

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – CAMPUS MACAÉ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E CONSERVAÇÃO
(PPGCiAC)

**EFEITO DO BIORREVOLVIMENTO DE
Campsurus sp. EATON, 1868 (EPHEMEROPTERA:
POLYMITARCYIDAE) SOBRE A DENSIDADE
TOTAL BACTERIANA E DE METANOTRÓFICAS
NA INTERFACE SEDIMENTO-ÁGUA**

Orlando de Marques Vogelbacher

2017



UFRJ

EFEITO DO BIORREVOLVIMENTO DE
***Campsurus* sp. EATON, 1868 (EPHEMEROPTERA:**
POLYMITARCYIDAE) SOBRE A DENSIDADE
TOTAL BACTERIANA E DE METANOTRÓFICAS
NA INTERFACE SEDIMENTO-ÁGUA

Orlando de Marques Vogelbacher

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Orientador: Marcos Paulo Figueiredo de Barros

Co-Orientadora: Analy Machado de Oliveira Leite

Macaé

Agosto, 2017

**EFEITO DO BIORREVOLVIMENTO DE
Campsurus sp. EATON, 1868 (EPHEMEROPTERA:
POLYMITARCYIDAE) SOBRE A DENSIDADE
TOTAL BACTERIANA E DE METANOTRÓFICAS
NA INTERFACE SEDIMENTO-ÁGUA**

Orlando de Marques Vogelbacher

Orientador: Marcos Paulo Figueiredo de Barros

Co-Orientadora: Analy Machado de Oliveira Leite

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Aprovado por:

Presidente, Prof. Marcos Paulo Figueiredo de Barros

Titular interno, Prof. José Luciano Nepomuceno da Silva

Titular externo, Prof. Emiliano Nicolas Calderon

Macaé, RJ

Agosto, 2017

Vogelbacher, Orlando de Marques

Efeito do biorrevolvimento de *Campsurus* sp. Eaton, 1868 (Ephemeroptera: Polymitarcyidae) sobre a densidade total bacteriana e de metanotróficas na interface sedimento-água/ Orlando de Marques Vogelbacher – Macaé: 2016.

xx, 105f.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Marcos Paulo Figueiredo de Barros

Co-Orientadora: Anely Machado de Oliveira Leite

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, 2017.

Referências Bibliográficas: f. 89-105.

1. Bioturbação. 2. Metanotróficas. 3. *Campsurus* sp. 4. FISH. 5. qPCR.

I. Figueiredo-Barros, Marcos Paulo. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação. III. Efeito do biorrevolvimento de *Campsurus* sp. Eaton, 1868 (Ephemeroptera: Polymitarcyidae) sobre a densidade total bacteriana e de metanotróficas na interface sedimento-água

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais (**Orlando** e **Maria Imaculada**) qualquer tentativa de agradecimento não seria suficiente. Mesmo assim, é com imenso carinho que dedico este espaço a vocês que fizeram da minha vida às suas. Eu amo vocês. Muito obrigado!

Ao Marquinhos (**Figueiredo-Barros, M. P.**), meu orientador e companheiro de JURUBATIME, por ter me acolhido no laboratório de limnologia em 2011 e por ter aberto novamente as portas em 2014, e mais que isso, pelo incentivo e a confiança depositados para que eu prestasse as provas do mestrado. Obrigado por ter me proporcionado todas as ferramentas para uma formação acadêmica plena, assim como agradeço também pelo estímulo ao crescimento pessoal através de todas as “chamadas” que eu merecidamente tenha tomado ao longo destes anos. Agradeço ainda por ter me concedido a oportunidade de realizar um sonho de infância, conhecer a Amazônia. Obrigado por tudo, sempre levarei comigo esse lugar “onde se formam Jequitibás”...

À **Thais Porto Barbosa**, meu agradecimento mais que especial, primeiramente por ser uma das pessoas mais maravilhosas que eu já conheci. Não tenho palavras para agradecer por tudo que fez por mim. Você participou diretamente dessa minha caminhada e sem a sua ajuda eu não estaria escrevendo estes agradecimentos agora. Obrigado por ter me ajudado, inclusive virando a noite no laboratório para me dar uma força com o experimento. Quando comecei a trabalhar com biologia molecular, estava completamente perdido, mas jamais poderia imaginar que o que eu iria encontrar, ou melhor, reencontrar, mudaria tanto a minha vida e me traria a paz que eu sinto hoje.

Ao meu amigo e companheiro de mestrado **Juan Gutierrez**, que veio ao Brasil só para trabalhar com as “conchas”, mas acabou tendo que me ajudar tanto nas coletas como no trabalho de laboratório durante o experimento. Agradeço também pelos dois anos de uma parceria de muitas histórias tão impublicáveis quanto inesquecíveis.

Ao meu amigo Carijó, menos conhecido como **Bruno Soares**, por ter despencado lá de Seropédica em meio a sua própria correria do mestrado só para me ajudar com o trabalho de laboratório. Obrigado pelas inúmeras demonstrações de amizade ao longo de todos esses anos de NUPEM. Muito obrigado, amigo!

Aos mentores **José Nepomuceno**, **Analy Leite** e **Paula Veronesi**, por encararem o desafio de ajudar um aluno completamente leigo em biologia molecular. Vocês foram fundamentais. Obrigado por todo apoio e paciência. Muita paciência. “Cadê o seu caderno de protocolo?”. “Zé, como calcula isso mesmo?”. Sério, vocês já podem fazer um macaco operar um foguete espacial sem maiores problemas.

O mesmo agradecimento se entende também à **Deborah Leite**, do Laboratório de Ecologia Molecular Microbiana pela ajuda imprescindível com os ensaios de qPCR.

À professora **Ana Petry**, pelas maravilhosas aulas de ecologia e por ter me tirado do limbo da ignorância em estatística, me ajudando significativamente ($P < 0,05$) nesta empreitada. Muito obrigado, professora!

Ao meu professor de biologia do ensino médio, **Paulo Corrêa**, que um dia chegou para mim e disse: “garoto, você tem potencial” e eu ingenuamente acreditei. Obrigado, mestre, essa vitória também é sua!

Aos amigos e companheiros de laboratório **Fabício Gonçalves** e **Guilherme Alfenas**, por sempre terem se mostrado tão solícitos desde os meus tempos de iniciação científica, agradeço imensamente por ter tido a oportunidade de aprender com vocês. Agradeço também por todo auxílio prestado em relação às análises do FISH.

Aos professores da banca, **José Nepomuceno** e **Emiliano Calderón**, primeiramente por terem prontamente aceitado o convite para compor a banca e depois pelas diversas sugestões que contribuíram de modo imensurável para o trabalho, assim como pela disponibilidade em ajudar ao longo de todo o processo. Muito obrigado!

Aos amigos do NUPEM/UFRJ, JURUBATIME UFRJ, da República do Formol e da República dos Piratas por fazerem destes 8 anos de Macaé uma experiência que levarei para o resto da vida. Especialmente os que dividi casa, **Cristian Oliveira** (vulgo “Ben 10”), **Lucas Lobo** (a.k.a. “Grilo”) e **Giovanni Torres** (o “Colômbia”). Também ao meu amigo-irmão, **Felipe Pereira**, que mesmo longe sempre se fez presente.

A toda comunidade barretense, por fazer eu me sentir em casa, e em especial ao seu **Zé Maria**, pela boa vontade em ajudar sempre que possível, e, é claro, por ter comercializado, em larga escala e a preços populares, aquela gelada que tantas alegrias já nos deu. Obrigado, Barretão, você me proporcionou muito mais do que eu merecia!

Aos amigos de laboratório **Rodrigo Felix, Maria Silvina, Roberto Farias, Thaís Steigleder, Kayza Freitas, Larissa Guimarães, Larissa Corrêa, Vanessa Cordeiro, João Gabano, Mariana Andrade, Enoque Ribeiro, Thiago Martins, Mariana Hughet, Raquel Benac, Alejandra Huérfano, Amanda Vitória, Cátia Mendes, Rodolfo Nascimento, Natalie Prates, Letícia Brito e Maycon Granados**, pelas inúmeras contribuições a pesquisa e descontraídas conversas pós-almoço. Igualmente as pessoas diretamente ligadas ao laboratório e que em muito contribuíram para este trabalho, **João Marcelo, Izabella da Silva e Bruno Fortes**.

Aos demais companheiros e ex-companheiros de laboratório, tanto do Rio como de Macaé, pelas trocas de experiências e harmoniosa convivência ao longo destes anos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação - PPG-CiAC** e à **Coordenadoria de Pessoal de Ensino Superior – CAPES** por tornarem possível a realização desta pesquisa.

A todos os professores e funcionários do **NUPEM/UFRJ**, muito obrigado pelos inúmeros ensinamentos e dedicação ao longo de todos esses anos. Como diria o Chico, “o NUPEM é uma fábrica de sonhos”. Obrigado por fazerem do meu uma realidade.

Aos mentores acadêmicos de gerações e mais gerações de novos cientistas, **Francisco de Assis Esteves e Reinaldo Luiz Bozelli**, por serem uma fonte inesgotável de inspiração.

Por fim, gostaria de fazer um agradecimento especial também aos grandes “bioturbadores” do país, **João José Fonseca Leal, Adriano Caliman Ferreira da Silva e Marcos Paulo Figueiredo de Barros**. Seus trabalhos serviram de grande inspiração e eu espero que esta pesquisa possa refletir um pouco da minha admiração pelo trabalho que vocês desempenharam

Espero que este trabalho, a despeito de suas fragilidades e óbvias limitações, possa representar uma carta de amor a esta fascinante linha de pesquisa e “amarrar” o trabalho de mais de uma geração de pesquisadores imbuídos nesse ciclo de pesquisa.

E como muito bem colocado por Figueiredo-Barros (2004; 2008)...

VIVA A BIOTURBAÇÃO!!!

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
1.1 O Metano em Ambientes Aquáticos.....	1
1.2 O Balanço Global de Metano.....	5
1.3 Bactérias Metanotróficas	9
1.4 Técnicas Moleculares em Ecologia Microbiana.....	12
1.5 Biorrevolvimento.....	16
1.6 Descrição das Espécies Utilizadas.....	19
1.7 Contextualização da Pesquisa.....	21
1.8 Hipótese e Objetivo	23
II. EXPERIMENTO 1	24
2.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
2.1.1 Área de Estudo.....	24
2.1.2 Procedimentos de Coleta e Acondicionamento	26
2.1.3 Desenho Experimental e Procedimentos de Incubação	28
2.1.4 Retirada de Alíquotas e Extração de DNA	28
2.1.5 FISH e Microscopia de Epifluorescência com DAPI.....	29
2.1.6 Análises Estatísticas.....	32
2.2 RESULTADOS	32
III. EXPERIMENTO 2	44
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1.1 Área de Estudo.....	44
3.1.2 Procedimentos de Coleta e Acondicionamento	45
3.1.3 Desenho Experimental e Procedimentos de Incubação	47
3.1.4 Retirada de Alíquotas e Extração de DNA	47
3.1.5 qPCR dos genes <i>rrs</i> e <i>pmoA</i>	49
3.1.6 Análises Estatísticas.....	51
3.2 RESULTADOS	52

3.2 Água.....	52
3.2 Sedimento	53
IV. DISCUSSÃO	67
4.1 EXPERIMENTO 1	67
4.2 EXPERIMENTO 2	73
4.3 DISCUSSÃO GERAL.....	79
V. CONCLUSÕES	87
VI. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	88
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Ilustração esquemática representando a natureza estratificada do sedimento, onde vias metabólicas distintas prevalecem de acordo com o poder oxidativo dos aceptores de elétrons e sua disponibilidade nos diferentes estratos. Na ausência do oxigênio, como é o caso das camadas mais profundas, arqueias metanogênicas produzem grandes quantidades de CH₄. Diferentes grupos metanotróficos, utilizando aceptores de elétrons distintos, promovem a oxidação do CH₄ produzido à medida que este difunde ao longo do perfil vertical do sedimento. Esse consórcio de microrganismos metanotróficos forma um biofiltro natural de CH₄ capaz de limitar significativamente a emissão deste gás para a atmosfera (Extraído de Vekeman, 2016). 8
- Figura 2: Padrão Corporal de uma ninfa do gênero *Campsurus*. Extraído do livro Ephemeroptera de América del sur (Domínguez, 2006). 20
- Figura 3: Mapa da localização geográfica do Lago Batata (PA, Brasil). A área hachurada do mapa (IM) equivale à área impactada pelo rejeito de bauxita, enquanto a área em branco corresponde à área natural do lago (NA). Imagem cedida por Elder Sodré. 25
- Figura 4: Esquema representativo do método utilizado para a incubação dos microcosmos. Os bastões magnéticos de cada tubo eram impulsionados por um ímã central que girava em função de um motor permitindo a homogeneização da coluna d'água dos microcosmos, seguindo metodologia descrita por Svensson (1998) e Leal *et al.* (2007). Esquema cedido por Marcos Paulo Figueiredo de Barros. 27
- Figura 5: Micrografias de epifluorescência com o auxílio do corante DAPI (A) e de hibridizações *in situ* fluorescentes com sondas específicas para bactérias metanotróficas (B). Aumento de 1.000x. Imagens correspondentes ao presente trabalho cedidas por Guilherme Alfenas. 31
- Figura 6: Densidade bacteriana nos diferentes tratamentos e estratos do sedimento. Cada barra representa média (n=3) ± o Desvio Padrão. Letras iguais indicam diferenças não significativas. “Controle” = tratamento controle e “*C. violaceus*” = tratamento com adição de *C. violaceus*. 34
- Figura 7: Densidade de bactérias metanotróficas nos diferentes tratamentos e estratos do sedimento. Cada barra representa média (n=3) ± o Desvio Padrão. Letras iguais indicam diferenças não significativas. “Controle” = tratamento controle e “*C. violaceus*” = tratamento com adição de *C. violaceus*. 34
- Figura 8: Percentual de bactérias metanotróficas nos diferentes tratamentos e estratos de sedimento. Cada barra representa média (n=3) ± o Desvio Padrão. Letras iguais indicam diferenças não significativas. “Controle” = tratamento controle e “*C. violaceus*” = tratamento com adição de *C. violaceus*. 38
- Figura 9: (A) *C. violaceus* forrageando o sedimento; (B) Vista superficial de um core com sedimento repleto de aberturas derivadas dos túneis criados por *C. violaceus*; (C) Esquema representando o túnel formado por *C. violaceus* e o fluxo de compostos que o biorrevolvimento promovido por estes organismos estimula na interface

sedimento-água. Esquema extraído de Leal (2003) e imagens cedidas por Marcos Paulo Figueiredo de Barros. 42

Figura 10: (A) Disposição dos microcosmos durante a fase de preparação do experimento; (B) Vista de um dos microcosmos do tratamento com adição de *C. violaceus* durante a fase de incubação sendo possível observar o túnel em forma de “U” escavado pelas ninfas; (C) Vista completa de um dos microcosmos utilizados; (D) Vista de um dos microcosmos do tratamento controle. A diferença de coloração do sedimento indica onde o oxigênio está presente. Nota-se na superfície do sedimento e por onde está localizado o tubo uma coloração que indica a oxidação de compostos orgânicos. Imagens cedidas por Marcos Paulo Figueiredo de Barros. 43

Figura 11: Mapa da localização geográfica da Lagoa do Vale Encantado (Macaé-RJ, Brasil). Modificado do Google Maps (<https://www.google.com.br/maps>), último acesso em 20-06-2017. 44

Figura 12: Esquema representativo do método utilizado para a incubação dos microcosmos. Mangueiras de silicone conduziam oxigênio fornecido pelas bombas de oxigenação para dentro dos microcosmos através de agulhas posicionadas pouco abaixo da superfície da coluna d’água. Adaptação de esquema cedido por Marcos Paulo Figueiredo de Barros. 46

Figura 13: Abundância de cópias do gene *rrs* (marcador para *Bacteria*) nos tratamentos controle inicial (CI), controle final (CF) e com adição de *C. truncatus* (CT). Linhas verticais indicam valores mínimos e máximos e as horizontais no interior da caixa são as medianas. As caixas representam 75% dos valores encontrados. Letras iguais indicam diferenças não significativas. Dados logaritimizadas. 54

Figura 14: Abundância de cópias do gene *pmoA* (marcador para metanotróficas) nos tratamentos controle inicial (CI), controle final (CF) e com adição de *C. truncatus* (CT). Linhas verticais indicam valores mínimos e máximos e as horizontais no interior da caixa são as medianas. As caixas representam 75% dos valores encontrados. Letras iguais indicam diferenças não significativas. Dados logaritimizadas. 55

Figura 15: Concentração de oxigênio na água nos tratamentos controle inicial (CI), controle final (CF) e com adição de *C. truncatus* (CT). Linhas verticais indicam valores mínimos e máximos e as horizontais no interior da caixa são as medianas. As caixas representam 75% dos valores encontrados. Letras iguais indicam diferenças não significativas. 56

Figura 16: Abundância de cópias do gene *rrs* (marcador para *Bacteria*) em diferentes profundidades do sedimento nos diferentes tratamentos. Cada barra representa média ($n = 3$ ou 4) \pm o Desvio Padrão. Letras iguais indicam diferenças não significativas. “*C. truncatus*” representa o tratamento com adição das ninfas. Dados transformados (\log_{10}). 59

Figura 17: Abundância de cópias do gene *pmoA* (marcador para metanotróficas) em diferentes profundidades do sedimento nos diferentes tratamentos. Cada barra representa média ($n = 3$ ou 4) \pm o Desvio Padrão. Letras iguais indicam diferenças não significativas. “*C. truncatus*” representa o tratamento com adição das ninfas. Dados transformados ($\sqrt{\quad}$). 59

Figura 18: Vista geral do experimento. Microcosmos do tratamento com adição de ninfas de *C. truncatus* à esquerda e microcosmos do tratamento controle à direita. Imagens correspondentes ao presente trabalho. 65

Figura 19: (A) Microcosmos do tratamento controle apresentam água translúcida; (B) Microcosmos do tratamento com *C. truncatus* apresentam água bastante turva; (C) Processo de separação dos estratos do sedimento; (D) Vista de cima da fatia superficial (0-1 cm) repleta de buracos feitos por *C. truncatus*. Imagens correspondentes ao presente trabalho. 66

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações dos reagentes empregados para composição dos tampões de lavagem e de hibridização. 31

Tabela 2: Resultados da análise de variância bi-fatorial (Two-way ANOVA) correspondente aos efeitos individuais e combinados da presença de *Campsurus violaceus* e da profundidade do sedimento na densidade bacteriana no sedimento. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados. 35

Tabela 3: Resultados da análise de variância bi-fatorial (Two-way ANOVA) correspondente aos efeitos individuais e combinados da presença de *Campsurus violaceus* e da profundidade do sedimento na densidade de metanotróficas no sedimento. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados. 35

Tabela 4: Resultados do pós-teste de Tukey para análise de variância referente à densidade bacteriana. Profundidades estão identificadas por letras, onde A = 0-1 cm, B = 1-2 cm, C = 2-4 e D = 4-6 cm. “Com” = tratamento com adição de *C. violaceus* e “Sem” = tratamento controle. 36

Tabela 5: Resultados do pós-teste de Tukey para a análise de variância referente à densidade de bactérias metanotróficas. Profundidades estão identificadas por letras, onde A = 0-1 cm, B = 1-2 cm, C = 2-4 e D = 4-6 cm. “Com” = tratamento com adição de *C. violaceus* e “Sem” = tratamento controle. 37

Tabela 6: Resultados da análise de variância bi-fatorial (Two-way ANOVA) correspondente aos efeitos individuais e combinados da presença de *Campsurus violaceus* e da profundidade do sedimento sobre o percentual de metanotróficas no sedimento. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados. 38

Tabela 7: Resultados do pós-teste de Tukey para a análise de variância referente ao percentual de metanotróficas. Profundidades estão identificadas por letras, onde A = 0-1 cm, B = 1-2 cm, C = 2-4 e D = 4-6 cm. “Com” = tratamento com adição de *C. violaceus* e “Sem” = tratamento controle. 39

Tabela 8: Dados do tratamento sem adição de *Campsurus violaceus* (controle) para densidade bacteriana, densidade bacteriana média por estrato de sedimento, densidade de metanotróficas, densidade de metanotróficas média por estrato de

sedimento, percentual de metanotróficas e percentual médio de metanotróficas por estrato de sedimento. A unidade utilizada foi Células. 10^8 .mL⁻¹. 40

Tabela 9: Dados do tratamento com adição de *Campylobacter jejuni* para densidade bacteriana, densidade bacteriana média por estrato de sedimento, densidade de metanotróficas, densidade de metanotróficas média por estrato de sedimento, percentual de metanotróficas e percentual médio de metanotróficas por estrato de sedimento. A unidade utilizada foi Células. 10^8 .mL⁻¹. 41

Tabela 10: Iniciadores utilizados nos ensaios de qPCR com seus respectivos programas de amplificação. As sequências contêm ambiguidades representadas pelas letras R (A, G), Y (C, T), M (A, C), S (C, G) e N (A, C, G, T). 50

Tabela 11: Resultados da análise de variância uni-fatorial (One-way ANOVA) correspondente à comparação entre os diferentes tratamentos com relação aos valores de densidade total bacteriana na coluna d'água. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados. 55

Tabela 12: Resultados da análise de variância uni-fatorial (One-way ANOVA) correspondente à comparação entre os diferentes tratamentos com relação aos valores de densidade de metanotróficas na coluna d'água. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados. 55

Tabela 13: Resultados do pós-teste de Tukey para análise de variância referente à abundância de cópias do gene *pmoA* (marcador para metanotróficas) nos diferentes tratamentos. “CF” = tratamento controle final, “CI” = tratamento controle inicial e “CT” = tratamento com adição de *C. truncatus*. 55

Tabela 14: Resultados da análise de variância uni-fatorial (One-way ANOVA) correspondente à comparação entre os diferentes tratamentos com relação aos níveis de concentração de oxigênio na coluna d'água no momento da retirada das alíquotas. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados. 56

Tabela 15: Resultados do pós-teste de Tukey para análise de variância referente aos níveis de concentração de oxigênio na coluna d'água nos diferentes tratamentos no momento da retirada das alíquotas. “CF” = tratamento controle final, “CI” = tratamento controle inicial e “CT” = tratamento com adição de *C. truncatus*. 57

Tabela 16: Dados da variação na concentração de oxigênio nos microcosmos dos tratamentos sem adição de *Campylobacter truncatus* (controle inicial e final) e do tratamento com adição de *Campylobacter truncatus*. Dados do início do experimento e do final no momento da retirada das alíquotas. A unidade utilizada foi mg/L..... 57

Tabela 17: Dados dos tratamentos sem adição de *Campylobacter truncatus* (controle inicial e final) e do tratamento com adição de *Campylobacter truncatus* para abundância do gene *rrs*, abundância do gene *rrs* média por tratamento, abundância do gene *pmoA* e abundância do gene *pmoA* média por tratamento. A unidade utilizada foi abundância do gene 16S *rrs*/100 mL de H₂O da amostra para bactéria e abundância do gene *pmoA*/100 mL de H₂O da amostra para metanotróficas..... 58

Tabela 18: Resultados da análise de variância bi-fatorial (Two-way ANOVA) correspondente aos efeitos individuais e combinados dos tratamentos (com e sem a presença de *Campylobacter truncatus*) e da profundidade do sedimento sobre a abundância

de cópias do gene *rrs* (marcador para *Bacteria*) no sedimento. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados..... 60

Tabela 19: Resultados da análise de variância bi-fatorial (Two-way ANOVA) correspondente aos efeitos individuais e combinados dos tratamentos (com e sem a presença de *Campylobacter truncatus*) e da profundidade do sedimento sobre a abundância de cópias do gene *pmoA* (marcador para metanotróficas) no sedimento. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados. 60

