração do padrão	Meio Fresh Water (1x)	Solução de calibração NaNO_3
1 - $100\mu\text{M}$	$0\mu\text{L}$	$300\mu\text{L}$
2 - $50\mu\text{M}$	$300\mu\text{L}$	$300\mu\text{L}$
3 - $25\mu\text{M}$	$300\mu\text{L}$	$300\mu\text{L}$ de 2
4 - $12.5\mu\text{M}$	$300\mu\text{L}$	$300\mu\text{L}$ de 3
5 - $6.25\mu\text{M}$	$300\mu\text{L}$	$300\mu\text{L}$ de 4
6 - $3.125\mu\text{M}$	$300\mu\text{L}$	$300\mu\text{L}$ de 5
7 - $1.5625\mu\text{M}$	$300\mu\text{L}$	$300\mu\text{L}$ de 6
8 - $0\mu\text{M}$	$300\mu\text{L}$	$0\mu\text{L}$

ANEXO 3

Figura 40 – Gráficos de determinação colorimétrica de amônio, nitrito e nitrato do cultivo ponto 6-fundo sob o tratamento com adição de antibiótico nos períodos de: a – um mês de incubação, b – um mês e meio de incubação.



Fonte: Alice de Moura Emílio, 2021.