Tabela 20: Dados do Tratamento Controle Inicial para abundância do gene *rrs* por amostra, abundância do gene *rrs* média por estrato, abundância do gene *pmoA* por amostra e abundância do gene *pmoA* média por estrato. A unidade utilizada foi abundância de cópias do gene *rrs*/5 g da amostra de sedimento para bactéria e abundância de cópias do gene *pmoA*/5 g da amostra de sedimento para metanotróficas. 61

Tabela 21: Dados do Tratamento Controle Final para abundância do gene *rrs* por amostra, abundância do gene *rrs* média por estrato, abundância do gene *pmoA* por amostra e abundância do gene *pmoA* média por estrato. A unidade utilizada foi abundância de cópias do gene *rrs*/5 g da amostra de sedimento para bactéria e abundância de cópias do gene *pmoA*/5 g da amostra de sedimento para metanotróficas. 62

Tabela 22: Dados do Tratamento com adição de *C. truncatus* para abundância do gene *rrs* por amostra, abundância do gene *rrs* média por estrato, abundância do gene *pmoA* por amostra e abundância do gene *pmoA* média por estrato. A unidade utilizada foi abundância de cópias do gene *rrs*/5 g da amostra de sedimento para bactéria e abundância de cópias do gene *pmoA*/5 g da amostra de sedimento para metanotróficas. 63

Tabela 23: Posicionamento das ninfas de *C. truncatus* nos diferentes estratos do perfil vertical do sedimento ao final das 72 horas de incubação do experimento. 64

Tabela 24: Valor percentual de ninfas de *C. truncatus* nos diferentes estratos do perfil vertical do sedimento ao final das 72 horas de incubação do experimento. 64

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

(ordenação livre)

CH₄ - Metano

CO₂ - Dióxido de carbono

NO₂⁻ - Nitrito

NO₃⁻ - Nitrato

NH₃ - Amônia

NH₄⁺ - Íon amônio

Fe³⁺ - Ferro férrico (III)

Mn⁴⁺ - Íon manganês (IV)

SO₂⁻ - Dióxido de enxofre

COD - Carbono **orgânico** **dissolvido**

COP - Carbono **orgânico** **particulado**

STS - **Sólidos** **totais** em suspensão

MMO - **Methane monooxygenase** (metano monooxygenase)

sMMO - **MMO** em sua forma solúvel citoplasmática

pMMO - **MMO** em sua forma **particulada** associada a membrana

AMO - **Ammonia monooxygenase** (amônia monooxygenase)

DNA - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

RNA - *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

rRNA - **Ribosomal** *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico ribossomal)

PCR - **Polymerase chain reaction** (reação em cadeia da polimerase)

qPCR - *Quantitative real-time PCR* (PCR quantitativo em tempo real)

FISH - *Fluorescence in situ hybridisation* (hibridização in situ fluorescente)

DAPI - 4',6-**diamidino-2-phenylindole** (4',6-diamidina-2-fenilindol)

PBS - **Phosphate buffered saline** (tampão fosfato-salino)

PFA - **Paraformaldehyde** (paraformaldeído)

ANOVA - **Analysis of variance** (análise de variância)

RESUMO

EFEITO DO BIORREVOLVIMENTO DE *Campsurus* sp. EATON, 1868
(EPHEMEROPTERA: POLYMITARCYIDAE) SOBRE A DENSIDADE TOTAL
BACTERIANA E DE METANOTRÓFICAS NA INTERFACE SEDIMENTO-ÁGUA

Orlando de Marques Vogelbacher

Orientador: Marcos Paulo Figueiredo de Barros

Co-Orientadora: Analy Machado de Oliveira Leite

Resumo da dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Nos primeiros milímetros do sedimento, devido à maior disponibilidade de oxigênio, prevalecem processos aeróbicos de mineralização da matéria orgânica. Em aerobiose, o metano (CH₄) pode ser oxidado a dióxido de carbono (CO₂) através da ação de bactérias metanotróficas. Em anaerobiose, no entanto, o CO₂ pode ser utilizado para produção microbiana de CH₄. O contexto, tanto da produção quanto do consumo e emissão de CH₄ em ecossistemas aquáticos, pode ser influenciado por comunidades bentônicas através do processo de biorrevolvimento. O objetivo do presente trabalho foi avaliar, através de dois experimentos, como o biorrevolvimento promovido por *Campsurus* sp. (Ephemeroptera) afeta a densidade e distribuição vertical de bactérias totais e metanotróficas na interface sedimento-água. Amostras de sedimento, água e indivíduos de *Campsurus* sp. coletadas no Lago Batata (PA, Brasil) e na Lagoa do Vale Encantado (RJ, Brasil) foram utilizadas para montagem de microcosmos. Os experimentos consistiam de um tratamento com a presença de ninfas de *Campsurus* sp. e controles. Após o período de incubação, o sedimento foi fracionado em quatro estratos (0-1, 1-2, 2-4 e 4-6 cm). No primeiro experimento foi utilizada a microscopia de epifluorescência para contagem direta das bactérias, enquanto que a densidade das

metanotróficas foi determinada pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). No segundo experimento, as densidades foram determinadas pela abundância de cópias dos genes *rrs* (*Bacteria*) e *pmoA* (metanotróficas) em ensaios de qPCR. No primeiro experimento foi observado que a presença de *Campsurus* sp. e a interação entre o fator presença e profundidade do sedimento afetaram significativamente tanto a densidade bacteriana como de metanotróficas no sedimento (ANOVA; $P < 0.05$). No estrato de 0-1 cm ocorreu o único caso em que a densidade bacteriana foi maior para o tratamento com adição de *Campsurus* sp. em relação ao tratamento controle. Já com relação à densidade de metanotróficas o tratamento com adição de *Campsurus* sp. apresentou valores mais elevados que o controle em todas os estratos do sedimento. No segundo experimento a única diferença significativa se deu na água, onde o tratamento controle inicial apresentou maior densidade de metanotróficas que os demais. O biorrevolvimento promovido pelas ninfas de *Campsurus* sp. foi capaz de alterar a densidade e distribuição vertical da comunidade bacteriana ao longo do perfil vertical do sedimento. Esta resposta, porém, diferiu entre a totalidade e a fração da comunidade bacteriana formada pelas metanotróficas.

Palavras chave: bioturbação, metanotróficas, *Campsurus* sp., FISH, qPCR.

Macaé, RJ

Agosto, 2017

ABSTRACT

BIOTURBATION EFFECT OF *Campsurus* sp. EATON, 1868 (EPHEMEROPTERA: POLYMITARCYIDAE) ON TOTAL BACTERIAL AND METHANOTROPHIC DENSITY IN THE SEDIMENT-WATER INTERFACE

Orlando de Marques Vogelbacher

Orientador: Marcos Paulo Figueiredo de Barros

Co-Orientadora: Analy Machado de Oliveira Leite

Abstract da dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

In the firsts millimeters of sediments, due to the higher disponibility of oxygen, aerobic process of mineralization of organic matter prevail. In aerobiosis, methane (CH_4) may be oxidized to carbon dioxide (CO_2) through the action of methanotrophic bacteria. In anaerobiosis, however, CO_2 can be used for microbial production of CH_4 . The context of both production and consumption and emission of CH_4 in aquatic ecosystems can be influenced by benthic communities through the bioturbation process. The main goal of the present work was to evaluate through two experiments how the bioturbation promoted by *Campsurus* sp. (Ephemeroptera) affects the density and vertical distribution of total and methanotrophic bacteria in the sediment-water interface. Samples of sediment, water and individuals of *Campsurus* sp. collected in Lago Batata (PA, Brazil) and Lagoa do Vale Encantado (RJ, Brazil) were used to assemble microcosms. The experiments consisted of a treatment with the presence of *Campsurus* sp. nymphs and controls. After the incubation period, the sediment was fractionated into four layers (0-1, 1-2, 2-4 e 4-6 cm). In the first experiment, the

epifluorescence microscopy was used for direct counting of the bacteria, while the methanotrophic density was determined by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique. In the second experiment the densities were determined by the abundance of copies of *rrs* (*Bacteria*) and *pmoA* (methanotrophs) genes in qPCR assays. In the first experiment it was observed that the presence of *Campsurus* sp. and the interaction between the presence factor and sediment depth significantly affected both the bacterial and methanotrophic density in the sediment (ANOVA; $P < 0.05$). The 0-1 cm layer recorded the only case where the bacterial density was higher for the treatment with addition of *Campsurus* sp. in relation to the control treatment. Regarding the methanotrophic density, the treatment with addition of *Campsurus* sp. presented values higher than the control in all layers of the sediment. In the second experiment, the only significant difference occurred in the water, where the initial control treatment had a higher methanotrophic density than the others. The bioturbation promoted by *Campsurus* sp. nymphs was able to alter the density and vertical distribution of the bacterial community along the vertical profile of the sediment. This response, however, differed between the whole and the fraction of the bacterial community formed by the methanotrophs.

Keywords: bioturbation, methanotrophs, *Campsurus* sp., FISH, qPCR.

Macaé, RJ

Agosto, 2017

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Orlando Vogelbacher e Maria Imaculada

Aos meus avós Manoel Sebastião e Maria de Lurdes

I. INTRODUÇÃO

1.1 O Metano nos Ambientes Aquáticos

O sedimento de ecossistemas aquáticos é amplamente reconhecido como um reservatório de nutrientes, compostos orgânicos, e uma grande variedade de solutos (Woodruff *et al.*, 1999). A matéria orgânica sedimentar é decomposta a partir de processos microbiológicos aeróbicos e anaeróbicos acarretando na liberação de compostos inorgânicos (Kristensen, 2000). No entanto, a maior parte destes elementos não se encontra disponível para a maioria dos organismos aquáticos, uma vez que muitos processos biogeoquímicos e grande parte da atividade microbiana que remobiliza estes elementos ocorrem em geral nos primeiros milímetros do sedimento (Wang *et al.*, 2001).

A natureza dos processos de degradação da matéria orgânica no meio bentônico depende da diversidade de oxidantes presentes neste meio. De maneira geral, ocorre uma predominância da via metabólica envolvendo a substância com maior poder de oxidação, de modo que a transição entre aceptores de elétrons tende a ocorrer quando o mais favorável energeticamente é exaurido. Termodinamicamente, define-se a seguinte sequência que vai da via de maior para a de menor eficiência energética: desnitrificação > redução de metais > redução de sulfato > metanogênese (Fenchel *et al.*, 2012).

As características físicas, químicas e biológicas do sedimento e da água sobrejacente constituem fatores chaves na determinação da natureza dos processos de degradação da matéria orgânica (sejam eles aeróbicos ou anaeróbicos), nas taxas de liberação ou fluxo de nutrientes entre o sedimento e a água superficial, bem como na dinâmica das taxas de mineralização dos compostos orgânicos sedimentares. Dentre tais características estão a porosidade, a composição granulométrica, a concentração e qualidade da matéria orgânica, a disponibilidade de oxigênio, a composição da comunidade microbiana e a composição da macrofauna bentônica (Carmouse, 1994).

Os sedimentos em ambientes aquáticos estão permanentemente ou periodicamente submersos e geralmente são anóxicos. Contudo, o oxigênio (O₂) proveniente da superfície penetra cerca de 1 a 5 mm de profundidade criando uma fina camada óxica. Este influxo de O₂ ocorre principalmente devido à difusão molecular, mas pode ser impulsionado pela atividade de bioturbação promovida pela macrofauna bentônica (Wang *et al.*, 2001), pela produção fotossintética de O₂ através de algas

bentônicas (Revsbech *et al.*, 1981) ou através de raízes de plantas aquáticas que apresentam aerênquima (tecido parenquimatoso com grandes espaços intercelulares formando grandes cavidades no interior da planta preenchidas de ar) (Frenzel, 2000). O consumo de O₂ e a penetração do mesmo no sedimento ocorrem tanto em função da natureza da matéria orgânica sedimentar, em relação à disponibilidade de material lábil nas camadas superficiais, como também em função da produção de compostos reduzidos nas camadas anóxicas, uma vez que tais compostos difundem até atingirem a camada óxica e então contribuem para a demanda microbiana (e química) de O₂ (Sweerts *et al.*, 1991). O resultado deste balanço entre o influxo de O₂ a partir da interface sedimento-água e o seu consumo pela microflora presente no sedimento determina a extensão da profundidade da camada superficial óxica (Conrad, 1996). Geralmente, o que se verifica na prática é um rápido esgotamento do O₂ com o aumento da profundidade, resultando em uma estratificação redox (Zehnder & Stumm, 1988).

Por serem áreas de maior concentração de oxigênio, é justamente nos primeiros milímetros do sedimento onde prevalecem os processos aeróbicos de mineralização da matéria orgânica (Harrits & Hanson, 1980). Em aerobiose, o metano (CH₄) pode ser oxidado a dióxido de carbono (CO₂) através da ação de bactérias denominadas metanotróficas. Durante a oxidação microbiana de CH₄ (metanotrofia), o carbono (C) do CH₄ é convertido em CO₂ ou assimilado na forma de biomassa celular pelas bactérias metano-oxidantes. No entanto, condições de baixa disponibilidade e difusão de oxigênio no sedimento e o seu rápido consumo na região de interface sedimento-água, resultam preferencialmente em processos anaeróbicos de decomposição do material orgânico. Em anaerobiose, o CO₂ pode ser utilizado para produção de CH₄ através da ação de organismos pertencentes ao domínio *Archaea*, as chamadas arqueias metanogênicas. Durante a produção microbiana de CH₄ (metanogênese), o C do CO₂, ou algum outro composto orgânico de baixo peso molecular com um grupamento metil em uma via bioquímica alternativa, é utilizado como um aceptor de elétrons para produção de CH₄ (Chowdhury & Dick, 2013).

A oxidação anaeróbica de CH₄ utilizando aceptores de elétrons alternativos como nitrato (NO₃⁻), nitrito (NO₂⁻), Ferro férrico (Fe³⁺), Íon manganês (Mn⁴⁺) e dióxido de enxofre (SO₂⁻) é termodinamicamente possível (Segers, 1998), porém a maioria dos grupos que realizam estes processos não foi isolada em culturas puras até o presente momento. Há décadas se tem conhecimento de que um consórcio composto por grupos

de *Archaea* e de bactérias redutoras de sulfato é capaz de promover a oxidação anaeróbica de CH₄ acoplada à redução de sulfato (Zehnder & Brock, 1980; Boetius *et al.*, 2000), processo pelo qual o mecanismo, denominado como metanogênese reversa, foi descrito em maiores detalhes através de análise metagenômica (Hallam *et al.*, 2004). Posteriormente, revelou-se a ocorrência da oxidação anaeróbica de CH₄ acoplada à desnitrificação (Raghoebarsing *et al.*, 2006). Inicialmente, a hipótese apresentada era a de que arqueias conduziam a metanogênese reversa em associação às bactérias desnitrificantes em um mecanismo bastante similar ao citado anteriormente. No entanto, subsequentemente foi demonstrado que o processo completo poderia ser conduzido exclusivamente pelas bactérias desnitrificantes, sem necessidade de participação das arqueias (Ettwig *et al.*, 2010). Também foi relatada a oxidação anaeróbica do CH₄ acoplada à redução de ferro e manganês (Beal *et al.*, 2009), mas um acoplamento direto destes aceptores de elétrons com a oxidação anaeróbica de CH₄ não foi apresentado e os organismos envolvidos neste processo ainda são desconhecidos.

De uma forma geral, os processos de oxidação anaeróbica de CH₄ foram reportados principalmente para ambientes marinhos, mas há algumas evidências, ainda que escassas, para os ambientes de água doce, tanto para o processo acoplado à redução de sulfato (Eller *et al.*, 2005; Murase & Kimura, 1994), como para o processo acoplado à desnitrificação (Deutzmann & Schink *et al.*, 2011). Evidências recentes sugerem que talvez o processo de oxidação anaeróbica de CH₄ acoplado à desnitrificação esteja recebendo menos atenção do que deveria (Zhu *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2014), uma vez que este pode ser o processo de oxidação de CH₄ dominante em ambientes de água doce profundos e ricos em nitrato (Deutzmann *et al.*, 2014). Entretanto, é importante ressaltar que, além da ausência de O₂, as zonas abaixo da fina camada óxica superficial da maior parte dos sedimentos de água doce também não apresentam outros aceptores de elétrons além do CO₂ e do H⁺. Por esta razão, nestes ambientes, as zonas anóxicas são dominadas pela fermentação e pela metanogênese. O processo de fermentação é intenso, mas a maior parte do H₂ produzido (juntamente com o CO₂) é imediatamente convertida em CH₄ pela ação das arqueias metanogênicas (Conrad, 1996).

O metano produzido no sedimento pode ser transportado para a atmosfera por três vias principais diferentes: o transporte através de plantas vasculares, o transporte ebulitivo e o transporte difusivo (Conrad, 1996). As macrófitas aquáticas emersas exercem influência direta no balanço de CH₄, uma vez que formam um importante sítio

de oxidação, ao criar uma fina camada oxigenada entre as raízes e o sedimento, mas também são importantes condutoras do CH₄ produzido no sedimento, já que uma fração importante do que é produzido difunde-se para o interior destes vegetais através da raiz e posteriormente através do tecido parenquimático chegando rapidamente à atmosfera (Laanbroek, 2009). O transporte ebulitivo é possível quando há a formação de bolhas, que, por sua vez, são formadas quando a soma das pressões parciais dos gases dissolvidos excede a pressão hidrostática no sedimento (Chanton & Dacey, 1991). Bolhas podem se desprender do sedimento de forma espontânea ou devido a algum episódio de perturbação que propicie o seu desprendimento. A importância deste tipo de emissão reside na velocidade com que o gás atinge à atmosfera e a baixa possibilidade de exposição à metanotrofia (Chanton & Whiting, 1995). O fluxo difusivo de CH₄ a partir das camadas anóxicas do sedimento, onde prevalece a metanogênese, é mediado pelas taxas de produção e oxidação de CH₄ na interface sedimento-água e na interface água-atmosfera, locais onde geralmente prevalece a metanotrofia (Conrad, 1996).

Felix (2014), em estudo avaliando os fluxos de CH₄ em duas lagoas costeiras do norte fluminense, encontrou uma predominância do fluxo ebulitivo para um dos ambientes estudados (Lagoa Comprida) e do fluxo via macrófita aquática para o outro (Lagoa Jurubatiba), sendo que em ambos os casos, o fluxo predominante foi responsável por mais de 90% do total emitido. Dentre as explicações fornecidas pelo autor, a grande mortalidade e senescência da cobertura vegetal apresentada pela lagoa Jurubatiba após enfrentar longos e intensos períodos chuvosos, parece ter sido determinante para as diferenças observadas com relação ao fluxo predominante em cada ambiente. Ainda sobre o referido estudo, os fluxos difusivos de CH₄ foram a via de menor contribuição para as emissões totais deste gás nas lagoas estudadas, o que pode ser explicado pelas elevadas taxas de oxidação no sedimento e em toda a coluna d'água dos ecossistemas estudados, proporcionando condições ideais para a metanotrofia exercer um efeito regulador sobre o fluxo difusivo.

Sendo assim, o fluxo líquido de CH₄ de um ecossistema aquático determina as taxas de emissão deste gás para a atmosfera, sendo este, portanto, um balanço entre dois processos antagônicos: a produção de CH₄ por arqueias metanogênicas e o seu consumo por bactérias metanotróficas (Chowdhury & Dick, 2013). O consumo e a produção de CH₄, por sua vez, podem ser influenciados, por diversos fatores e condições como, por exemplo, temperatura, salinidade, concentração de oxigênio dissolvido, potencial redox,

nutrientes dissolvidos, qualidade e quantidade de substratos orgânicos disponíveis e composição da comunidade microbiana (Fey & Conrad, 2000). No entanto, a predominância entre as vias de transporte deste gás para atmosfera dependerá de características intrínsecas ao ambiente, como: (i) profundidade da coluna d'água, que influencia a pressão hidrostática e conseqüentemente o fluxo ebulitivo; (ii) concentração de oxigênio dissolvido no sedimento e na coluna d'água, que influencia o potencial regulador da metanotrofia sobre o fluxo difusivo; (iii) cobertura vegetal, que influencia diretamente sobre as taxas de transporte via macrófitas (Bastviken *et al.*, 2004).

1.2 O Balanço Global de Metano

Em todos os ambientes que atuam como fontes biogênicas de CH₄ atmosférico, este gás é produzido pelo mesmo processo, onde o CH₄ é o produto final da degradação da matéria orgânica sob condições anaeróbicas (Conrad, 2007). A maior parte do metano atmosférico se origina do metabolismo microbiano, decorrente da produção de metano por arqueias metanogênicas, organismos tipicamente encontrados em sítios onde a matéria orgânica é decomposta na ausência de oxigênio ou outros oxidantes inorgânicos, como nitrato, nitrito, sulfato, manganês e ferro férrico (Conrad, 2009).

De acordo com o relatório de 2013 do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2013), os corpos hídricos de água doce (incluindo rios e lagos) são responsáveis pela emissão anual de cerca de 40 Tg (Tg = 10¹² gramas) de CH₄ para atmosfera, o que representa em torno de 11% das emissões de CH₄ de fontes naturais e 6% das emissões globais. No entanto, as áreas úmidas (*wetlands*) naturais não estão contempladas nesta categoria, sendo elas, isoladamente, a maior fonte individual de metano de origem microbiana. As áreas úmidas naturais emitem anualmente entre 175 e 217 Tg de CH₄ para atmosfera, o que representa algo entre cerca de 60 e 80% das emissões de CH₄ de fontes naturais e aproximadamente 30% das emissões globais. Além destas, as fontes naturais de emissão de CH₄ biogênico incluem ainda (em ordem de contribuição percentual para as fontes naturais): as fontes geológicas (incluindo a produção de metano na coluna d'água oceânica) (16%), a fermentação ruminal de animais selvagens (4%), a fermentação intestinal em térmitas (3%), a emissão de metano por hidratos de gás (sólidos cristalinos compostos por água e gás metano) (2%), os incêndios naturais (1%) e os solos perenemente congelados (*permafrosts*) (0,3%),

que são fontes comparativamente menores, porém significativas, todas com pouco impacto direto do manejo humano.

Além das fontes naturais de emissão de CH₄ biogênico, existem também as fontes antropogênicas, que, por sua vez, incluem (em ordem de contribuição percentual para as emissões antrópicas): a queima de combustíveis fósseis (33%), a fermentação ruminal em bovinos, ovinos e outros ruminantes ligados à atividade de pecuária (30%), a degradação de resíduos em aterros sanitários (25%) e os campos de cultivo de arroz irrigado, que são consideradas áreas úmidas antropogênicas (12%) (IPCC, 2013).

Como visto anteriormente, as diferentes fontes do metano atmosférico oriundo da atividade microbiana podem ser naturais ou antropogênicas em sua origem. Somadas, todas as fontes de metano emitem um montante anual de aproximadamente 550-680 Tg de metano para a atmosfera. Cerca de 70-80% deste metano provém da atividade de arqueias metanogênicas que decompõem anaerobicamente matéria orgânica em ambientes naturais e antropogênicos, ou seja, é de origem biogênica. Outros 20-30% estão divididos entre as fontes termogênicas, resultado da decomposição termal da matéria orgânica (> 80°C) que ocorre na crosta terrestre em locais chamados de áreas geotermiais, responsáveis pela lenta transformação da matéria orgânica em combustíveis fósseis (gás natural, carvão e óleo) na escala de tempo geológica e as fontes pirogênicas, resultado da combustão incompleta da matéria orgânica (queima de biomassa ou biocombustíveis). Algumas fontes podem inclusive eventualmente combinar uma origem termogênica e pirogênica (*e.g.* vulcões de lama, emanções frias de metano e fontes hidrotermais) (IPCC, 2013).

O somatório de todos os sumidouros de CH₄ atmosférico é capaz de sequestrar entre 550-630 Tg de metano por ano. O principal sumidouro de CH₄ atmosférico é a oxidação por meio de radicais OH, uma reação química que ocorre principalmente na troposfera e na estratosfera e remove por ano um montante de CH₄ equivalente a 90% de todas as emissões da superfície. Outros sumidouros menores incluem as reações do CH₄ com radicais Cl na estratosfera e a oxidação através de bactérias metanotróficas em solos com a presença de oxigênio (IPCC, 2013).

Ainda de acordo com o mesmo relatório (IPCC, 2013), podemos afirmar que o CH₄ é, depois do CO₂, o gás que mais contribui para o efeito estufa de origem antropogênica, tornando-se um dos gases mais importantes no estudo das alterações

climáticas induzidas pelo homem. Toda esta atenção se justifica, afinal, embora se apresente em concentrações atmosféricas muito inferiores e possua um tempo de vida na atmosfera muito menor em relação ao CO₂, o CH₄ possui um potencial de absorção de radiação muito maior se comparado ao equivalente em massa do CO₂, de maneira que seu fator de aquecimento global é 86 vezes superior para um período de 20 anos e 34 em uma escala de 100 anos. Além disso, talvez o fato mais alarmante trazido pelo relatório seja que a sua concentração atmosférica global média aumentou em cerca de 150% desde a época pré-industrial. Acredita-se que este crescimento deva estar relacionado a um aumento das emissões de CH₄ de origem antrópica, o que pode ser atribuído a fatores como o aumento da extração e utilização dos combustíveis fósseis, expansão da fronteira agrícola, especialmente da cultura de arroz, além da intensificação da pecuária e o conseqüente enorme aumento no número de ruminantes. Segundo o mesmo relatório, as fontes antropogênicas de emissão de CH₄ representam atualmente entre 50 e 65% do total das fontes de emissão. Em função destes e outros motivos, pesquisas com temáticas voltadas para o entendimento sobre a produção, consumo e controle das emissões de CH₄ conquistaram grande notoriedade, sobretudo após as ações estabelecidas pelo protocolo de Quioto.

Neste contexto de crescente preocupação com o aumento da concentração de CH₄ na atmosfera e as possíveis mudanças climáticas que o agravamento deste cenário pode acarretar, torna-se relevante elucidar o papel dos microrganismos envolvidos no ciclo deste gás. Sendo assim, o estudo das bactérias metano-oxidantes torna-se relevante para a geoquímica global do CH₄, uma vez que em condições de aerobiose o CH₄ presente nos sedimentos é oxidado e consumido por estas bactérias, limitando significativamente o fluxo deste gás para a atmosfera (Cicerone & Oremland, 1988). Inclusive, estimativas indicam que a atividade das bactérias metanotróficas promova uma redução dos fluxos de CH₄ para a atmosfera em torno de 80% (King, 1990; King *et al.*, 1990; Conrad & Rothfuss, 1991; Sweerts *et al.*, 1991; Bosse *et al.*, 1993) e 90% (King, 1992; Oremland & Culbertson, 1992; Utsumi *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 2005), em relação á concentração inicialmente disponível para transporte. Portanto, o sedimento atua como um eficiente biofiltro, uma vez que apenas um pequeno percentual do CH₄ produzido neste compartimento consegue chegar à atmosfera (Figura 1).

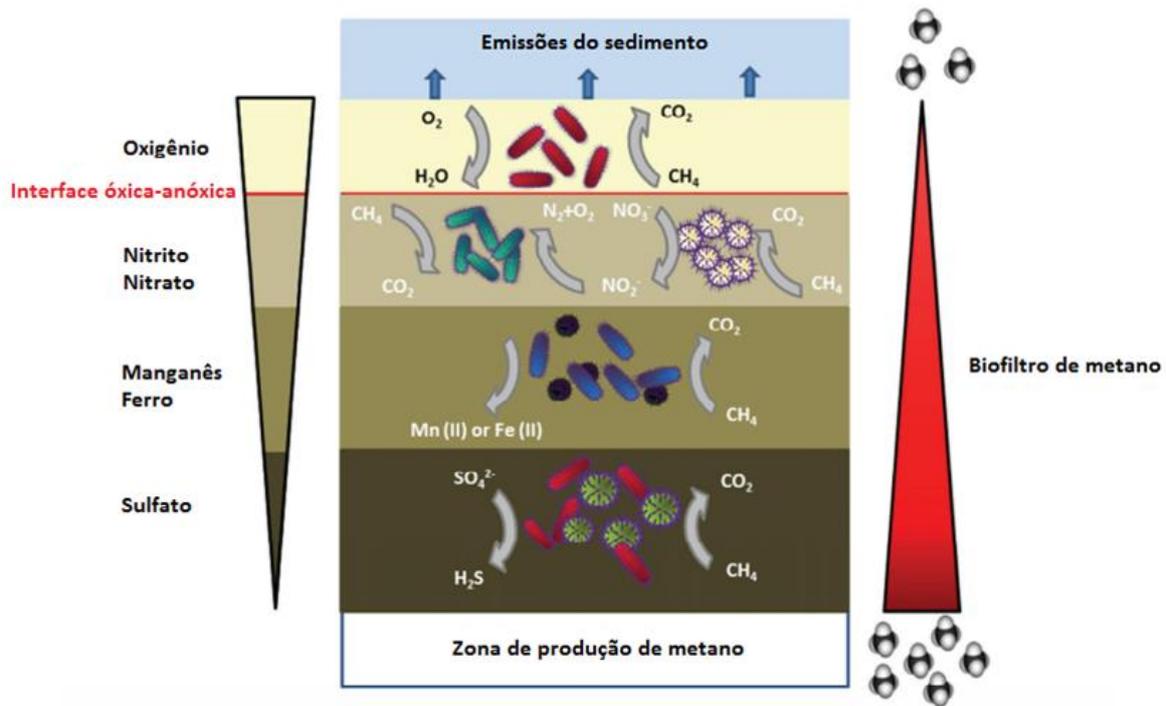


Figura 1: Ilustração esquemática representando a natureza estratificada do sedimento, onde vias metabólicas distintas prevalecem de acordo com o poder oxidativo dos aceptores de elétrons e sua disponibilidade nos diferentes estratos. Na ausência do oxigênio, como é o caso das camadas mais profundas, arqueias metanogênicas produzem grandes quantidades de CH_4 . Diferentes grupos metanotróficos, utilizando aceptores de elétrons distintos, promovem a oxidação do CH_4 produzido à medida que este difunde ao longo do perfil vertical do sedimento. Esse consórcio de microrganismos metanotróficos forma um biofiltro natural de CH_4 capaz de limitar significativamente a emissão deste gás para a atmosfera (Extraído de Vekeman, 2016).

1.3 Bactérias Metanotróficas

As bactérias metanotróficas constituem um grupo de bactérias capazes de crescer utilizando o metano como fonte de carbono e energia através da metanotrofia, um processo onde o metano é oxidado em dióxido de carbono através de compostos intermediários (metanol, formaldeído e ácido metanoico) (Hanson & Hanson, 1996). Em ambientes naturais, seja em solos ou sedimentos de ambientes aquáticos continentais ou marinhos, as metanotróficas estarão presentes e de forma mais ativa nas zonas onde há presença tanto de metano como de oxigênio, o que normalmente ocorre na interface entre ambientes óxicos e anóxicos (Cicerone & Oremland, 1988).

Com base em seus substratos principais, as bactérias capazes de oxidar o metano podem ser divididas em dois grupos, as bactérias amônia-oxidantes (nitrificantes) e as bactérias metano-oxidantes (metanotróficas). No entanto, embora sejam capazes de promover a oxidação de metano, as nitrificantes não são capazes de utilizar esta energia para o seu crescimento, algo exclusivo das metanotróficas (Bédard & Knowles, 1989). As metanotróficas pertencem às classes *Gammaproteobacteria* (tipo I) e *Alphaproteobacteria* (tipo II) do filo *Proteobacteria*, enquanto que a maior parte das nitrificantes pertence à classe *Betaproteobacteria*. As metanotróficas pertencentes à *Alphaproteobacteria* estão divididas em duas famílias distintas, *Methylocystaceae* e *Beijerinckiaceae*, enquanto que as metanotróficas pertencentes à *Gammaproteobacteria* estão quase todas classificadas dentro da família *Methylococcaceae* e da recém-proposta *Methylothermaceae* (Hirayama *et al.*, 2014) (Knief, 2015). Além da classificação tradicional em tipo I e tipo II, a diversidade de metanotróficas conhecidas foi recentemente expandida com a descoberta de metanotróficas pertencentes ao filo *Verrucomicrobia* (Dunfield *et al.*, 2007; Pol *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2008).

Esta última descoberta em questão demonstrou que o crescimento bacteriano sobre metano não está restrito apenas a *Proteobacteria*, se fazendo presente também em *Verrucomicrobia*, outro filo bacteriano, gerando assim especulações sobre o quão amplamente distribuídas estão as metanotróficas dentre os procariotos (Conrad, 2009). A partir desta descoberta, a classificação em tipo I e II vem sendo questionada, uma vez que esta não é mais capaz de categorizar todas as metanotróficas descritas, de modo que alguns autores propõem que seu uso seja abandonado (Op den Camp *et al.*, 2009; Semrau *et al.*, 2010), enquanto outros seguem utilizando-a e adaptando a classificação à

crecente diversidade de metanotróficas, criando, para tal, um tipo III, que engloba as metanotróficas pertencentes à *Verrucomicrobia* (Knief, 2015).

A classificação das metanotróficas em dois grandes grupos (tipo I e tipo II) é decorrente da caracterização de várias espécies com base em traços fisiológicos, morfológicos, ultraestruturais e quimiotaxonômicos (Whittenbury & Dalton, 1981). Dentre estas características distintivas principais, estão o arranjo das membranas internas (em discos vesiculares para o tipo I e em membranas emparelhadas alinhadas a periferia da célula para o tipo II), o mecanismo de incorporação de carbono (através da via ribulose monofosfato para o tipo I e do ciclo da serina para o tipo II), e a predominância de ácidos graxos específicos (dominância de C₁₄ e C₁₆ para o tipo I e C₁₈ para o Tipo II) (Green, 1992; Hanson & Hanson, 1996; Bowman, 2006; Trotsenko & Murrell, 2008). No entanto, a caracterização de vários novos gêneros e espécies durante os últimos anos, como foi o caso das metanotróficas pertencentes à *Verrucomicrobia*, desafia esta distinção com base nos critérios mencionados anteriormente. Apesar dos problemas, os termos ainda são frequentemente utilizados, sendo considerados sinônimos para os grupos filogenéticos *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*. Atualmente, são conhecidos 18 gêneros cultivados de *Gammaproteobacteria* e 5 gêneros de *Alphaproteobacteria*, representados por aproximadamente 60 espécies (Knief, 2015).

A utilização da enzima metano monooxigenase (MMO) para catalisar a introdução do grupo hidroxila para conversão de metano em metanol, o primeiro passo da reação de oxidação do metano, é uma característica chave distintiva das metanotróficas. Duas formas desta enzima são conhecidas, uma forma particulada ligada a membrana (pMMO), presente na maioria das metanotróficas conhecidas, e uma solúvel citoplasmática (sMMO), encontrada apenas em algumas espécies (Hanson & Hanson, 1996). A amônia monooxigenase (AMO), enzima chave das bactérias nitrificantes responsável por iniciar o processo de oxidação da amônia, compartilha de várias similaridades funcionais com a pMMO apesar das diferenças fisiológicas evidentes entre metanotróficas e nitrificantes. Ambas as enzimas são capazes de catalisar, com diferenças na eficiência de conversão dos substratos, tanto a oxidação da amônia como a de metano. Inclusive, os genes que codificam estas enzimas apresentam considerável homologia em suas sequências, o que sugere uma forte evidência de uma possível origem evolutiva em comum (Holmes *et al.*, 1995).

Os mecanismos de inibição da oxidação de metano estão diretamente relacionados com essa plasticidade catalítica do sítio ativo da enzima MMO presente em bactérias metanotróficas. O fato da enzima em questão ter a capacidade de degradar uma variedade de outros substratos além do CH₄ faz com que haja uma competição destes substratos pelo seu sítio ativo. Estes co-substratos incluem tanto a amônia (NH₃), como o íon amônio (NH₄⁺), que podem ser oxidados pela ação da MMO gerando nitrito (NO₂⁻) como produto final da reação (Dalton, 1977). Há extensiva evidência de que a disponibilidade ambiental destes compostos nitrogenados acarrete na redução das taxas de crescimento de bactérias metanotróficas pela inibição da oxidação de metano (Dunfield & Knowles, 1995). De modo semelhante, a enzima AMO presente em nitrificantes, também apresenta certa degeneração de seu sítio ativo, o que a torna capaz de também oxidar CH₄ (Hyman & Wood, 1983). Portanto, além de suas fontes usuais de energia, tanto metanotróficas como nitrificantes são capazes de oxidar tanto CH₄ quanto NH₃, embora nenhum dos dois tipos de organismo possa utilizar a energia destas reações para crescimento. Inclusive, esta competição entre NH₃ e CH₄ pelo sítio ativo da enzima MMO em metanotróficas e da enzima AMO em nitrificantes levou a especulações a respeito da contribuição de nitrificantes para a oxidação de CH₄ e metanotróficas para a nitrificação em ambientes naturais (Bédard & Knowles, 1989).

A pMMO está presente na membrana celular de praticamente todas as metanotróficas isoladas até o momento, com exceção de espécies de *Methylocella* (Dedysh *et al.*, 2000; Dunfield *et al.*, 2003; Dedysh *et al.*, 2004) e *Methyloferula* (Vorobev *et al.*, 2011) que possuem apenas a sMMO. São conhecidas ainda algumas metanotróficas tanto do tipo I como do tipo II que possuem ambas as formas da enzima. Nas espécies de *Methylocella*, um dos táxons que possuem apenas sMMO, a metanotrofia é facultativa, de modo que estas bactérias não estão restritas ao CH₄, sendo capazes de crescer em outras fontes de carbono, inclusive em compostos com ligação C-C, como, por exemplo, o acetato, substrato que permite um crescimento mais eficiente do ponto de vista energético (Dedysh *et al.*, 2005; Theisen *et al.*, 2005). Esta descoberta demonstra que nem todas as metanotróficas são obrigatoriamente metilotróficas, ou seja, utilizam única e exclusivamente compostos de apenas um carbono (Conrad, 2009).

1.4 Técnicas Moleculares em Ecologia Microbiana

A utilização de técnicas moleculares se fez importante diante das limitações dos procedimentos clássicos em microbiologia, como o enriquecimento e isolamento de microrganismos em laboratório, seguido pelos múltiplos testes para traços fisiológicos e bioquímicos. Embora reconhecida a importância do cultivo e isolamento, tais métodos selecionam apenas alguns membros da comunidade, isto é, aqueles para os quais o meio de cultura e a incubação fornecem as condições apropriadas para o crescimento (Amann *et al.*, 1995). Durante muito tempo, a ecologia microbiana careceu de um método que permitisse a rápida e específica identificação de células microbianas individuais em seu ambiente natural. Como consequência, devido à falta de um método adequado de detecção, agrupamentos de microrganismos com tremendas diferenças funcionais eram comuns em trabalhos de ecologia microbiana (Amann *et al.*, 2001).

Por oferecer maior sensibilidade e especificidade que os procedimentos tradicionais, o desenvolvimento e a aplicação das técnicas moleculares possibilitou um acesso mais realístico à diversidade microbiana, revelando que esta é extremamente maior do que pode ser avaliado por técnicas de cultivo (Amann *et al.*, 2001). Para dar uma dimensão desta discrepância, o levantamento realizado por Knief (2015) indica que das cerca de 15 mil sequências do gene *pmoA* depositadas na base de dados do Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), a vasta maioria deriva de estudos com técnicas moleculares, sem a utilização de técnicas de cultivo. Destas sequências, apenas cerca de 3% foram obtidas de cepas de metanotróficas cultivadas, a maioria delas pertencente aos gêneros bem conhecidos *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylocaldum* ou *Methylomicrobium*, o que significa que apenas uma pequena fração da diversidade de metanotróficas é representada pela cepas cultivadas.

Ferramentas para detecção independente do cultivo de bactérias metanotróficas já são conhecidas a mais de 20 anos. O primeiro salto metodológico se deu a partir do desenvolvimento das técnicas de hibridização com sondas de ácido nucleico, que permitiram uma mais rápida, precisa e quantitativa descrição da estrutura de uma comunidade microbiana se comparada aos métodos baseados no cultivo. A hibridização *in situ* fluorescente ou, do inglês, *fluorescence in situ hybridisation* (FISH), foi desenvolvida para a identificação individual de células microbianas através de sondas

de oligonucleotídeos de rRNA alvo e tornou-se uma das técnicas mais bem estabelecidas e sucedidas neste aspecto (Amann *et al.*, 2001).

Diversas razões fazem dos rRNAs as principais moléculas alvo para o FISH, dentre elas destaca-se o fato deles poderem ser encontradas em todos os organismos vivos, sendo relativamente estáveis e ocorrerem em alto número de cópias (geralmente vários milhares por célula) e incluírem tanto domínios de sequência altamente variável como conservadas (Amann *et al.*, 1990; 1995). Desta forma, a assinatura de sequências únicas para um grupo escolhido de microrganismos, variando de um filo inteiro para espécies individuais, pode ser identificada por análise comparativa de sequências. Na vasta maioria dos trabalhos publicados em que a metodologia do FISH foi aplicada, as sondas tinham como alvo o 16S rRNA. Os bancos de dados públicos incluem sequências do 16S rRNA da maior parte das espécies microbianas cultivadas, assim como milhares de sequências retiradas diretamente do ambiente. O design das sondas se dá através do auxílio de pacotes de programas utilizando a informação dessas sequências dos bancos de dados (Amann *et al.*, 2000). Um protocolo típico de FISH inclui quatro etapas: (i) fixação e permeabilização da amostra; (ii) hibridização; (iii) passos de lavagem para remoção de sondas não ligadas; (iv) detecção de células marcadas por microscopia ou citometria de fluxo (Amann & Ludwig, 2001).

A construção de bibliotecas a partir da clonagem de genes que refletem a filogenia dos grupos de interesse é outra técnica muito utilizada para revelar a composição de comunidades de microrganismos no ambiente. A técnica de clonagem tem por princípio a inserção de um segmento de DNA de interesse em um vetor, que, por sua vez, é introduzido em uma célula hospedeira de fácil propagação e manutenção. A partir do crescimento das colônias de bactérias que receberam o vetor, procede-se a amplificação do fragmento clonado através da reação em cadeia da polimerase ou, do inglês, *polymerase chain reaction* (PCR). A PCR possibilita a síntese de fragmentos de DNA, utilizando a DNA-polimerase, enzima capaz de sintetizar uma sequência complementar de DNA, desde que um iniciador (*primer*) já esteja ligado a uma das cadeias do DNA no ponto escolhido para o início da síntese. Os iniciadores definem a sequência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência de DNA (Mullis, 1989). No entanto, durante muito tempo, as tentativas de utilizar técnicas baseadas em PCR para analisar a estrutura e composição da comunidade microbiana esbarravam ainda em algumas limitações metodológicas.

Embora essas técnicas tenham tornado ainda mais rápido e sensível o processo de detecção de bactérias independentemente de estas poderem ser cultivadas ou não, essas técnicas forneciam apenas informação limitada sobre o número e distribuição espacial dos microrganismos (Amann *et al.*, 2001).

A possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. O PCR quantitativo em tempo real ou, do inglês, *quantitative real-time* PCR (qPCR ou *real-time* PCR), é uma abordagem metodológica para quantificação precisa de sequências de interesse em amostras ambientais que pôs fim as limitações anteriores. As análises baseadas em qPCR combinam a técnica de detecção da PCR convencional com tecnologias de detecção de fluorescência para registrar o acúmulo de fragmentos de DNA ou RNA frutos de amplificação em "tempo real" durante cada ciclo da amplificação pela PCR. Ao realizar a detecção destes fragmentos de amplificação ainda durante a fase exponencial inicial da PCR, isso permite a quantificação de genes (ou transcritos) quando estes são proporcionais à concentração do DNA molde inicial (Smith & Osborn, 2009). Esse método permite determinar com maior rapidez e precisão a concentração de DNA alvo em extratos de DNA ambiental, sendo amplamente utilizado para quantificação de microrganismos em amostras ambientais utilizando como marcador tanto o 16S rRNA como genes marcadores funcionais (Kolb *et al.*, 2003).

A técnica do qPCR realiza a quantificação destes ácidos nucléicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA são realizados em uma única etapa, determinando os valores durante a fase exponencial da reação. Uma vez determinado o *Cycle Threshold* (C_t), o qual representa o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial, determina-se a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência, sendo o valor de C_t da amostra de interesse comparado com valores de C_t de amostras contendo quantidades conhecidas do mesmo gene (padrões externos), possibilitando assim a determinação do número de cópias do gene alvo presentes na amostra inicialmente (Logan *et al.*, 2009). Pelas razões apresentadas, a técnica do qPCR se constitui como um método robusto, altamente replicável e sensível para rastrear de forma quantitativa as alterações genéticas filogenéticas e funcionais em escalas temporais e espaciais em diferentes condições ambientais ou experimentais (Smith & Osborn, 2009).

O rRNA 16S é o gene mais frequentemente utilizado como marcador filogenético em estudos ambientais. É possível, a partir da utilização de iniciadores e sondas específicas, utilizar este gene para detecção e quantificação de bactérias metanotróficas, fornecendo assim informação valiosa no que diz respeito ao posicionamento filogenético de bactérias detectadas em amostras ambientais. Um ponto limitante, no entanto, reside no fato de que a utilização deste gene não permite a identificação destas bactérias além das famílias mais conhecidas (Knief, 2015).

Essa limitação é menos relevante quando genes funcionais são utilizados como marcadores, como os genes codificadores da enzima metano monooxigenase (MMO). Como explicado no item anterior dedicado as metanotróficas, a metano monooxigenase é a enzima chave responsável pelo passo inicial de conversão do metano em metanol. São conhecidas duas formas desta enzima, a forma solúvel (sMMO) e a forma particulada (pMMO). O gene *pmoA*, que codifica a subunidade β , que abriga o sítio ativo da enzima pMMO, é o marcador funcional mais frequentemente utilizado para detecção de metanotróficas em amostras ambientais, uma vez que esta forma da enzima está presente na maior parte das bactérias metanotróficas com exceção feita apenas a família *Beijerinckiaceae*. Possivelmente por abrigar a codificação para o sítio ativo da enzima MMO, o gene *pmoA* possui uma sequência muito conservada e sua presença é quase universal no genoma das metanotróficas conhecidas (Holmes *et al.*, 1995). Estas particularidades tornaram viável a ampla utilização deste gene como marcador filogenético para identificar e classificar especificamente as bactérias metanotróficas. Para incluir as espécies que não possuem pMMO e assim obter um espectro de detecção mais completo das metanotróficas presentes em uma amostra, o gene *mmoX*, que codifica a subunidade α , que abriga o sítio ativo de sMMO, tem sido utilizado em adição ao gene *pmoA*. No entanto, o gene *mmoX* é muito menos frequentemente utilizado devido a sua ocorrência limitada entre as metanotróficas (Knief, 2015).

Foram desenvolvidos alguns conjuntos de iniciadores para a amplificação de fragmentos do gene *pmoA*, dentre eles destaca-se o par de iniciadores A189/A682 (Holmes *et al.*, 1995), que foi o primeiro a ser publicado e segue sendo o mais utilizado, e o par A189/mb661 (Costello & Lidstrom, 1999), que, por ser uma combinação de iniciadores mais específica para as bactérias metanotróficas, uma vez que este conjunto não amplifica o gene *amoA* de bactérias amônia-oxidantes, vem sendo comumente utilizada ao invés ou em conjunto ao par mencionado anteriormente (Knief, 2015).

1.5 Biorrevolvimento

De modo geral, o biorrevolvimento ou bioturbação pode ser definido como “o processo onde as estruturas físicas locais ou características topográficas do solo ou sedimento são modificadas através de atividades biológicas”, segundo definição de Kogure & Wada (2005). Na ecologia aquática, mais especificamente, seguindo a definição de Kristensen *et al.* (2012), a bioturbação se refere “a todos os processos promovidos por animais que direta ou indiretamente afetam as matrizes do sedimento”, estes incluem tanto a reorganização do substrato como a ventilação mecânica dos tubos. Sendo assim, inclui toda e qualquer atividade de alteração da estrutura do sedimento, como a formação de rastros ou trincheiras na superfície e a construção de tubos e galerias permanentes ou semipermanentes, assim como os processos de transporte de frações dissolvidas de solutos, matéria orgânica particulada e microrganismos através do perfil vertical do sedimento ou para a coluna d’água sobrejacente, seja em decorrência da atividade física de reorganização do substrato exercida durante a construção dos ductos (biomistura) ou pelo constante bombeamento de água ao longo destes (bioirrigação) (Kristensen *et al.*, 2012).

O primeiro trabalho conceitual envolvendo este processo foi publicado por Charles Darwin ainda no século IX, onde o famoso naturalista inglês, ao observar o comportamento de minhocas, descreve os efeitos destes animais sobre a estrutura dos substratos em que vivem. Este tópico central de seu último livro foi a fundação teórica para o que hoje se considera como bioturbação, ainda que ele não tenha especificamente usado este termo (Meysman *et al.*, 2006).

Conhecidamente, o processo de biorrevolvimento por macroinvertebrados bentônicos promove: (i) redistribuição de partículas de sedimento; (ii) alterações na difusão do oxigênio; (iii) alterações da atividade microbiana e, conseqüentemente, influencia no processo de mineralização da matéria orgânica; (iv) intensificação dos fluxos de remobilização e liberação de nutrientes na interface sedimento-água e (v) aumento na produção de comunidades planctônicas (acoplamento de compartimentos). A variação da intensidade do processo de bioturbação e de seus efeitos pode ser vista como uma função do tamanho do corpo e da intensidade das atividades horizontais e verticais da macrofauna bioturbadora no compartimento bentônico (Petr, 1977; Margalef, 1983).

O contexto, tanto da produção quanto do consumo e emissão de CH₄ em ecossistemas aquáticos, pode ser fortemente influenciado por comunidades bentônicas, de maneira que o balanço deste gás é resultado da atividade microbiana e do efeito da comunidade de invertebrados que colonizam a interface sedimento-água através do processo de biorrevolvimento (Kristensen & Holmer, 2001). A importância da bioturbação para o ciclo do CH₄ reside no fato deste processo causar alterações, tais como: (i) Físicas - através da redistribuição de partículas ao longo do sedimento (Mulsow *et al.*, 1998; Giangrande *et al.*, 2002); (ii) Químicas - por intensificar o consumo de oxigênio dissolvido e/ou gerar maior difusão para as camadas anóxicas do sedimento (Wang *et al.*, 2001; Leal *et al.*, 2005) e (iii) Biológicas - por redistribuir microrganismos no sedimento intensificando ou desestimulando processos relacionados ao CH₄ (Kiyashko *et al.* 2001; Deines *et al.*, 2007). Desta forma, os macroinvertebrados bentônicos, através de sua colonização e forrageio, formam uma importante comunidade capaz de alterar condições físicas, químicas e biológicas do substrato e da água intersticial em ecossistemas aquáticos (Caliman *et al.*, 2007).

Neste sentido, através do processo de bioturbação, a macrofauna bentônica desempenha papel fundamental na dinâmica de nutrientes e no metabolismo bentônico, favorecendo, entre outros processos, a intensificação de fluxos de nutrientes na interface sedimento-água e a capacidade de penetração de O₂ no perfil vertical do sedimento, fatores estes que, por sua vez, acarretam na alteração da natureza oxirredutora do sedimento e dos processos de degradação da matéria orgânica neste compartimento. Portanto, devido a sua influência sobre a dinâmica de transporte de nutrientes entre os compartimentos bentônico e pelágico, a bioturbação é considerada um importante processo ecológico capaz de alterar a dinâmica de populações, comunidades e processos biogeoquímicos em ambientes aquáticos (Leal, 2003).

Tem sido demonstrado que a abundância e a atividade bacteriana aumentam devido às complexas interações biogeoquímicas induzidas pela atividade de biorrevolvimento. A construção de túneis aumenta a interface sedimento-água, disponibilizando superfícies adicionais para colonização bacteriana e reações químicas. O transporte de partículas e o fluxo de água nos túneis criam padrões de zoneamento geoquímico tridimensionais com mudanças substanciais no potencial redox e na formação de microambientes dinâmicos temporalmente e espacialmente (Bertics & Ziebis, 2009). A modificação do potencial redox nas paredes dos tubos causada pelo

aporte de água rica em O₂ favorece a colonização desta área por bactérias aeróbicas e meiofauna. Assim, tubos, galerias e covas são locais de elevado número de bactérias e intensa atividade metabólica quando comparados com outras regiões do sedimento (Kristensen, 1985; Kristensen *et al.*, 1991). No entanto, embora seja conhecido que organismos com hábito escavador afetem a biogeoquímica dos sedimentos, as interações são muitas vezes complexas e investigações detalhadas sobre este efeito do microzoneamento geoquímico sobre as dinâmicas populacionais da comunidade microbiana ainda são bastante escassas.

O efeito destes organismos sobre a estrutura e composição da comunidade bacteriana provavelmente deve variar de acordo com o papel funcional do organismo no sedimento. Diferentes espécies de invertebrados bentônicos colonizam o sedimento de maneira diversa acarretando em variadas taxas de consumo de O₂, fluxo de partículas e nutrientes, o que, por sua vez, promove diferenças na atividade microbiológica (Heilskov & Holmer, 2001; Figueiredo-Barros, 2004; Caliman, 2005).

Hunting *et al.* (2012) testando cinco espécies de macroinvertebrados bentônicos, observaram que os perfis de oxirredução foram iguais para espécies que apresentaram modos de forrageio similares, e diferentes para espécies que apresentaram modo de forrageio distintos. Sendo assim, é possível inferir que diferentes grupos funcionais acarretam em efeitos variados sobre comunidade bacteriana. Em outro exemplo, Caliman *et al.* (2013), em estudo na Lagoa Imboassica, uma lagoa costeira de Macaé (RJ, Brasil), observaram que a diversidade de organismos bioturbadores bentônicos é um dos fatores que influencia a concentração de metano no sedimento, de modo que diferentes composições de espécies de organismos apresentaram efeitos distintos nos padrões de redução da concentração de metano no sedimento. Neste mesmo estudo em questão, ressaltou-se ainda que a bioturbação pode ser um fator importante para a redução das emissões de metano para a atmosfera, uma vez que promove a difusão do metano na coluna d'água, diminuindo a formação de bolhas de gases no sedimento, uma vez que as bolhas tendem a passar diretamente pela coluna d'água sem sofrer oxidação, enquanto o metano dissolvido na água pode ser oxidado.

1.6 Descrição das Espécies Utilizadas

O gênero *Campsurus* Eaton, 1868 (Figura 2) é o grupo com a maior riqueza de espécies dentro da família Polymitarcyidae (Ephemeroptera) com 41 espécies descritas (Molineri *et al.*, 2015), das quais 38 foram registradas para a América do Sul (Molineri & Salles, 2013), havendo 24 registros para o território nacional (Salles *et al.*, 2004; Salles, 2006). Ninfas de *Campsurus* são fossoriais, contudo são capazes de nadar relativamente bem apenas com o auxílio das brânquias. Quando retiradas do ambiente em que vivem, nadam vagarosamente, se enterrando rapidamente ao entrarem em contato novamente com o substrato (Salles, 2006). As ninfas deste gênero colonizam preferencialmente substratos macios, formados por finas partículas de argila e constroem extensivas galerias de tubos em forma de “U”, onde produzem ondulações através do movimento de seu abdômen e suas longas projeções branquiais, produzindo uma intensa circulação de água nestes tubos (Leal & Esteves, 2000).

O presente estudo realizou duas abordagens experimentais e em cada uma delas foi utilizada uma espécie do gênero *Campsurus* distinta:

No EXPERIMENTO 1 foram utilizados indivíduos de *Campsurus violaceus* Needham & Murphy, 1924 (= *C. meyeri* Navás 1934 = *C. notatus* Needham & Murphy 1924 = *C. paranensis* Navás 1932), uma espécie comum em muitos ambientes aquáticos brasileiros, tendo sido registrada nos estados do Amazonas, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará e Piauí. O comprimento de corpo das ninfas varia entre 2 e 17 mm durante o seu ciclo de vida de aproximadamente 105 dias (Leal & Esteves, 2000). Através de sua alta produtividade secundária estes organismos representam uma importante fonte de recursos para muitas espécies de peixes. Além disso, também participam ativamente do processo de bioturbação ao construírem longos tubos verticais (maiores que 10 cm) (Leal *et al.*, 2003).

No EXPERIMENTO 2 foram utilizados indivíduos de *Campsurus truncatus* Ulmer, 1920 (= *C. mahunkai* Puthz 1973 = *C. melanocephalus* Pereira & Da-Silva 1991), uma espécie com registros nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco e Rio de Janeiro (Campos *et al.*, 2016). Assim como ocorre com *C. violaceus*, indivíduos desta espécie são encontrados em altas densidades em sedimentos finos e instáveis, onde habitam e constroem extensas galerias, com túneis de até 0,6 m. Subimagos desta espécie apresentam tamanho entre 15-18 mm para fêmeas e 14-16 mm para machos (Pereira & Da Silva, 1991 apud Leal & Esteves, 2000).

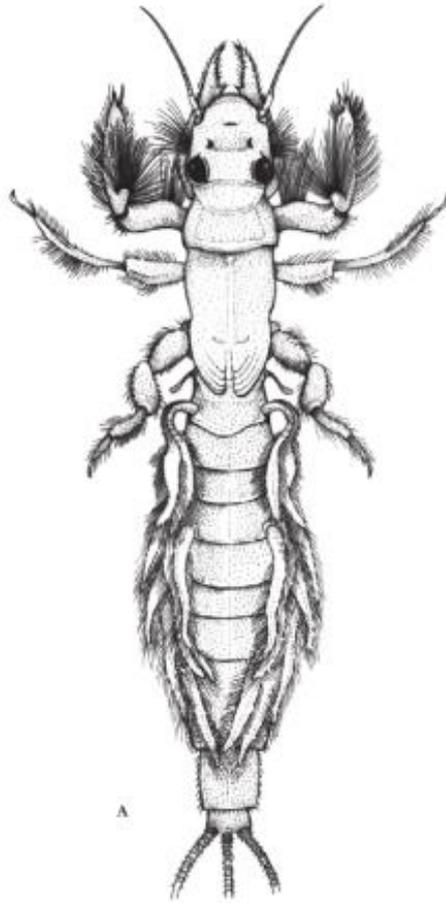


Figura 2: Padrão Corporal de uma ninfa do gênero *Campsurus*. Extraído do livro *Ephemeroptera de América del sur* (Domínguez, 2006).

1.7 Contextualização da Pesquisa

A presente pesquisa é constituída por dois experimentos com o mesmo objetivo, mas que diferem entre si com relação às técnicas utilizadas, além de outras diferenças pontuais em seus delineamentos. O EXPERIMENTO 1 foi realizado inicialmente pelo professor Marcos Paulo Figueiredo de Barros, orientador desta pesquisa, que realizou a parte de coleta e de execução do experimento, depois pelos colegas Guilherme Alfnas e Fabrício Gonçalves, também alunos do referido professor, que deram continuidade realizando as análises de laboratório, e por mim, Orlando de Marques Vogelbacher, então aluno de mestrado, que fui incumbido da tarefa de finalizar o trabalho em questão. Sendo assim, neste primeiro experimento, minha missão consistiu em realizar a parte de análise estatística dos dados e toda a parte escrita, desde a descrição do projeto, introdução da temática abordada, seus objetivos, metodologia, resultados e discussão.

Como no intervalo de tempo em que o primeiro e o segundo experimento foram realizados as técnicas para detecção bacteriana em amostras ambientais evoluíram bastante, optou-se por utilizar técnicas desenvolvidas mais recentemente na segunda abordagem experimental. Sendo assim, o EXPERIMENTO 2, o qual foi inteiramente realizado durante o meu período como aluno de mestrado no qual estive sob a orientação dos professores Marcos Paulo Figueiredo de Barros e Analy Machado de Oliveira Leite, fez uso de técnicas mais recentes em comparação com a metodologia empregada no experimento anterior. Porém, cabe ressaltar que ambas metodologias são válidas e confiáveis, de modo que o método anterior, o qual ainda continua a ser utilizado atualmente, não é defasado em relação ao que foi utilizado posteriormente. Além disso, é importante esclarecer também que esta pesquisa não se propõe a fazer uma comparação acerca da eficiência dos métodos em questão, uma vez que há uma série de diferenças pontuais no delineamento experimental entre ambos os experimentos que, de imediato, inviabilizam qualquer possibilidade de tais comparações.

O objetivo aqui é responder a questões relacionadas com a temática apresentada anteriormente na introdução, mas para isso se faz necessário estabelecer paralelos entre os estudos ecológicos de macroinvertebrados bentônicos e o crescente campo da ecologia microbiana. A ecologia geral e a ecologia microbiana se distanciaram desde muito cedo nas suas histórias, gerando buscas e perspectivas diferenciadas. A ecologia microbiana se desenvolveu como subdisciplina da microbiologia, enquanto a ecologia

de animais e plantas como subdisciplinas da ecologia geral. Como reflexo desta separação, por apresentar certa carência de fundamentação teórica mais sólida, a ecologia microbiana recorreu a correlações com a ecologia geral. Por outro lado, a compreensão de processos ecológicos muitas vezes só pode ser alcançada em sua plenitude quando em conjunto com os saberes oriundos da ecologia microbiana, sobretudo com o forte desenvolvimento do campo a partir das técnicas moleculares.

A solução para os principais problemas ambientais requer um entendimento mais preciso do conjunto de interações complexas que compõem os sistemas naturais. Diversos processos importantes, que ainda são entendidos de maneira deficiente, mas que possuem claras implicações globais, são mediados pela atividade de microrganismos. O grande desafio da ecologia microbiana reside justamente em fazer medições que sejam ao mesmo tempo acuradas e precisas na escala de populações microbianas, mas que também possam ser extrapoladas para gerar informação útil a nível local e até mesmo global. Desta forma, a partir da contribuição da ecologia de macroinvertebrados em conjunto com a ecologia microbiana, espera-se que o presente estudo seja capaz de alcançar resultados que permitam compreender melhor importantes processos relacionados ao ciclo do carbono, de modo a fornecer subsídios para elucidar possíveis lacunas do conhecimento no que tange a influência da fauna bentônica sobre a dinâmica de populações bacterianas.

1.8 Hipótese e Objetivo

Hipótese:

- O biorrevolvimento promovido por *Campsurus* sp. altera a densidade e distribuição bacteriana ao longo do perfil vertical do sedimento. Esta resposta, porém, difere entre a totalidade e a fração da comunidade bacteriana formada pelas bactérias metanotróficas.

Objetivo:

- Avaliar através de experimentos em microcosmo se, e como, o biorrevolvimento promovido por *Campsurus* sp. altera a densidade e distribuição vertical de bactérias metanotróficas e da comunidade bacteriana na interface sedimento-água.

II. EXPERIMENTO 1

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 Área de estudo

Localizado na planície amazônica, na margem direita do Rio Trombetas, o Lago Batata (Figura 3) está situado entre 1°25' e 1°35' latitude sul e 56°15' e 56°25' longitude oeste, próximo à localidade de Porto Trombetas, distrito do município de Oriximiná, no Estado do Pará, Brasil. O Lago Batata é classificado como um ecossistema de águas claras (Sioli, 1984), com alta transparência, baixa condutividade elétrica, baixa concentração de nutrientes e níveis de pH predominantemente ligeiramente ácido (Bozelli *et al.*, 2000). A bacia de drenagem do Lago Batata possui área aproximada de 271,6 km² e perímetro de 72 km (Callisto & Esteves, 1996). Este ecossistema está sujeito a flutuações temporais do nível das águas devido à influência do pulso de inundação do Rio Trombetas, causando uma grande variação em sua profundidade (de 2,5 m para 10 m) e área de superfície (de 18 km² para 30 km² aproximadamente) entre os períodos de águas baixas e águas altas, respectivamente (Panosso *et al.*, 1995). No período de águas altas, a mata de igapó localizada nas margens do lago é inundada resultando num grande aporte de material alóctone.

No período entre 1979 e 1989, aproximadamente 18 milhões de m³ de rejeito originado da atividade de mineração durante o processo de lavagem de bauxita foram despejados no interior do lago. Este efluente era composto de água e partículas sólidas, predominantemente argila (<49 µm), rica em compostos quimicamente inertes de silicato, óxido de ferro e alumínio, que se depositaram na superfície do sedimento natural do lago, assoreando aproximadamente 30% de sua área total (Callisto & Esteves, 1996; Leal & Esteves, 1999). Este impacto resultou em mudanças nas características física, química e biológica do sedimento (Bozelli *et al.*, 2000). No entanto, as amostras de sedimento utilizadas no presente estudo foram coletadas na área não impactada.

A espécie sul-americana *Campsurus violaceus* Needham & Murphy, 1924 é comum em muitos ambientes aquáticos brasileiros, incluindo lagos da várzea amazônica, onde alcança altas abundâncias e desempenham importantes papéis ecológicos (Nolte, 1987). Neste lago, que recebeu enormes quantidades de rejeito argiloso oriundo da lavagem de bauxita por cerca de uma década, as ninfas de *C. violaceus* ocorrem em toda a sua extensão, no entanto, atingem alta densidade, biomassa e produção justamente na área impactada pelo rejeito (Leal & Esteves, 1999; 2000).

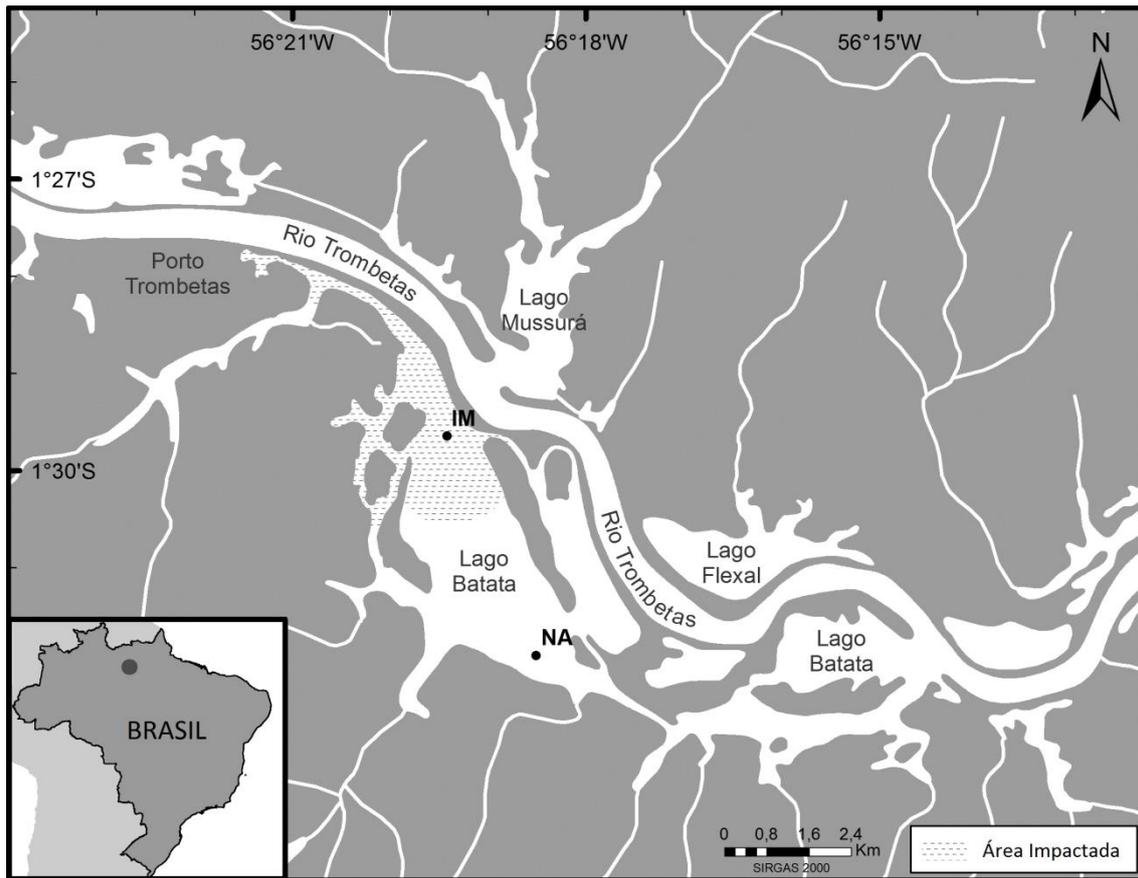


Figura 3: Mapa da localização geográfica do Lago Batata (PA, Brasil). A área hachurada do mapa (IM) equivale à área impactada pelo rejeito de bauxita, enquanto a área em branco corresponde à área natural do lago (NA). Imagem cedida por Elder Sodré.

2.1.2 Procedimentos de Coleta e Acondicionamento

Amostras de sedimento, água e indivíduos de *Campsurus violaceus* foram coletadas utilizando um amostrador tipo “core” ($\varnothing = 8$ cm e área 50 cm²) como proposto por Ambühl & Bühler (1975). Posteriormente, o sedimento foi levado para laboratório e lavado com água do lago sobre peneira de $0,5$ mm de abertura para que os macroinvertebrados bentônicos ficassem retidos. Durante este procedimento os indivíduos foram coletados e estocados em pequenos aquários contendo sedimento e água do próprio ambiente aquático. Após a lavagem, o sedimento foi acondicionado em um aquário ($40 \times 30 \times 40$ cm) formando uma camada de aproximadamente 20 cm de altura. Sobre esta camada de sedimento foi adicionada uma coluna de aproximadamente 15 cm de água filtrada (GF/C Whatman – 1.2 μ m) do ambiente.

Posteriormente, foram montados microcosmos (cilindros de acrílico de 20 cm de altura e $\varnothing = 4,5$ cm) com a água e o sedimento do aquário, de modo a criar uma interface sedimento-água (6 cm de água e 6 cm de sedimento). Para criação destes estratos cada um dos microcosmos com suas extremidades abertas foram introduzidos 6 cm de profundidade no sedimento do aquário estoque. Em seguida, a extremidade superior dos microcosmos foi tampada e cada um foi cuidadosamente puxado e suas aberturas inferiores tampadas. Este procedimento garantiu que os microcosmos experimentais fossem retirados mantendo seus estratos intactos. Em seguida os microcosmos tiveram suas tampas superiores removidas e em cada tubo foi acoplado um agitador magnético suspenso de aproximadamente 2 cm de comprimento. Os microcosmos foram dispostos ao redor de um motor de rotação magnética e todo o sistema foi mantido submerso em um aquário contendo água do Lago Batata filtrada (GF/C Whatmann - $1,2$ μ m) e aerada constantemente (Figura 4). Tanto os microcosmos como os organismos foram então mantidos no escuro e sob constante aeração durante 48 horas para estabilização.

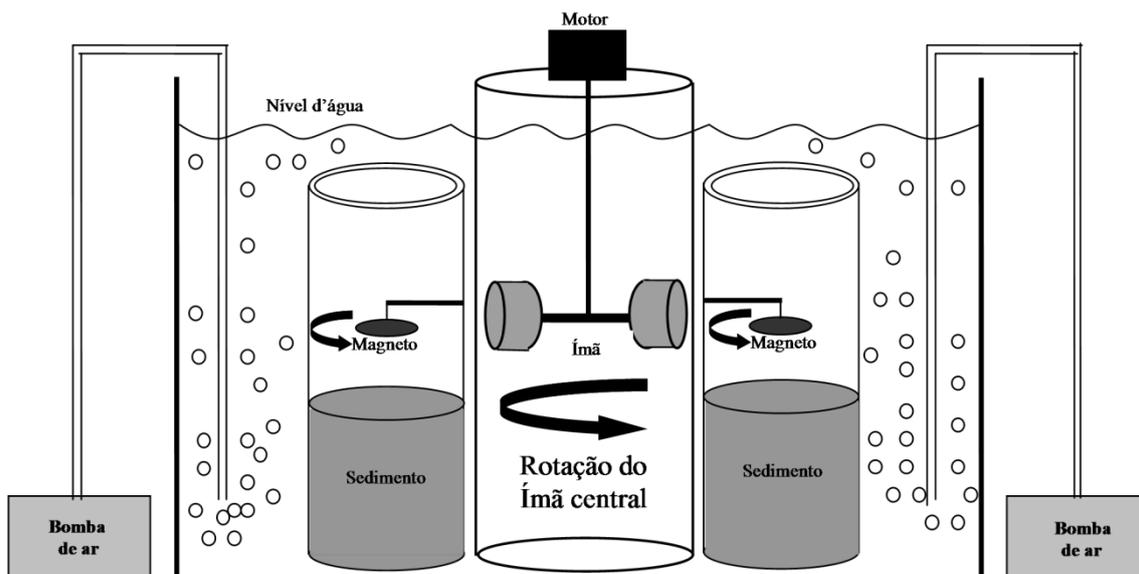


Figura 4: Esquema representativo do método utilizado para a incubação dos microcosmos. Os bastões magnéticos de cada tubo eram impulsionados por um ímã central que girava em função de um motor permitindo a homogeneização da coluna d'água dos microcosmos, seguindo metodologia descrita por Svensson (1998) e Leal *et al.* (2007). Esquema cedido por Marcos Paulo Figueiredo de Barros.

2.1.3 Desenho Experimental e Incubação

Os dois níveis do tratamento consistiam de um, com presença de *C. violaceus* (com 5 indivíduos por microcosmo), e o controle, contendo apenas a interface sedimento-água sem adição de *C. violaceus*. Cada tratamento contava com 3 réplicas.

Durante o período de incubação, cada microcosmo esteve equipado com magnetos conectados a um cilindro de acrílico a cerca de 5 cm acima da superfície do sedimento. No interior deste cilindro um ímã em constante rotação gerada por um pequeno motor acoplado ao mesmo promovia o giro dos magnetos dentro dos microcosmos. A velocidade de rotação foi mantida a constante mínima necessária, de maneira que este procedimento permitisse a homogeneização da coluna d'água evitando assim o revolvimento do sedimento e a estratificação química em função do oxigênio dissolvido conforme proposto por Svensson (1998) e Leal *et al.* (2007). Os seis microcosmos foram mantidos nestas condições por 72 horas (Figueiredo-Barros *et al.*, 2009) e após este período foram retirados do aquário mantendo-se a interface sedimento-água com aproximadamente 10 cm de sedimento e 10 cm de água. Posteriormente, amostras de sedimento em quatro estratos (0-1, 1-2, 2-4 e 4-6 cm) foram coletadas a fim de estimar a densidade bacteriana e metanotróficas.

2.1.4 Retirada das Alíquotas e Extração de DNA

Para a retirada das alíquotas de sedimento por estrato específico foi utilizado um procedimento que permite a retirada das amostras sem desfazer o perfil vertical do sedimento. Para tal, a tampa inferior do core foi removida e um tubo de menor espessura era introduzido empurrando uma rolha posicionada na porção inferior do microcosmo e o sedimento subjacente verticalmente para cima. Ao chegar ao limite superior do core, outro core de mesmo tamanho e diâmetro foi posicionado exatamente acima do core contendo o sedimento, de modo a ser encaixado perfeitamente. Este core adicional continha marcações de 1 e 2 cm em sua porção inferior, justamente para que fosse feito o fracionamento dos estratos predeterminados. Sendo assim, uma vez atingindo a marcação desejada, o core superior era levemente levantado para que uma espátula de metal fosse imediatamente introduzida, fracionando assim o sedimento no comprimento de fatia de interesse. Entre um estrato e outro e também entre o sedimento de um core e outro, a espátula em questão era flambada e a parede do core adicional contendo as marcações era limpa com álcool para que não houvesse contaminação.

De cada uma das 4 fatias (0-1, 1-2, 2-4 e 4-6 cm) era retirada uma alíquota de 0,5 mL. Posteriormente, esta era ressuspensa em 1,5 mL de solução de PFA 4 % (paraformaldeído) e fixada por um período de 24 h. Na sequência, as amostras eram centrifugadas a 12.000 g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e homogeneizadas em 1.5 mL de PBS (tampão fosfato-salino). Este mesmo processo era repetido 3 vezes, sendo que na terceira era adicionado 1,5 mL de solução 1:1 PBS + etanol para então estocar o material a -20 °C. Para liberação das bactérias aderidas às partículas do sedimento o próximo passo era o da sonicação (Epstein & Rossel, 1995), onde após ser ressuspensa, eram retirados 100 µL da alíquota para serem misturados a 500 µL de uma solução 1:1 de PBS + etanol em um microtubo de 2 mL. Então as amostras eram sonicadas no ultra-som por 30 segundos na menor intensidade (53 W), usando um pulso por segundo de sonicação. Após a sonicação, a amostra foi submetida à nova centrifugação (12.000 g, 5 min, 4 °C). Feito isso, 20 µL do sobrenadante foram recuperados e a ele adicionados 2 mL de água destilada e esta mistura foi filtrada (membrana de policarbonato branco de 0.22 µm). Após a filtração, os filtros foram colocados em placas de Petri cobertas com papel de filtro e deixados secar em temperatura ambiente. Após estarem totalmente secos, os filtros foram então armazenados a -20 °C até a hibridização.

2.1.5 FISH e Microscopia de Epifluorescência com DAPI

Para a determinação da densidade bacteriana foi utilizada a microscopia ótica de epifluorescência para contagem direta das bactérias com auxílio do corante fluorescente DAPI (4',6-diamidina-2-fenilindol). A densidade das bactérias metanotróficas foi determinada pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) a partir de alíquotas fixadas com paraformaldeído e filtradas com filtro em membrana de policarbonato e abertura de 0,2 µm. Os marcadores usados para as metanotróficas foram do TIPO I - 1041 CTCCGCTATCTCTAACAGATT (Hanson & Hanson, 1996); TIPO I - 1035 GATTCTCTGGATGTCAAGGG (Hanson & Hanson, 1996); TIPO I - MM650 CCTCTACTCAACTCTAGT (Hanson & Hanson, 1996); TIPO I - MM850 TACGTTAGCTCCACCACTAA (Hanson & Hanson, 1996); TIPO II - 1034 CCATACCGGACATGTCCAAAGC (Costello *et al.*, 2002) e Tipo IB - GCTAGCGCCCGAAGGCCT (Costello *et al.*, 2002).

Para a hibridização, o primeiro procedimento realizado foi cortar os filtros em pequenos pedaços de acordo com a quantidade de sondas específicas para marcação de grupos diferentes de bactéria que seriam utilizadas. Neste caso foram 6 sondas distintas, logo cada filtro era cortado em 6 pedaços. Por medida de segurança, metade de cada filtro não foi cortada e era armazenada. Em seguida foi feita a imobilização dos filtros em óleo de imersão sobre as lâminas. Foram utilizados como câmaras de hibridização tubos falcon de 50 mL deitados na horizontal. Cada sonda possui uma solução de hibridização específica e esta deve ser utilizada para umidificação da câmara onde a lâmina é colocada. Sendo assim, foi utilizado um pedaço de algodão embebido em 2 mL do tampão de hibridização para garantir que fosse criada uma atmosfera úmida dentro do tubo. As lâminas ficaram incubadas nas câmaras com a solução contendo 9 μL do tampão de hibridização e 1 μL da sonda por um período de 2h em estufa a 45 °C.

Passado o tempo de hibridização, as lâminas foram lavadas delicadamente com 800 μL da solução de lavagem e depois mergulhadas novamente em um tubo falcon contendo o mesmo tampão, sendo então mantida em estufa a 48 °C por 20 minutos. Após novamente lavar gentilmente a lâmina, desta vez com água destilada para retirada dos sais, foi feita a incubação com o DAPI por cerca de 10 minutos, onde foram adicionados 9 μL de água destilada estéril e 1 μL de uma solução de 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de DAPI. Posteriormente, a lâmina foi lavada com água ultra pura para retirada de um possível excesso de DAPI, evitando assim marcações inespecíficas, e os filtros foram deixados secando em temperatura ambiente. A Tabela 1 traz a composição e a concentração dos reagentes empregados para os tampões de lavagem e de hibridização. Sobre as lâminas (devidamente limpas) foi colocado entre 2,5 a 3,0 μL de uma solução de PBS:Glicerol (20:80) e sobre esta o filtro tratado após todo o processo de hibridização. Feito isto, foi colocada sobre o filtro uma gota da mesma solução e sobre esta uma lamínula, concluindo assim a montagem das lâminas para observação. As densidades bacterianas das amostras eram determinadas a partir da contagem de 20 campos aleatórios em cada filtro em microscópio de epifluorescência Olympus IX-71 equipado com filtro Chroma U-MWB2, no aumento de 1.000x.

A Figura 5 apresenta micrografias de epifluorescência com o auxílio do corante DAPI (A) e de hibridizações *in situ* fluorescentes com sondas específicas para bactérias metanotróficas (B) realizadas no presente trabalho.

Tabela 1: Concentrações dos reagentes empregados para composição dos tampões de lavagem e de hibridização.

Tampões para hibridização e lavagem		
Reagentes	Tampão de hibridização	Tampão de lavagem
NaCl 5 M Tris HCl 1 M EDTA 0,5 M Formamida Água destilada SDS 10%	360 µl 40 µl -- ¹ (% depende da sonda) q.s.p. 2 mL 2 µl	¹ (varia em relação ao % de formamida) 1 mL ² (500 µl) -- q.s.p. 50 mL 50 µl
1. Em caso de 20% para formamida são adicionados 2150 µl de NaCl 5 M. 2. Somente em caso de 20% ou mais para formamida.		

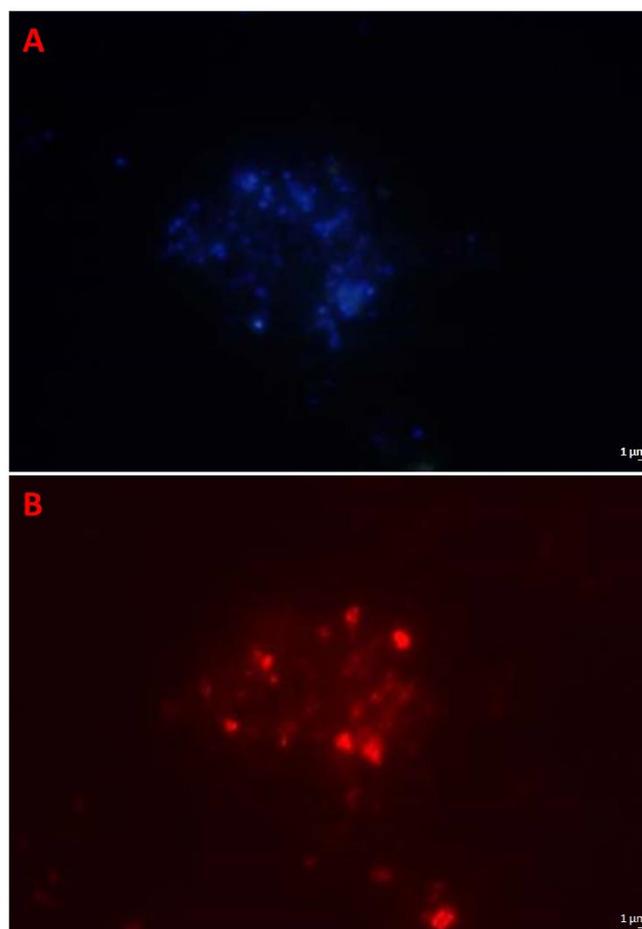


Figura 5: Micrografias de epifluorescência com o auxílio do corante DAPI (A) e de hibridizações *in situ* fluorescentes com sondas específicas para bactérias metanotróficas (B). Aumento de 1.000x. Imagens correspondentes ao presente trabalho cedidas por Guilherme Alfenas.

2.1.6 Análises estatísticas

A análise de variância bi-fatorial (Two-way ANOVA) foi empregada para analisar os efeitos individuais e combinados do efeito da presença ou ausência de *Campylobacterium violaceus* e da profundidade do sedimento sobre a densidade bacteriana no sedimento. A mesma análise nos mesmos moldes foi também empregada em relação à densidade de metanotróficas e ao percentual de metanotróficas. Em caso de diferenças significativas para todas as análises (nível de significância $\alpha = 0.05$), o pós-teste de Tukey foi utilizado para discriminar se as diferenças foram entre os tratamentos e o controle (efeito da presença), entre as diferentes frações do sedimento (efeito da profundidade) ou devido ao efeito combinado de ambos.

Foram aplicados testes estatísticos para verificar se o conjunto de dados atendia aos pressupostos da análise empregada (Two-way ANOVA), sendo utilizados os testes de Shapiro-Wilk, para a normalidade, e Levene, para homogeneidade das variâncias. Em caso de qualquer violação de algum dos pressupostos, a normalidade dos resíduos da análise também foi testada para verificar a confiabilidade dos resultados obtidos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico R versão 3.4.1.

2.2 RESULTADOS

Com a finalidade de quantificar a comunidade bacteriana total e a subpopulação formada pelas bactérias metanotróficas no sedimento, foram realizadas contagens de bactérias em microscópio de epifluorescência empregando-se o corante DAPI, para revelar a comunidade bacteriana total das amostras, e sondas específicas confeccionadas para revelar somente as bactérias metanotróficas. As Tabelas 8 e 9 mostram os valores encontrados para ambos os tratamentos de densidade bacteriana, densidade bacteriana média por estrato de sedimento, densidade de metanotróficas, densidade de metanotróficas média por estrato de sedimento, percentual de metanotróficas e percentual médio de metanotróficas por estrato de sedimento.

A presença de *Campylobacterium violaceus* e a interação entre o fator presença e profundidade do sedimento afetaram significativamente a densidade bacteriana no sedimento (ANOVA; $P < 0.05$) (Figura 6; Tabela 2). Com exceção do estrato de 1-2 cm,

a densidade bacteriana variou significativamente em relação aos tratamentos com e sem a presença de *C. violaceus* na comparação entre os valores para um mesmo estrato. No estrato de 0-1 cm ocorreu o único caso em que a densidade bacteriana foi maior para o tratamento com adição de *C. violaceus* em relação ao tratamento controle na comparação entre mesmos estratos. Por fim, em um mesmo tratamento ocorreram diferenças significativas em relação à densidade bacteriana entre o estrato 0-1 e os demais para o tratamento com *C. violaceus*, enquanto que no tratamento controle ocorreram diferenças significativas apenas entre o estrato 0-1 e os estratos 2-4 e 4-6 (pós-teste de Tukey; $P < 0.05$, Tabela 3).

A presença de *C. violaceus* e a profundidade do sedimento afetaram significativamente a densidade de metanotróficas no sedimento (ANOVA; $P < 0.05$) (Figura 7; Tabela 4). Na comparação entre os tratamentos, o estrato 0-1 do tratamento com adição de *C. violaceus* apresentou valores significativamente mais elevados em comparação a todos os estratos do tratamento controle. Em um mesmo tratamento, por sua vez, ocorreram diferenças significativas apenas entre a densidade de metanotróficas entre os estratos 0-1 e 2-4 do tratamento com adição de *C. violaceus* (pós-teste de Tukey; $P < 0.05$, Tabela 5).

A presença de *Campylobacter violaceus* e a interação entre o fator presença e profundidade do sedimento afetaram significativamente o percentual de bactérias metanotróficas no sedimento (ANOVA; $P < 0.05$) (Figura 8; Tabela 6). O estrato de 4-6 cm do tratamento com *C. violaceus* apresentou valores percentuais de metanotróficas mais elevados em relação a qualquer estrato do tratamento controle, e, internamente, diferenciou-se significativamente do estrato de 2-4 cm do tratamento com *C. violaceus* (pós-teste de Tukey; $P < 0.05$, Tabela 7).

As figuras 9 e 10 trazem fotos tiradas durante a realização do experimento, elas apresentam a espécie utilizada, detalhando seu modo de forrageio, assim como também mostram como se deu a disposição dos microcosmos, de ambos os tratamentos, durante as diferentes fases do experimento, sendo possível observar com nitidez os túneis formados por esses organismos ao longo do período de incubação.

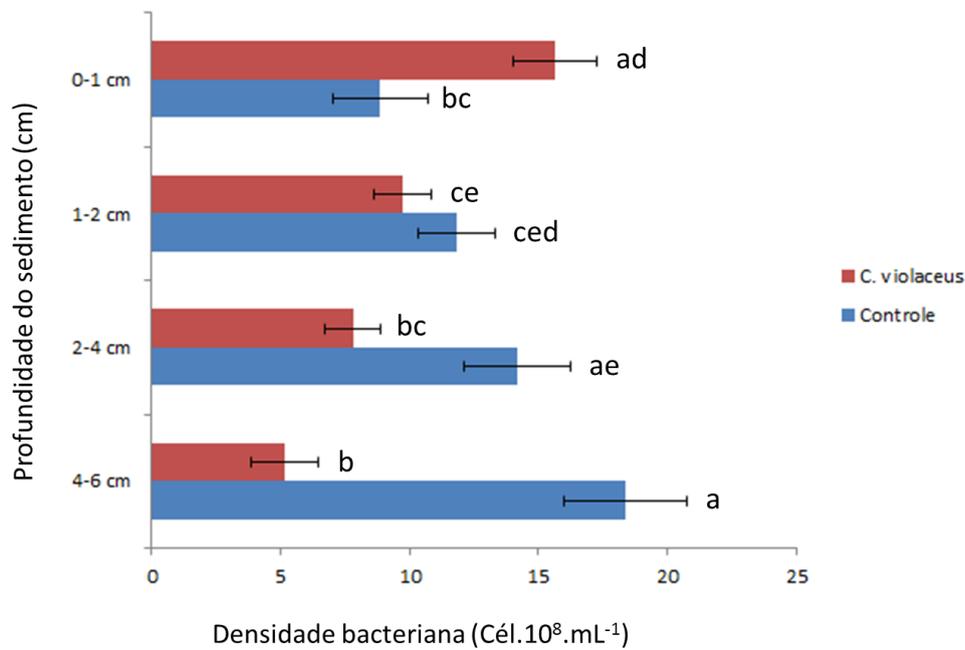


Figura 6: Densidade bacteriana nos diferentes tratamentos e estratos do sedimento. Cada barra representa média (n=3) ± o Desvio Padrão. Letras iguais indicam diferenças não significativas. “Controle” = tratamento controle e “*C. violaceus*” = tratamento com adição de *C. violaceus*.

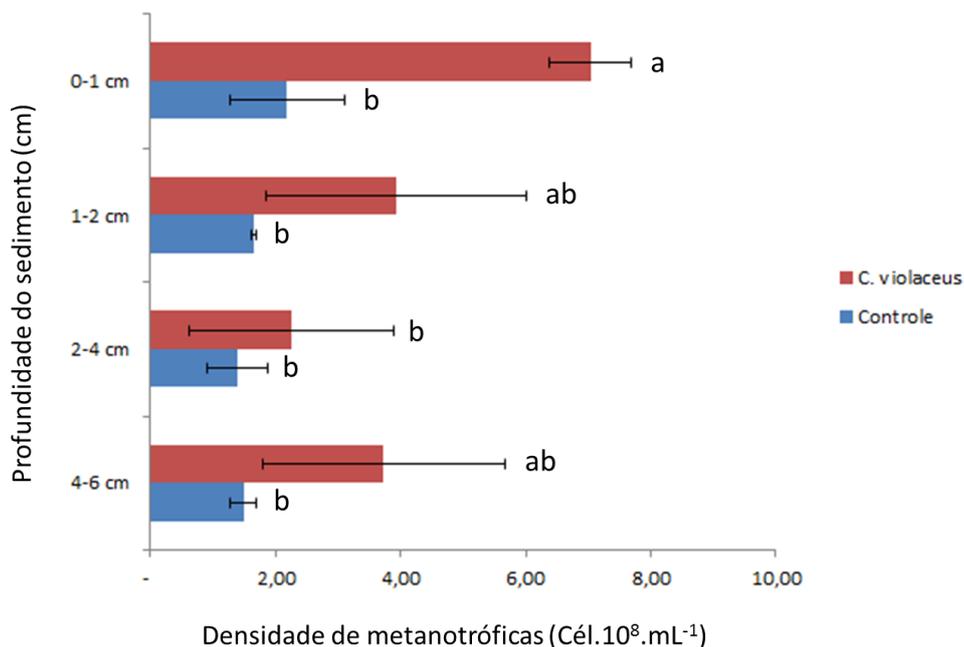


Figura 7: Densidade de bactérias metanotróficas nos diferentes tratamentos e estratos do sedimento. Cada barra representa média (n=3) ± o Desvio Padrão. Letras iguais indicam diferenças não significativas. “Controle” = tratamento controle e “*C. violaceus*” = tratamento com adição de *C. violaceus*.

Tabela 2: Resultados da análise de variância bi-fatorial (Two-way ANOVA) correspondente aos efeitos individuais e combinados da presença de *Campylobacter* e da profundidade do sedimento na densidade bacteriana no sedimento. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados.

Fator	SQ	g.l.	MQ	F	P
Presença	83.03	1	83.03	29.873	< 0.001
Profundidade	8.48	3	2.83	1.017	0.411
Presença x Profundidade	313.91	3	104.64	37.646	< 0.001
Resíduo	44.47	16	2.78	-	-

Tabela 3: Resultados da análise de variância bi-fatorial (Two-way ANOVA) correspondente aos efeitos individuais e combinados da presença de *Campylobacter* e da profundidade do sedimento na densidade de metanotróficas no sedimento. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados.

Fator	SQ	g.l.	MQ	F	P
Presença	39.30	1	39.30	25.524	< 0.001
Profundidade	24.95	3	8.32	5.402	< 0.05
Presença x Profundidade	12.52	3	4.17	2.711	0.079607
Resíduo	24.63	16	1.54	-	-

Tabela 4: Resultados do pós-teste de Tukey para análise de variância referente à densidade bacteriana. Profundidades estão identificadas por letras, onde A = 0-1 cm, B = 1-2 cm, C = 2-4 e D = 4-6 cm. “Com” = tratamento com adição de *C. violaceus* e “Sem” = tratamento controle.

PÓS-TESTE DE TUKEY (PRESENÇA)				
Comparação	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	Valor de P
Sem-Com	3.775	2.356418	5.193582	3.68e-05
PÓS-TESTE DE TUKEY (PROFUNDIDADE)				
Comparação	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	Valor de P
B-A	-1.4766667	-4.184200	1.230867	0.4272485
C-A	-1.2733333	-3.980867	1.434200	0.5490585
D-A	-0.6066667	2.100867	0.9171131	0.9171131
C-B	0.2033333	-2.504200	2.910867	0.9963489
D-B	0.8700000	-1.837534	3.577534	0.7950114
D-C	0.6666667	-2.040867	3.374200	0.8938424
PÓS-TESTE DE TUKEY (INTERAÇÃO ENTRE PRESENÇA E PROFUNDIDADE)				
Comparação	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	Valor de P
Sem:A-Com:A	-6.7800000	-11.4135512	-2.1464488	0.0022513
Com:B-Com:A	-5.9266667	-10.5602179	-1.2931155	0.0077654
Sem:B-Com:A	-3.8066667	-8.4402179	0.8268845	0.1511538
Com:C-Com:A	-7.8433333	-12.4768845	-3.2097821	0.0005003
Sem:C-Com:A	-1.4833333	-6.1168845	3.1502179	0.9456670
Com:D-Com:A	-10.6966667	-15.3302179	-6.0631155	0.0000125
Sem:D-Com:A	2.7033333	-1.9302179	7.3368845	0.4992280
Com:B-Sem:A	0.8533333	-3.7802179	5.4868845	0.9976148
Sem:B-Sem:A	2.9733333	-1.6602179	7.6068845	0.3890832
Com:C-Sem:A	-1.0633333	-5.6968845	3.5702179	0.9910166
Sem:C-Sem:A	5.2966667	0.6631155	9.9302179	0.0194150
Com:D-Sem:A	-3.9166667	-8.5502179	0.7168845	0.1314217
Sem:D-Sem:A	9.4833333	4.8497821	14.1168845	0.0000562
Sem:B-Com:B	2.1200000	-2.5135512	6.7535512	0.7528347
Com:C-Com:B	-1.9166667	-6.5502179	2.7168845	0.8300122
Sem:C-Com:B	4.4433333	-0.1902179	9.0768845	0.0651047
Com:D-Com:B	-4.7700000	-9.4035512	-0.1364488	0.0412723
Sem:D-Com:B	8.6300000	3.9964488	13.2635512	0.0001714
Com:C-Sem:B	-4.0366667	-8.6702179	0.5968845	0.1124825
Sem:C-Sem:B	2.3233333	-2.3102179	6.9568845	0.6665528
Com:D-Sem:B	-6.8900000	-11.5235512	-2.2564488	0.0019221
Sem:D-Sem:B	6.5100000	1.8764488	11.1435512	0.0033246
Sem:C-Com:C	6.3600000	1.7264488	10.9935512	0.0041325
Com:D-Com:C	-2.8533333	-7.4868845	1.7802179	0.4364689
Sem:D-Com:C	10.5466667	5.9131155	15.1802179	0.0000150
Com:D-Sem:C	-9.2133333	-13.8468845	-4.5797821	0.0000795
Sem:D-Sem:C	4.1866667	-0.4468845	8.8202179	0.0922332
Sem:D-Com:D	13.4000000	8.7664488	18.0335512	0.0000006

Tabela 5: Resultados do pós-teste de Tukey para a análise de variância referente à densidade de bactérias metanotróficas. Profundidades estão identificadas por letras, onde A = 0-1 cm, B = 1-2 cm, C = 2-4 e D = 4-6 cm. “Com” = tratamento com adição de *C. violaceus* e “Sem” = tratamento controle.

PÓS-TESTE DE TUKEY (PRESENÇA)				
Comparação	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	Valor de P
Sem-Com	-2.559167	-3.633011	-1.485323	0.0001178
PÓS-TESTE DE TUKEY (PROFUNDIDADE)				
Comparação	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	Valor de P
B-A	-1.8166667	-3.866227	0.23289347	0.0918675
C-A	-2.7850000	-4.834560	-0.73543987	0.0064402
D-A	-1.9966667	-4.046227	0.05289347	0.0575629
C-B	-0.9683333	-3.017893	1.08122680	0.5454087
D-B	-0.1800000	-2.229560	1.86956013	0.9942044
D-C	0.7883333	-1.261227	2.83789347	0.6943357
PÓS-TESTE DE TUKEY (INTERAÇÃO ENTRE PRESENÇA E PROFUNDIDADE)				
Comparação	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	Valor de P
Sem:A-Com:A	-4.85000000	-8.357525	-1.3424751	0.0038599
Com:B-Com:A	-3.09666667	-6.604192	0.4108582	0.1047585
Sem:B-Com:A	-5.38666667	-8.894192	-1.8791418	0.0013914
Com:C-Com:A	-4.78666667	-8.294192	-1.2791418	0.0043585
Sem:C-Com:A	-5.63333333	-9.140858	-2.1258084	0.0008768
Com:D-Com:A	-3.29666667	-6.804192	0.2108582	0.0734784
Sem:D-Com:A	-5.54666667	-9.054192	-2.0391418	0.0010306
Com:B-Sem:A	1.75333333	-1.754192	5.2608582	0.6696709
Sem:B-Sem:A	-0.53666667	-4.044192	2.9708582	0.9992625
Com:C-Sem:A	0.06333333	-3.444192	3.5708582	1.0000000
Sem:C-Sem:A	-0.78333333	-4.290858	2.7241916	0.9923376
Com:D-Sem:A	1.55333333	-1.954192	5.0608582	0.7799109
Sem:D-Sem:A	-0.69666667	-4.204192	2.8108582	0.9962030
Sem:B-Com:B	-2.29000000	-5.797525	1.2175249	0.3695279
Com:C-Com:B	-1.69000000	-5.197525	1.8175249	0.7058652
Sem:C-Com:B	-2.53666667	-6.044192	0.9708582	0.2608215
Com:D-Com:B	-0.20000000	-3.707525	3.3075249	0.9999991
Sem:D-Com:B	-2.45000000	-5.957525	1.0575249	0.2961130
Com:C-Sem:B	0.60000000	-2.907525	4.1075249	0.9984975
Sem:C-Sem:B	-0.24666667	-3.754192	3.2608582	0.9999960
Com:D-Sem:B	2.09000000	-1.417525	5.5975249	0.4747188
Sem:D-Sem:B	-0.16000000	-3.667525	3.3475249	0.9999998
Sem:C-Com:C	-0.84666667	-4.354192	2.6608582	0.9879757
Com:D-Com:C	1.49000000	-2.017525	4.9975249	0.8115397
Sem:D-Com:C	-0.76000000	-4.267525	2.7475249	0.9935911
Com:D-Sem:C	2.33666667	-1.170858	5.8441916	0.3470400
Sem:D-Sem:C	0.08666667	-3.420858	3.5941916	1.0000000
Sem:D-Com:D	-2.25000000	-5.757525	1.2575249	0.3894709

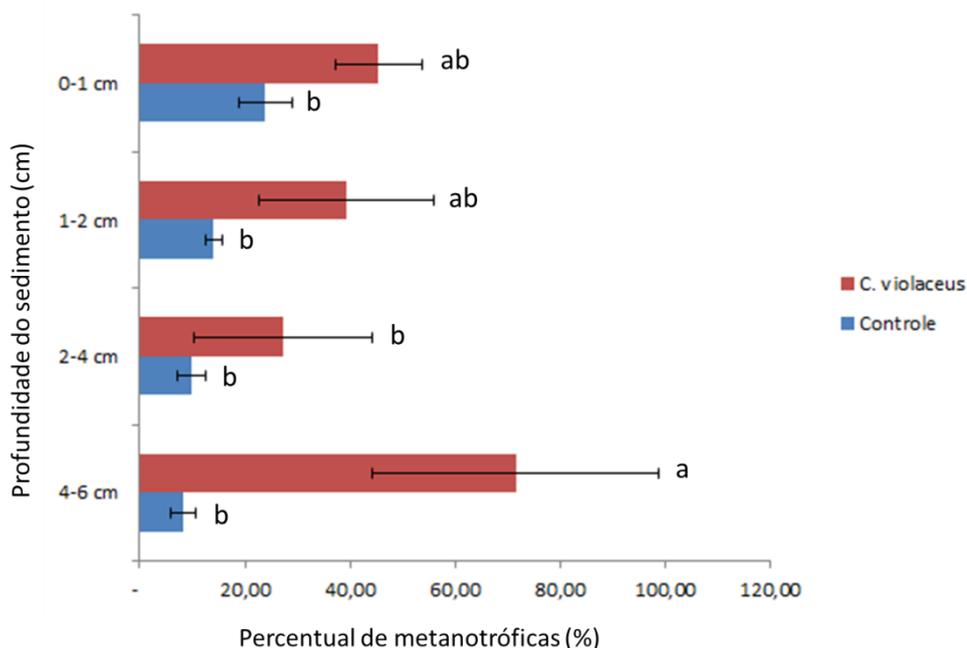


Figura 8: Percentual de bactérias metanotróficas nos diferentes tratamentos e estratos de sedimento. Cada barra representa média (n=3) \pm o Desvio Padrão. Letras iguais indicam diferenças não significativas. “Controle” = tratamento controle e “*C. violaceus*” = tratamento com adição de *C. violaceus*.

Tabela 6: Resultados da análise de variância bi-fatorial (Two-way ANOVA) correspondente aos efeitos individuais e combinados da presença de *Campsurus violaceus* e da profundidade do sedimento sobre o percentual de metanotróficas no sedimento. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados.

Fator	SQ	g.l.	MQ	F	P
Presença	6114	1	6114	25.524	< 0.001
Profundidade	1574	3	525	5.402	0.0640
Presença x Profundidade	2011	3	670	2.711	< 0,05
Resíduo	2841	16	178	-	-

Tabela 7: Resultados do pós-teste de Tukey para a análise de variância referente ao percentual de metanotróficas. Profundidades estão identificadas por letras, onde A = 0-1 cm, B = 1-2 cm, C = 2-4 e D = 4-6 cm. “Com” = tratamento com adição de *C. violaceus* e “Sem” = tratamento controle.

PÓS-TESTE DE TUKEY (PRESENÇA)				
Comparação	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	Valor de P
Sem-Com	-31.92167	-43.45358	-20.38975	2.38e-05
PÓS-TESTE DE TUKEY (PROFUNDIDADE)				
Comparação	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	Valor de P
B-A	-7.958333	-29.9683757	14.051709	0.7322495
C-A	-16.170000	-38.1800424	5.840042	0.1945095
D-A	5.205000	-16.8050424	27.215042	0.9044399
C-B	-8.211667	-30.2217090	13.798376	0.7134618
D-B	13.163333	-8.8467090	35.173376	0.3503311
D-C	21.375000	-0.6350424	43.385042	0.0585221
PÓS-TESTE DE TUKEY (INTERAÇÃO ENTRE PRESENÇA E PROFUNDIDADE)				
Comparação	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	Valor de P
Sem:A-Com:A	-21.570000	-59.236995	16.0969952	0.5207975
Com:B-Com:A	-6.020000	-43.686995	31.6469952	0.9990244
Sem:B-Com:A	-31.466667	-69.133662	6.2003285	0.1393574
Com:C-Com:A	-18.243333	-55.910329	19.4236618	0.7008861
Sem:C-Com:A	-35.666667	-73.333662	2.0003285	0.0702897
Com:D-Com:A	26.043333	-11.623662	63.7103285	0.3068265
Sem:D-Com:A	-37.203333	-74.870329	0.4636618	0.0541430
Com:B-Sem:A	15.550000	-22.116995	53.2169952	0.8313383
Sem:B-Sem:A	-9.896667	-47.563662	27.7703285	0.9806529
Com:C-Sem:A	3.326667	-34.340329	40.9936618	0.9999810
Sem:C-Sem:A	-14.096667	-51.763662	23.5703285	0.8877634
Com:D-Sem:A	47.613333	9.946338	85.2803285	0.0085945
Sem:D-Sem:A	-15.633333	-53.300329	22.0336618	0.8277554
Sem:B-Com:B	-25.446667	-63.113662	12.2203285	0.3317047
Com:C-Com:B	-12.223333	-49.890329	25.4436618	0.9419249
Sem:C-Com:B	-29.646667	-67.313662	8.0203285	0.1842303
Com:D-Com:B	32.063333	-5.603662	69.7303285	0.1268419
Sem:D-Com:B	-31.183333	-68.850329	6.4836618	0.1456639
Com:C-Sem:B	13.223333	-24.443662	50.8903285	0.9157000
Sem:C-Sem:B	-4.200000	-41.866995	33.4669952	0.9999081
Com:D-Sem:B	57.510000	19.843005	95.1769952	0.0014761
Sem:D-Sem:B	-5.736667	-43.403662	31.9303285	0.9992841
Sem:C-Com:C	-17.423333	-55.090329	20.2436618	0.7433086
Com:D-Com:C	44.286667	6.619671	81.9536618	0.0155940
Sem:D-Com:C	-18.960000	-56.626995	18.7069952	0.6626057
Com:D-Sem:C	61.710000	24.043005	99.3769952	0.0007109
Sem:D-Sem:C	-1.536667	-39.203662	36.1303285	0.9999999
Sem:D-Com:D	-63.246667	-100.913662	-25.5796715	0.0005461

Tabela 8: Dados do tratamento sem adição de *Campylobacterium violaceus* (controle) para densidade bacteriana, densidade bacteriana média por estrato de sedimento, densidade de metanotróficas, densidade de metanotróficas média por estrato de sedimento, percentual de metanotróficas e percentual médio de metanotróficas por estrato de sedimento. A unidade utilizada foi Células.10⁸.mL⁻¹.

Tratamento sem adição de <i>Campylobacterium violaceus</i> (controle)						
Profundidade	Densidade bacteriana	Média da densidade bacteriana por estrato e desvio padrão	Densidade de metanotróficas	Média da densidade de metanotróficas por estrato e desvio padrão	% de metanotróficas por estrato	% média de metanotróficas por estrato e desvio padrão
0-1 cm	8,57	8,86 ± 1,85	1,91	2,18 ± 0,92	22,28	23,91 ± 5,00
	10,84		3,20		29,52	
	7,18		1,43		19,92	
1-2 cm	12,85	11,84 ± 1,49	1,68	1,64 ± 0,04	13,07	14,01 ± 1,54
	10,13		1,60		15,79	
	12,53		1,65		13,17	
2-4 cm	16,30	14,16 ± 2,06	1,91	1,40 ± 0,49	11,72	9,81 ± 2,69
	12,20		1,34		10,99	
	13,98		0,94		6,72	
4-6 cm	20,31	18,35 ± 2,38	1,43	1,48 ± 0,22	7,04	8,27 ± 2,32
	19,03		1,30		6,83	
	15,70		1,72		10,95	

Tabela 9: Dados do tratamento com adição de *Campylobacterium violaceus* para densidade bacteriana, densidade bacteriana média por estrato de sedimento, densidade de metanotróficas, densidade de metanotróficas média por estrato de sedimento, percentual de metanotróficas e percentual médio de metanotróficas por estrato de sedimento. A unidade utilizada foi Células.10⁸.mL⁻¹.

Tratamento com adição de <i>Campylobacterium violaceus</i>						
Profundidade	Densidade bacteriana	Média da densidade bacteriana por estrato e desvio padrão	Densidade de metanotróficas	Média da densidade de metanotróficas por estrato e desvio padrão	% de metanotróficas por estrato	% média de metanotróficas por estrato e desvio padrão
0-1 cm	16,43	15,64 ± 1,61	6,29	7,03 ± 0,65	38,32	45,48 ± 8,21
	13,79		7,51		54,45	
	16,71		7,29		43,66	
1-2 cm	9,80	9,72 ± 1,13	2,85	3,93 ± 2,08	29,07	39,46 ± 16,62
	10,80		6,33		58,63	
	8,55		2,62		30,67	
2-4 cm	8,80	7,80 ± 1,08	4,03	2,24 ± 1,64	45,77	27,23 ± 17,06
	6,66		0,81		12,17	
	7,94		1,89		23,76	
4-6 cm	6,51	4,95 ± 1,30	5,85	3,73 ± 1,94	89,87	71,52 ± 27,29
	3,91		3,31		84,54	
	5,08		2,04		40,15	

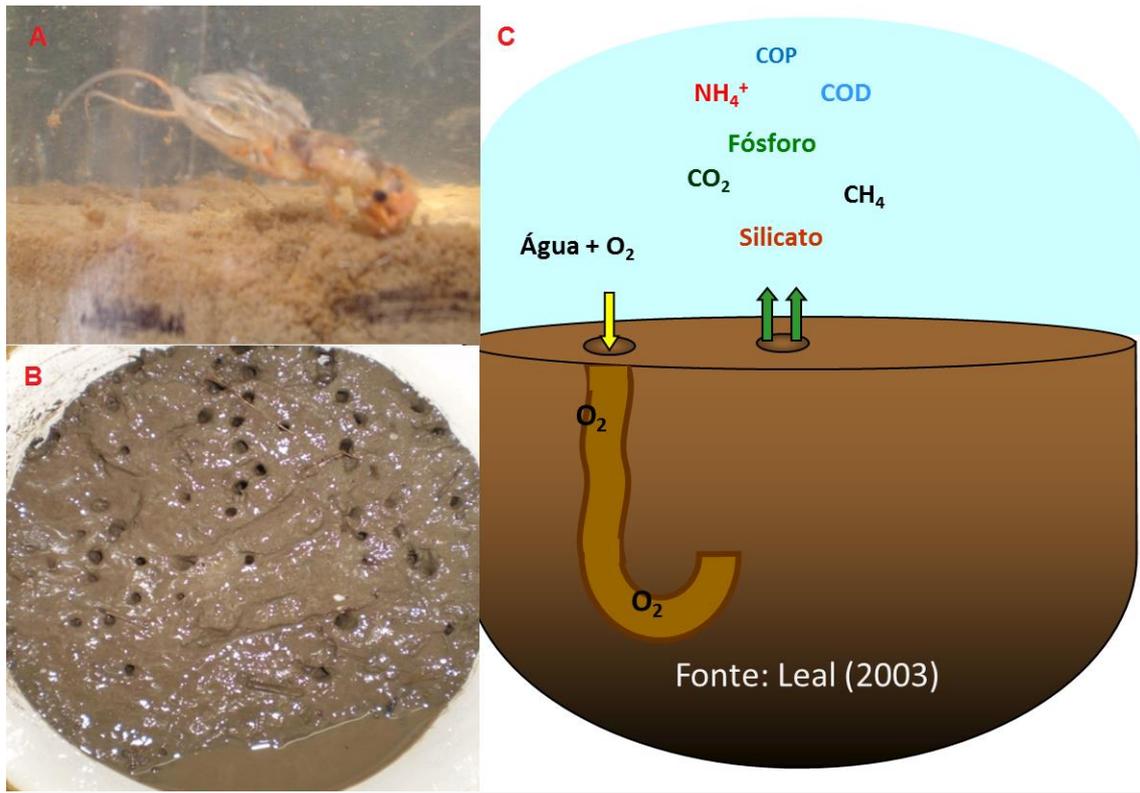


Figura 9: (A) *C. violaceus* forrageando o sedimento; (B) Vista superficial de um core com sedimento repleto de aberturas derivadas dos túneis criados por *C. violaceus*; (C) Esquema representando o túnel formado por *C. violaceus* e o fluxo de compostos que o biorrevolvimento promovido por estes organismos estimula na interface sedimento-água. Esquema extraído de Leal (2003) e imagens cedidas por Marcos Paulo Figueiredo de Barros.



Figura 10: (A) Disposição dos microcosmos durante a fase de preparação do experimento; (B) Vista de um dos microcosmos do tratamento com adição de *C. violaceus* durante a fase de incubação sendo possível observar o túnel em forma de “U” escavado pelas ninfas; (C) Vista completa de um dos microcosmos utilizados; (D) Vista de um dos microcosmos do tratamento controle. A diferença de coloração do sedimento indica onde o oxigênio está presente. Nota-se na superfície do sedimento e por onde está localizado o tubo uma coloração que indica a oxidação de compostos orgânicos. Imagens cedidas por Marcos Paulo Figueiredo de Barros.

III. EXPERIMENTO 2

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Área de Estudo

Localizada no município de Macaé, a Lagoa do Vale Encantado (Figura 11) está situada entre 22°22' e 22°23' latitude sul e 41°50' e 41°49' longitude oeste. A lagoa, que possui um perímetro aproximado de 2.225 metros e uma área de aproximadamente 79.400 m², não enfrenta elevada pressão antrópica, diferentemente do que ocorre com a outra grande lagoa e cartão postal da cidade, a Lagoa de Imboassica. A Lagoa do Vale Encantado recebe este nome devido ao bairro homônimo localizado em suas proximidades, no entanto, o entorno da lagoa é praticamente despovoado, sendo encontradas apenas algumas poucas casas em seu entorno. Essa baixa densidade demográfica no local parece resguardar este ambiente, que aparentemente se apresenta em boas condições ecológicas, o que faz desta lagoa um dos poucos refúgios naturais bem conservados restantes no perímetro urbano macaense.

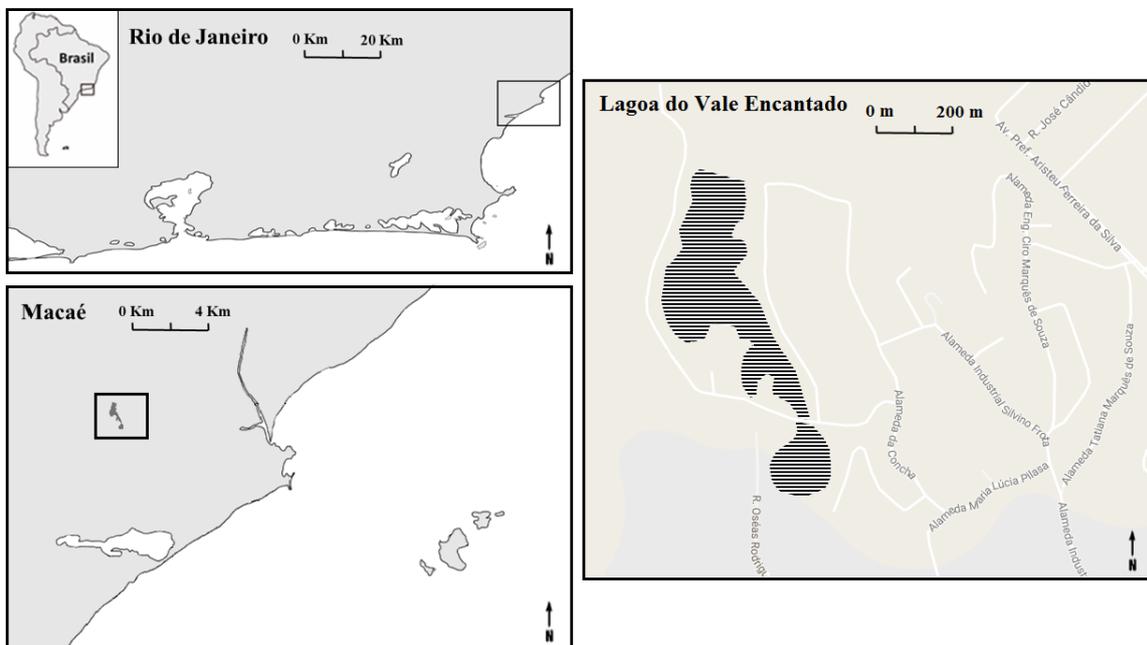


Figura 11: Mapa da localização geográfica da Lagoa do Vale Encantado (Macaé-RJ, Brasil). Modificado do Google Maps (<https://www.google.com.br/maps>), último acesso em 20-06-2017.

3.1.2 Procedimentos de Coleta e Acondicionamento

Amostras de sedimento, água e indivíduos de *Campsurus truncatus* (Ephemeroptera: Polymitarcyidae) foram coletados na Lagoa do Vale Encantado utilizando uma draga, para coleta dos organismos, e um amostrador do tipo “core” ($\emptyset = 8$ cm e área 50 cm²), para coleta de água e sedimento para confecção dos microcosmos. Os organismos foram triados no próprio ambiente, uma vez que o conteúdo da draga era despejado sobre uma peneira com malha de $0,5$ mm que ficava sobre um suporte de metal, o que permitia a triagem dos organismos no próprio local de coleta dos mesmos. Uma vez coletados, os organismos eram colocados em um balde plástico com água da própria lagoa. Foram coletados aproximadamente 150 indivíduos de *C. truncatus* em aproximadamente 3 horas de coleta.

Feita a coleta dos organismos, deu-se início a confecção dos microcosmos ($\emptyset = 6$ cm e 30 cm de altura) no próprio ambiente de coleta, de maneira que foram montados 24 cores contendo 6 cm de sedimento e coluna d'água com aproximadamente o mesmo volume em cada microcosmo. Para tal, os cores foram introduzidos no sedimento até a marcação de 6 cm feita com caneta permanente e sua porção inferior era tampada com uma rolha feita de espuma para então ser vedada completamente com uma tampa de acrílico específica, enquanto que a porção superior dos cores foi mantida totalmente em aberto. Foi coletado também um galão de 20 L de água do lago e após a coleta deste todo o material coletado foi transportado para o laboratório, onde foram imediatamente conectadas bombas de oxigênio para garantir a oxigenação constante dos baldes contendo os organismos, assim como da coluna d'água dos 24 microcosmos, que foram deixados nesta situação por cerca de 24 h para aclimatação as condições de laboratoriais (Figura 12). No laboratório foi feita também a manipulação destes microcosmos visando o ajuste das colunas d'água, adicionando ou retirando água para obter volumes de água similares entre todos os microcosmos.

Após este período de 1 dia, foi realizada uma seleção visual dos cores que serviriam para compor as malhas amostrais do grupo controle e do tratamento que receberia as ninfas de *C. truncatus*. Esta seleção foi feita com base no aspecto do sedimento, ao avaliar se havia vestígios de biorrevolvimento promovido por algum organismo, como buracos e trincheiras na superfície, além de tubos e galerias no perfil vertical do sedimento. Além disso, também foi avaliada a turbidez da coluna d'água,

uma vez que uma água turva também poderia indicar que o sedimento foi bioturbado. Neste experimento, foi feita a opção por não se utilizar de nenhuma técnica para garantir a retirada e/ou morte de qualquer macroinvertebrado que porventura houvesse sido coletado juntamente com o sedimento dos microcosmos, tendo em vista que a maior preocupação era a integridade do perfil vertical do sedimento e da comunidade bacteriana nele existente. Sendo assim, optou-se por não utilizar de práticas usuais neste tipo de experimento, como a triagem direta dos organismos do sedimento, o corte do suprimento de oxigênio dos cores ou então o seu resfriamento por determinado período, até que o organismos procurem a superfície ou venham a óbito (facilitando a sua captura e retirada em ambos os casos). A preocupação que levou a não utilização destas práticas é que tais procedimentos possivelmente iriam provocar alterações às condições biogeoquímicas do sedimento encontrado no ambiente natural e conseqüentemente iriam alterar a estrutura da comunidade bacteriana.

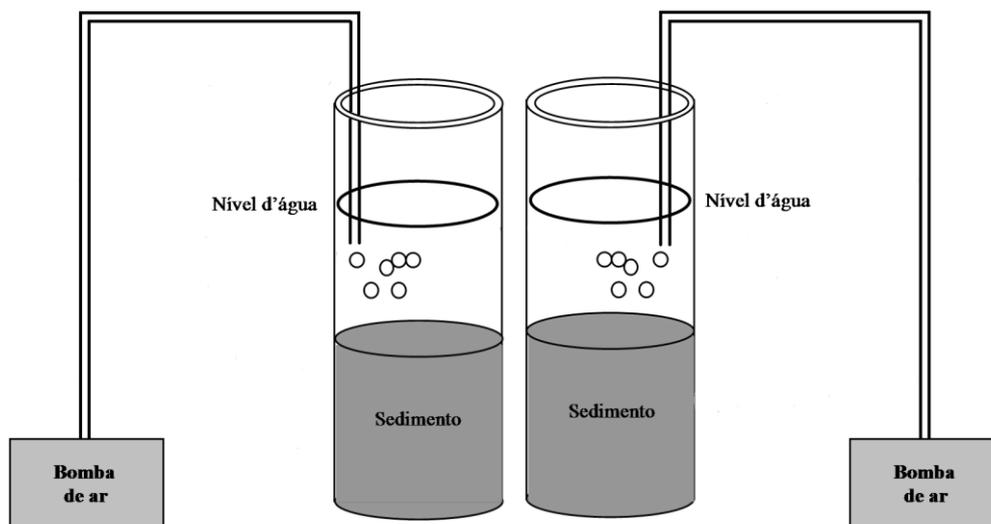


Figura 12: Esquema representativo do método utilizado para a incubação dos microcosmos. Mangueiras de silicone conduziam oxigênio fornecido pelas bombas de oxigenação para dentro dos microcosmos através de agulhas posicionadas pouco abaixo da superfície da coluna d'água. Adaptação de esquema cedido por Marcos Paulo Figueiredo de Barros.

3.1.3 Desenho Experimental e Procedimentos de Incubação

Este experimento, assim como o anterior, também consistiu de um tratamento com a presença de ninfas de *C. truncatus*, sendo que desta vez foram introduzidos 8 indivíduos por microcosmo, e um grupo controle que conteve apenas a interface sedimento-água, sem adição de ninfas de *C. truncatus*. A maior diferença, no entanto, é que este segundo experimento, contou com dois tratamentos controles, sendo um inicial e outro final. Ao todo, foram selecionados 3 microcosmos para compor a malha amostral dos controles iniciais (cujas alíquotas foram retiradas antes mesmo do início do período de incubação), 3 controles finais (cujas alíquotas foram retiradas somente após o período de incubação) e 4 microcosmos com adição de ninfas de *C. truncatus* (cujas alíquotas também foram retiradas somente após o período de incubação).

Passadas às 24 horas de aclimatação, os 4 microcosmos do tratamento com adição de *C. truncatus* começaram a receber as ninfas, de modo que cada microcosmo recebeu 4 ninfas de porte médio e 4 de porte grande, dando início assim ao período de incubação que durou 72 horas. Durante todo o período de aclimatação (24 horas) e de incubação (72 horas), cada microcosmo teve acoplado a si uma agulha inserida cerca de um centímetro abaixo da superfície da coluna d'água (Figura 11). Estas agulhas conduziam oxigênio proveniente das bombas de oxigenação, garantindo um aporte de oxigênio constante e promovendo uma leve circulação da massa d'água, suficiente para evitar uma estratificação química em função do oxigênio dissolvido, e insuficiente para causar qualquer tipo de ressuspensão do sedimento. Como explicado no item anterior, por utilizarmos o sedimento na forma com que ele foi coletado em seu ambiente natural, inicialmente não havia como garantir que algum macroinvertebrado estivesse presente no sedimento no momento da coleta. No entanto, após o experimento o sedimento foi triado estrato por estrato, revelando assim a presença ou ausência de qualquer organismo externo à incubação (o que não ocorreu).

3.1.4 Retirada das alíquotas e Extração de DNA

Para retirada das alíquotas por estrato específico de sedimento sem desfazer o perfil vertical do mesmo foi utilizado exatamente o mesmo protocolo descrito no item 2.1.4. No entanto, a diferença é que para este experimento também foram retiradas

alíquotas de água. Sendo assim, foi realizada a retirada de 100 mL de água de cada um dos microcosmos por meio de pipetas, tomando o devido cuidado para utilizar sempre ponteiros estéreis entre um microcosmo e outro. O volume de água retirado era acondicionado em tubos falcon de 50 mL que ficavam estocados no gelo para posterior filtragem. Cada tubo tinha seu volume filtrado em membrana de policarbonato branca de 0,22 µm e cada filtro era guardado no tubo de origem da água que foi filtrada, de modo que ao final da retirada das alíquotas cada microcosmo contava com dois filtros.

Para extração de DNA das amostras de sedimento utilizou-se o PowerSoil DNA Isolation Kit™ (MoBIO Laboratories) e as instruções fornecidas pelo fabricante foram seguidas a risca, conforme descrito a seguir:

Primeiramente foi adicionado 0,25 g da amostra de sedimento ao microtubo fornecido (PowerBead Tubes) e foi utilizado o vortex para gentilmente misturar a amostra com a solução do tubo. Este microtubo especial contém um padrão que ajuda na dispersão das partículas de solo, começa a dissolver ácidos húmicos e protege ácidos nucleicos da degradação. Depois, foi adicionado 60 µL da solução C1, que contém SDS (Dodecil sulfato de sódio) e outros agentes requeridos para completar a lise celular, e o tubo foi invertido diversas vezes para misturar. Os tubos então foram posicionados no vortex na posição horizontal, ficando assim por 10 minutos na velocidade máxima de rotação, de modo que esta etapa é crucial para completar a homogeneização e a lise celular, que ocorre tanto pela ação das soluções adicionadas, como pela ação mecânica. Em seguida centrifugaram-se os tubos a 10.000 g por 30 segundos a temperatura ambiente e realizar a retirada de cerca de 400 a 500 µL de sobrenadante.

O passo seguinte foi adicionar 250 µL da solução C2 e utilizar o vortex por 5 minutos, incubando por 5 minutos a 4 °C na sequência. A solução C2 um reagente para fazer precipitar material que não seja DNA, seja orgânico ou inorgânico, incluindo substâncias húmicas, detritos de células e proteínas. Os tubos foram então centrifugados a 10.000 g por 1 minuto a temperatura ambiente. Evitando o precipitado (*pellet*) formado após o passo anterior, foi retirado um volume de 600 µL do sobrenadante que foi transferido para um tubo de 2 mL limpo. O precipitado formado em questão é justamente o ponto onde se acumulou o material que não é DNA.

Todo o procedimento do passo anterior foi repetido, mas agora adicionando 200 μL da solução C3 (que tem exatamente a mesma função da C2). Desta vez, após centrifugar por 10.000 g por 1 minuto, foram retirados 750 μL do sobrenadante e este foi adicionado a um microtubo de 2 mL limpo. Feito isso, foi adicionado 1,2 mL da solução C4 ao sobrenadante e colocado em rotação no vortex por 5 minutos. A solução C4 é uma solução supersaturada de sal e é utilizada para fazer com que o DNA se combine com a sílica, algo que ocorre naturalmente em altas concentrações salinas. O próximo passo foi transferir 675 μL do tubo para mini coluna (*spin filter*) e centrifugar a 10.000 g por 1 minuto a temperatura ambiente, repetir o processo com 675 μL adicionais e novamente com o que remanescente de sobrenadante do tubo. Nesta etapa, o DNA fica retido na membrana de sílica, enquanto que os contaminantes a atravessam.

Concluída a etapa anterior foi adicionado 500 μL da solução C5 e usou-se a centrífuga a 10.000 g por 30 segundos a temperatura ambiente. A solução C5 é uma solução de lavagem a base de etanol utilizada para limpar o DNA retido na membrana de sílica, removendo os resíduos de sal, ácidos húmicos e outros contaminantes, mantendo o DNA preso à membrana. O volume que atravessou a membrana foi então descartado e foi feita uma centrifugação adicional por 1 minuto para remover qualquer o traço residual da solução de lavagem. Por fim, a mini coluna foi posicionada em um microtubo limpo de 2 mL e foi adicionado 100 μL da solução C6 no centro da membrana do filtro para eluir completamente o DNA após centrifugar por a 10.000 g por 30 segundos em temperatura ambiente.

3.1.5 qPCR com os genes *rrs* e *pmoA*

Os ensaios de qPCR foram realizados em placas de polipropileno (96 poços) utilizando-se o sistema de detecção ABI Prism 7500 (*Applied Biosystems*), para quantificação da abundância total do gene *rrs*, que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal, para quantificar a comunidade bacteriana, e do gene *pmoA*, que codifica a subunidade β da forma particulada da enzima metano monooxigenase, para quantificar as metanotróficas. Os ensaios ocorreram conforme as instruções do fabricante e as condições estabelecidas nos respectivos trabalhos de referência dos conjuntos de iniciadores com modificações quando necessário (Tabela 10).

Tabela 10: Iniciadores utilizados nos ensaios de qPCR com seus respectivos programas de amplificação. As sequências contém ambiguidades representadas pelas letras R (A, G), Y (C, T), M (A, C), S (C, G) e N (A, C, G, T).

Gene	Iniciadores	Sequência	Fragmento (pb)	Referência	Programa de Amplificação
<i>rrs</i>	357F 529R	CTACGGGRSGCAG CGCGGCTGCTGGCAG	~170	Muyzer <i>et al.</i> (1993)	94°C – 3 min; 40 ciclos, 95°C – 1 min, 55°C – 1 min, 72°C – 45s
<i>pmoA</i>	A189F Mb661R	GGNGACTGGGACTTCTGG CCGGMGCAACGTCYTTACC	~470	Costello & Lidstrom (1999)	94°C – 3 min; 40 ciclos, 95°C – 1 min, 57°C – 1 min, 72°C – 45s

Para ambos os genes, as reações de amplificação foram feitas em um volume de 20 µL contendo 10 µL de GoTaq® qPCR Master Mix 2x (Promega), 200nM de cada iniciador, H₂O q. s. p. e 2 µL de DNA. As sequências foram amplificadas o usando o par de iniciadores 357F [5' - CTA CGG GRS GCA G - 3'] e 529R [5' - CGC GGC TGC TGG CAG - 3'] (modificado a partir de Muyzer *et al.*, 1993) para bactérias totais e o par de iniciadores A189F [5' - GGN GAC TGG GAC TTC TGG - 3'] e Mb661R [5' - CCG GMG CAA CGT CYT TAC C - 3'] (modificado a partir de Costello & Lidstrom, 1999) para bactérias metanotróficas. Todas as amplificações foram realizadas em triplicata. Foram incluídas amostras de DNA-padrão (a partir de clones contendo o gene *rrs*, no caso das bactérias totais, ou *pmoA*, no caso das bactérias metanotróficas) que foram previamente utilizadas para a construção das curvas padrão, e água como controle negativo.

As curvas padrões foram obtidas realizando amplificações com um número conhecido de cópias do DNA-padrão diluído em série (1:10) dos produtos do 16S rRNA de *Bacteria* e do gene funcional *pmoA*. Cada curva foi construída com base em cinco diluições. Desta maneira, os dados da amplificação do DNA extraído das alíquotas dos microcosmos foram interpolados, para determinar o número de cópias do gene de interesse na amostra avaliada.

As condições de PCR foram 94 °C por 3 minutos, seguido de 30-40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C (para bactérias totais) ou 57 °C (para metanotróficas) por 1 min e extensão a 72 °C por 45 segundos. Para todas as

reações, após a amplificação, foi obtida uma curva de desnaturação pelo aquecimento dos produtos a 95 °C, resfriamento a 65 °C e então aquecendo gradualmente até 95 °C numa taxa de 0,2 °C por segundo. A especificidade dos produtos gerados pela reação em tempo real foi confirmada através da análise da curva de desnaturação e verificação em gel de agarose 1,2%.

3.1.6 Análises Estatísticas

Para avaliar os resultados obtidos na água foi realizada uma análise de variância uni-fatorial (One-way ANOVA) para analisar se houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos com relação à abundância de cópias do gene *rrs* de *Bacteria*, assim como também foi empregada a mesma análise com relação à abundância de cópias do gene *pmoA* de metanotróficas. A mesma análise foi empregada ainda para analisar se houve diferença significativa entre os tratamentos com relação às concentrações e saturações de oxigênio no momento da retirada das alíquotas.

Para avaliar os resultados obtidos no sedimento foi empregada a análise de variância bi-fatorial (Two-way ANOVA) para analisar os efeitos individuais e combinados do efeito dos tratamentos (com e sem a presença de *C. truncatus*) e da profundidade do sedimento sobre a densidade bacteriana. A mesma análise nos mesmos moldes foi também empregada em relação à densidade de metanotróficas.

Foram aplicados testes estatísticos para verificar se o conjunto de dados atendia aos pressupostos das análises empregadas, sendo utilizados os testes de Shapiro-Wilk, para a normalidade, e Levene, para homogeneidade das variâncias. Em caso de violação de algum dos pressupostos, a normalidade dos resíduos da análise também foi testada para verificar a confiabilidade dos resultados obtidos. Sempre que necessário os dados foram transformados (\log_{10} ou $\sqrt{\quad}$) para atender aos pressupostos das análises.

Em caso de diferenças significativas para todas as análises (nível de significância $\alpha = 0.05$), o pós-teste de Tukey foi utilizado para discriminar se as diferenças foram entre os tratamentos e os controles (efeito da presença), entre as diferentes frações do sedimento (efeito da profundidade) ou devido ao efeito combinado de ambos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico R versão 3.4.1.

3.2 RESULTADOS

Com a finalidade de quantificar a comunidade bacteriana total e a subpopulação formada pelas bactérias metanotróficas, tanto na coluna d'água quanto no sedimento, foram realizados ensaios de qPCR com conjuntos de iniciadores confeccionados especificamente para atingir esses objetivos. A Tabela 17 apresenta os dados não transformados (dados brutos) destes ensaios na água, enquanto que as Tabelas 20, 21 e 22 apresentam os dados não transformados (dados brutos) destes ensaios no sedimento.

3.2.1 Água

A análise de variância uni-fatorial (One-way ANOVA) indicou que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os diferentes tratamentos com relação à abundância de cópias do gene *rrs* (marcador para *Bacteria*) na coluna d'água (Figura 13; Tabela 11).

A mesma análise indicou também que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre o tratamento Controle Inicial e os demais tratamentos com relação à abundância de cópias do gene *pmoA* (marcador para metanotróficas) na coluna d'água (Figura 14; Tabela 12), de modo que o tratamento controle inicial apresentou valores de densidade de metanotróficas superiores ao controle final e ao tratamento com a adição de *C. truncatus*. Estes dois últimos, no entanto, não apresentaram diferenças significativas em relação aos valores de densidade de metanotróficas na comparação entre si (pós-teste de Tukey; $P < 0.05$, Tabela 13).

Com relação à variação na concentração de oxigênio no momento da retirada das alíquotas entre os diferentes tratamentos, a análise de variância uni-fatorial indicou que houve diferença significativa ($P < 0,05$) para esta variável entre os diferentes tratamentos (Figura 15; Tabela 14). O tratamento controle inicial apresentou valores significativamente superiores de concentração de oxigênio em relação aos demais tratamentos, que, por sua vez, não diferiram significativamente entre si (pós-teste de Tukey; $P < 0.05$, Tabela 15). A Tabela 16 mostra a variação nos níveis de oxigênio na água do início do experimento até o final no momento da retirada das alíquotas.

3.2.2 Sedimento

A análise de variância bi-fatorial (Two-way ANOVA) indicou que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os diferentes tratamentos com relação à abundância de cópias do gene *rrs* (marcador para *Bacteria*) no sedimento, seja na comparação entre mesmos estratos ou entre estratos distintos (Figura 16; Tabela 18).

A análise de variância bi-fatorial (Two-way ANOVA) indicou também que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os diferentes tratamentos com relação à abundância de cópias do gene *pmoA* (marcador para metanotróficas) no sedimento, seja na comparação entre mesmos estratos ou entre estratos distintos (Figura 17; Tabela 19).

A Tabela 23 mostra o posicionamento das ninfas de *C. truncatus* nos diferentes estratos do perfil vertical do sedimento ao final das 72 horas de incubação do experimento, enquanto que a Tabela 24 apresenta o valor percentual de ninfas de *C. truncatus* nos diferentes estratos do perfil vertical do sedimento ao final das 72 horas de incubação do experimento. Estes resultados demonstram o hábito escavador destas ninfas, revelando uma preferência pelo estrato mais profundo do sedimento (4-6 cm), onde foi verificada a presença de 78,12 % dos indivíduos.

As Figuras 18 e 19 são fotos tiradas durante a realização do experimento, apresentando a vista geral do experimento de modo a dar ênfase nas diferenças visuais perceptíveis entre os microcosmos que compunham os diferentes tratamentos e um maior detalhamento do processo de fracionamento do sedimento.

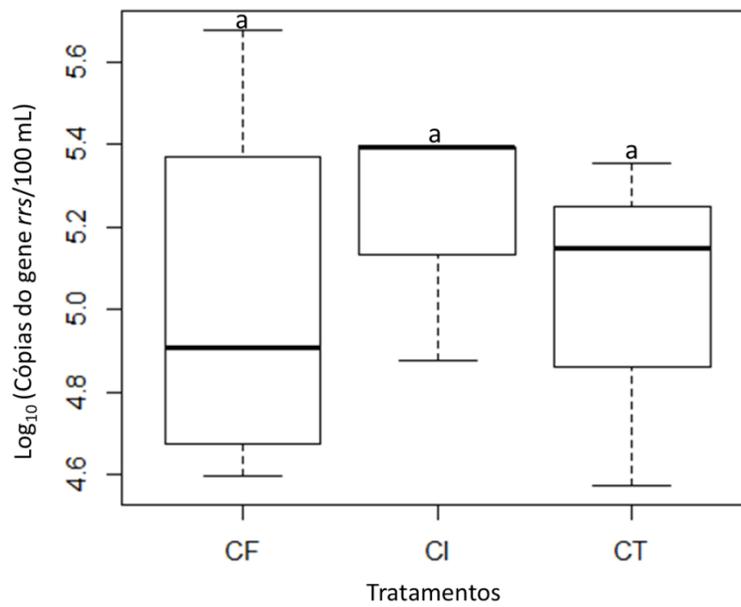


Figura 13: Abundância de cópias do gene *rrs* (marcador para *Bacteria*) nos tratamentos controle inicial (CI), controle final (CF) e com adição de *C. truncatus* (CT). Linhas verticais indicam valores mínimos e máximos e as horizontais no interior da caixa são as medianas. As caixas representam 75% dos valores encontrados. Letras iguais indicam diferenças não significativas. Dados logaritimizados.

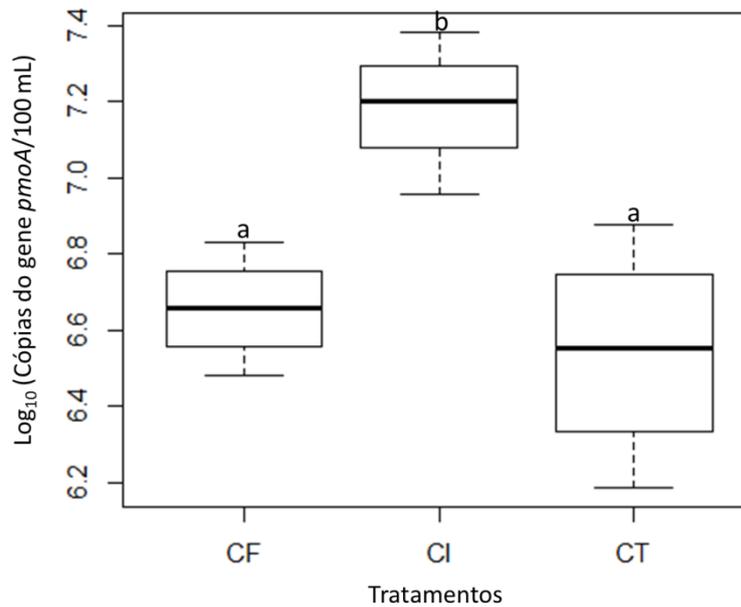


Figura 14: Abundância de cópias do gene *pmoA* (marcador para metanotróficas) nos tratamentos controle inicial (CI), controle final (CF) e com adição de *C. truncatus* (CT). Linhas verticais indicam valores mínimos e máximos e as horizontais no interior da caixa são as medianas. As caixas representam 75% dos valores encontrados. Letras iguais indicam diferenças não significativas. Dados logaritimizados.

Tabela 11: Resultados da análise de variância uni-fatorial (One-way ANOVA) correspondente à comparação entre os diferentes tratamentos com relação aos valores de densidade total bacteriana na coluna d'água. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados.

Fator	SQ	g.l.	MQ	F	P
Tratamentos	0.0833	2	0.04167	0.244	0.79
Resíduos	1.1962	7	0.17089	-	-

Tabela 12: Resultados da análise de variância uni-fatorial (One-way ANOVA) correspondente à comparação entre os diferentes tratamentos com relação aos valores de densidade de metanotróficas na coluna d'água. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados.

Fator	SQ	g.l.	MQ	F	P
Tratamentos	0.7661	2	0.3831	7.609	< 0.05
Resíduos	0.4027	8	0.0503	-	-

Tabela 13: Resultados do pós-teste de Tukey para análise de variância referente à abundância de cópias do gene *pmoA* (marcador para metanotróficas) nos diferentes tratamentos. “CF” = tratamento controle final, “CI” = tratamento controle inicial e “CT” = tratamento com adição de *C. truncatus*.

PÓS-TESTE DE TUKEY (TRATAMENTOS)				
Comparação	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	Valor de P
CI-CF	0.5250312	0.03536345	1.0146989	0.0369514
CT-CF	-0.1145882	-0.56793244	0.3387560	0.7577589
CT-CI	-0.6396194	-1.12928712	-0.1499517	0.0141780

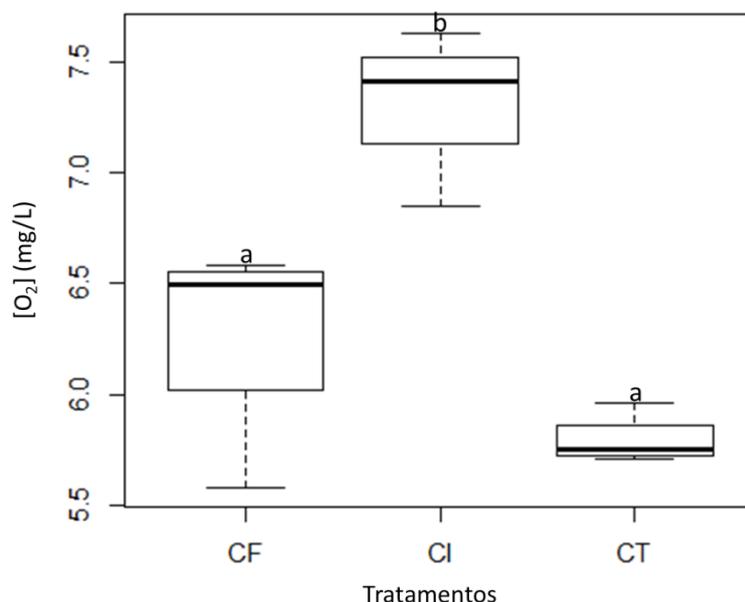


Figura 15: Concentração de oxigênio na água nos tratamentos controle inicial (CI), controle final (CF) e com adição de *C. truncatus* (CT). Linhas verticais indicam valores mínimos e máximos e as horizontais no interior da caixa são as medianas. As caixas representam 75% dos valores encontrados. Letras iguais indicam diferenças não significativas.

Tabela 14: Resultados da análise de variância uni-fatorial (One-way ANOVA) correspondente à comparação entre os diferentes tratamentos com relação aos níveis de concentração de oxigênio na coluna d'água no momento da retirada das alíquotas. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados.

Fator	SQ	g.l.	MQ	F	P
Tratamentos	3.924	2	1.9619	15.15	< 0.01
Resíduos	1.036	8	0.1295	-	-

Tabela 15: Resultados do pós-teste de Tukey para análise de variância referente aos níveis de concentração de oxigênio na coluna d'água nos diferentes tratamentos no momento da retirada das alíquotas. “CF” = tratamento controle final, “CI” = tratamento controle inicial e “CT” = tratamento com adição de *C. truncatus*.

PÓS-TESTE DE TUKEY (TRATAMENTOS)				
Comparação	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	Valor de P
CI-CF	1.009167	0.223711	1.7946224	0.0154482
CT-CF	-0.492500	-1.219691	0.2346907	0.1908366
CT-CI	-1.501667	-2.287122	-0.7162110	0.0015299

Tabela 16: Dados da variação na concentração de oxigênio nos microcosmos dos tratamentos sem adição de *Campylobacter truncatus* (controle inicial e final) e do tratamento com adição de *Campylobacter truncatus*. Dados do início do experimento e do final no momento da retirada das alíquotas. A unidade utilizada foi mg/L.

Variação no nível de oxigênio na água			
Tratamento	Amostra	[O₂] no início	[O₂] na retirada da alíquota
Controle Inicial	4	7,47	6,85
	17	7,83	7,41
	34	7,87	7,63
Controle Final	2	7,58	6,58
	7	7,28	6,46
	16	7,72	5,58
	26	7,28	6,53
Tratamento com <i>C. truncatus</i>	11	7,11	5,96
	20	7,45	5,71
	37	6,95	5,77
	40	7,60	5,74

Tabela 17: Dados dos tratamentos sem adição de *Campylobacter truncatus* (controle inicial e final) e do tratamento com adição de *Campylobacter truncatus* para abundância do gene *rrs*, abundância do gene *rrs* média por tratamento, abundância do gene *pmoA* e abundância do gene *pmoA* média por tratamento. A unidade utilizada foi abundância do gene 16S *rrs*/100 mL de H₂O da amostra para bactéria e abundância do gene *pmoA*/100 mL de H₂O da amostra para metanotróficas.

Resultados na água					
Tratamento	Amostra	Abundância do gene <i>rrs</i> (Bactéria)	Média da abundância do gene <i>rrs</i> por tratamento e desvio padrão	Abundância do gene <i>pmoA</i> (Metanotróficas)	Média da abundância do gene <i>pmoA</i> por tratamento e desvio padrão
Controle Inicial	4	7,52E+04	1,91E+05 ± 1,00E+05	2,42E+07	1,64E+07 ± 7,58E+06
	17	2,47E+05		9,11E+06	
	34	2,50E+05		1,59E+07	
Controle Final	2	4,78E+05	1,72E+05 ± 2,07E+05	6,80E+06	4,73E+06 ± 1,57E+06
	7	5,63E+04		3,02E+06	
	16	1,15E+05		4,30E+06	
	26	3,96E+04		4,79E+06	
Tratamento com <i>C. truncatus</i>	11	3,69E+09*	1,35E+05 ± 9,43E+04	4,17E+06	4,08E+06 ± 2,56E+06
	20	1,41E+05		1,54E+06	
	37	2,26E+05		3,05E+06	
	40	3,73E+04		7,55E+06	

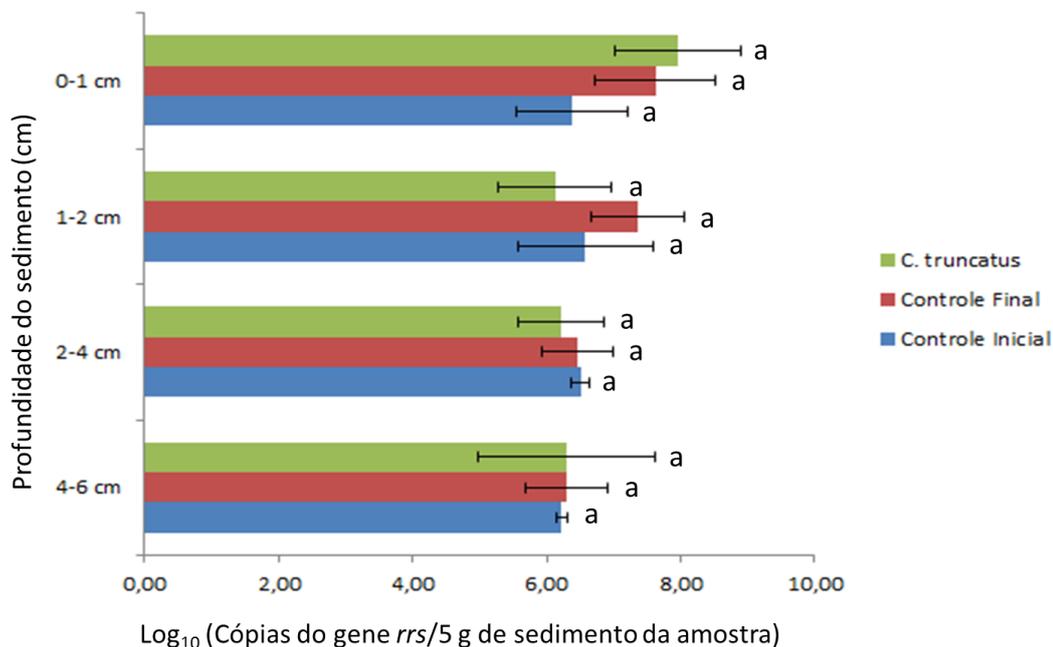


Figura 16: Abundância de cópias do gene *rrs* (marcador para *Bacteria*) em diferentes profundidades do sedimento nos diferentes tratamentos. Cada barra representa média ($n = 3$ ou 4) \pm o Desvio Padrão. Letras iguais indicam diferenças não significativas. “*C. truncatus*” representa o tratamento com adição das ninfas. Dados transformados (\log_{10}).

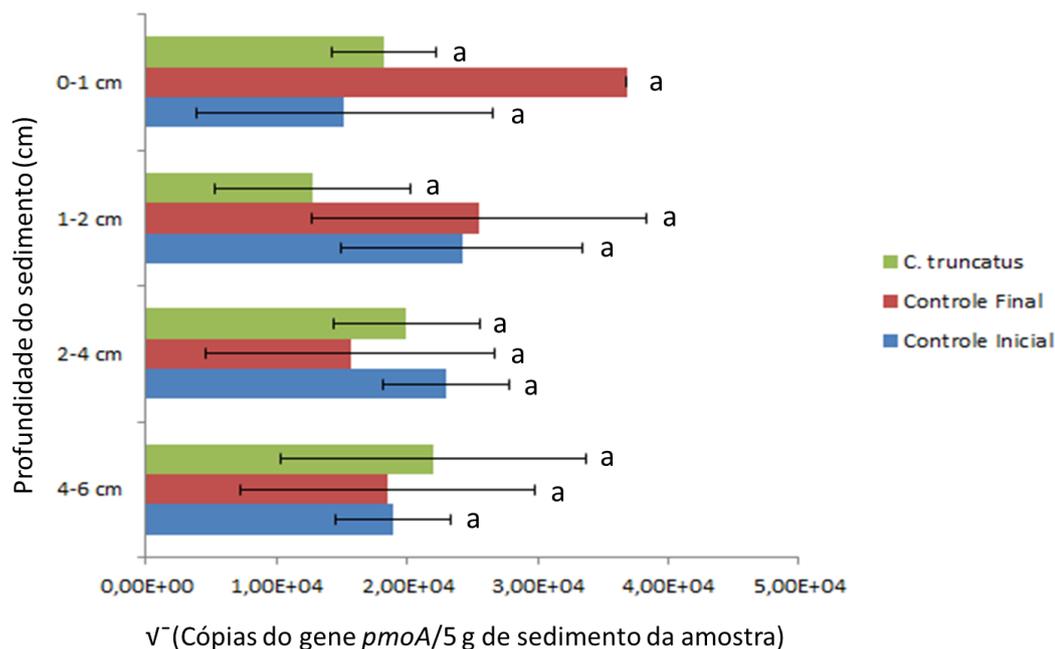


Figura 17: Abundância de cópias do gene *pmoA* (marcador para metanotróficas) em diferentes profundidades do sedimento nos diferentes tratamentos. Cada barra representa média ($n = 3$ ou 4) \pm o Desvio Padrão. Letras iguais indicam diferenças não significativas. “*C. truncatus*” representa o tratamento com adição das ninfas. Dados transformados ($\sqrt{}$).

Tabela 18: Resultados da análise de variância bi-fatorial (Two-way ANOVA) correspondente aos efeitos individuais e combinados dos tratamentos (com e sem a presença de *Campylobacter trunctatus*) e da profundidade do sedimento sobre a abundância de cópias do gene *rrs* (marcador para *Bacteria*) no sedimento. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados.

Fator	SQ	g.l.	MQ	F	P
Tratamento	1.377	2	0.6886	1.053	0.367
Profundidade	2.626	3	0.8752	1.338	0.289
Tratamento x Profundidade	2.850	6	0.4750	0.726	0.633
Resíduo	13.733	21	0.6540	-	-

Tabela 19: Resultados da análise de variância bi-fatorial (Two-way ANOVA) correspondente aos efeitos individuais e combinados dos tratamentos (com e sem a presença de *Campylobacter trunctatus*) e da profundidade do sedimento sobre a abundância de cópias do gene *pmoA* (marcador para metanotróficas) no sedimento. (SQ) soma dos quadrados, (g.l.) graus de liberdade, (MQ) média dos quadrados.

Fator	SQ	g.l.	MQ	F	P
Tratamento	4.119e+07	2	20594711	0.244	0.785
Profundidade	5.603e+05	3	186779	0.002	1.000
Tratamento x Profundidade	9.253e+08	6	154209039	1.827	0.136
Resíduo	2.026e+09	24	84425936	-	-

Tabela 20: Dados do Tratamento Controle Inicial para abundância do gene *rrs* por amostra, abundância do gene *rrs* média por estrato, abundância do gene *pmoA* por amostra e abundância do gene *pmoA* média por estrato. A unidade utilizada foi abundância de cópias do gene *rrs*/5 g da amostra se sedimento para bactéria e abundância de cópias do gene *pmoA*/5 g da amostra de sedimento para metanotróficas.

Tratamento Controle Inicial					
Estrato	Amostra	Abundância do gene <i>rrs</i> (<i>Bacteria</i>)	Média da abundância do gene <i>rrs</i> por tratamento e desvio padrão	Abundância do gene <i>pmoA</i> (Metanotróficas)	Média da abundância do gene <i>pmoA</i> por tratamento e desvio padrão
0-1 cm	4A	-	2,39E+06 ± 2,95E+06	4,10E+07	2,30E+08 ± 3,45E+08
	17A	4,48E+06		6,29E+08	
	34A	3,07E+05		2,14E+07	
1-2 cm	4B	3,65E+06	3,77E+06 ± 3,73E+06	6,88E+08	5,86E+08 ± 3,87E+08
	17B	7,56E+06		9,11E+08	
	34B	1,00E+05		1,57E+08	
2-4 cm	4C	3,92E+06	3,22E+06 ± 9,97E+05	6,82E+08	5,26E+08 ± 2,20E+08
	17C	2,51E+06		3,71E+08	
	34C	-		-	
4-6 cm	4D	1,44E+06	1,66E+06 ± 3,13E+05	1,86E+08	3,57E+08 ± 1,56E+08
	17D	-		4,93E+08	
	34D	1,88E+06		3,93E+08	

Tabela 21: Dados do Tratamento Controle Final para abundância do gene *rrs* por amostra, abundância do gene *rrs* média por estrato, abundância do gene *pmoA* por amostra e abundância do gene *pmoA* média por estrato. A unidade utilizada foi abundância de cópias do gene *rrs*/5 g da amostra se sedimento para bactéria e abundância de cópias do gene *pmoA*/5 g da amostra de sedimento para metanotróficas.

Tratamento Controle Final					
Estrato	Amostra	Abundância do gene <i>rrs</i> (<i>Bacteria</i>)	Média da abundância do gene <i>rrs</i> por tratamento e desvio padrão	Abundância do gene <i>pmoA</i> (Metanotróficas)	Média da abundância do gene <i>pmoA</i> por tratamento e desvio padrão
0-1 cm	2A	-	4,18E+07 ± 5,32E+07	-	1,36E+09
	16A	7,94E+07		-	
	26A	4,17E+06		1,36E+09	
1-2 cm	2B	3,90E+06	2,26E+07 ± 3,25E+07	7,68E+07	6,49E+08 ± 5,26E+08
	16B	6,02E+07		7,57E+08	
	26B	3,85E+06		1,11E+09	
2-4 cm	2C	1,47E+06	2,90E+06 ± 3,29E+06	6,35E+07	2,45E+08 ± 3,48E+08
	16C	6,66E+06		6,46E+08	
	26C	5,81E+05		2,41E+07	
4-6 cm	2D	5,45E+05	1,95E+06 ± 2,59E+06	4,31E+07	3,42E+08 ± 4,11E+08
	16D	4,94E+06		8,11E+08	
	26D	3,64E+05		1,72E+08	

Tabela 22: Dados do Tratamento com adição de *C. truncatus* para abundância do gene *rrs* por amostra, abundância do gene *rrs* média por estrato, abundância do gene *pmoA* por amostra e abundância do gene *pmoA* média por estrato. A unidade utilizada foi abundância de cópias do gene *rrs*/5 g da amostra se sedimento para bactéria e abundância de cópias do gene *pmoA*/5 g da amostra de sedimento para metanotróficas.

Tratamento com adição de <i>C. truncatus</i>					
Estrato	Amostra	Abundância do gene <i>rrs</i> (<i>Bacteria</i>)	Média da abundância do gene <i>rrs</i> por tratamento e desvio padrão	Abundância do gene <i>pmoA</i> (Metanotróficas)	Média da abundância do gene <i>pmoA</i> por tratamento e desvio padrão
0-1 cm	11A	-	9,01E+07 ± 1,54E+08	2,95E+08	3,33E+08 ± 1,48E+08
	20A	1,17E+06		-	
	37A	1,52E+06		4,96E+08	
	40A	2,67E+08		2,06E+08	
1-2 cm	11B	1,59E+06	1,34E+06 ± 1,51E+06	1,59E+06	1,63E+08 ± 1,57E+08
	20B	3,38E+06		3,76E+08	
	37B	1,76E+05		1,11E+08	
	40B	2,13E+05		1,66E+08	
2-4 cm	11C	-	1,67E+06 ± 1,43E+06	4,01E+08	3,97E+08 ± 2,36E+08
	20C	2,86E+06		7,30E+08	
	37C	2,07E+06		2,24E+08	
	20C	8,60E+04		2,34E+08	
4-6 cm	11D	6,82E+04	1,99E+06 ± 2,55E+06	1,23E+08	4,82E+08 ± 4,52E+08
	20D	4,89E+06		8,82E+08	
	37D	1,00E+06		6,00E+07	
	40D	-		8,65E+08	

Tabela 23: Posicionamento das ninfas de *C. truncatus* nos diferentes estratos do perfil vertical do sedimento ao final das 72 horas de incubação do experimento.

Posicionamento das ninfas de <i>C. truncatus</i> ao final do experimento				
Amotras	Número de indivíduos no estrato de 0-1 cm	Número de indivíduos no estrato de 1-2 cm	Número de indivíduos no estrato de 2-4 cm	Número de indivíduos no estrato de 4-6 cm
11	1	-	-	7
20	-	-	2	6
37	-	-	2	6
40	1	1	-	6

Tabela 24: Valor percentual de ninfas de *C. truncatus* nos diferentes estratos do perfil vertical do sedimento ao final das 72 horas de incubação do experimento.

Percentual de ninfas de <i>C. truncatus</i> por estrato ao final do experimento				
Amotras	% de indivíduos no estrato de 0-1 cm	% de indivíduos no estrato de 1-2 cm	% de indivíduos no estrato de 2-4 cm	% de indivíduos no estrato de 4-6 cm
4 amostras (32 indivíduos)	6,25 %	3,12 %	12,50 %	78,12 %



Figura 18: Vista geral do experimento. Microcosmos do tratamento com adição de ninfas de *C. truncatus* à esquerda e microcosmos do tratamento controle à direita. Imagens correspondentes ao presente trabalho.

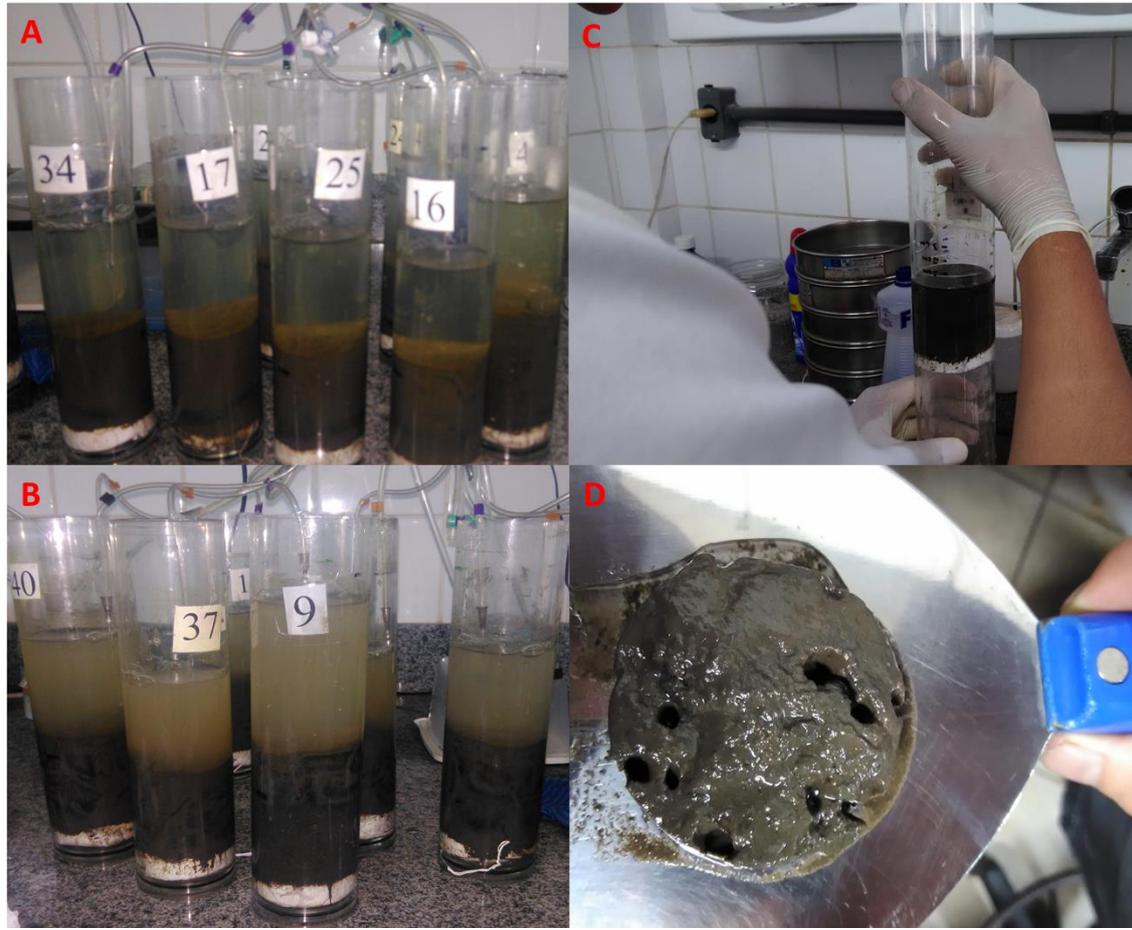


Figura 19: (A) Microcosmos do tratamento controle apresentam água translúcida; (B) Microcosmos do tratamento com *C. truncatus* apresentam água bastante turva; (C) Processo de separação dos estratos do sedimento; (D) Vista de cima da fatia superficial (0-1 cm) repleta de buracos feitos por *C. truncatus*. Imagens correspondentes ao presente trabalho.

IV. DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO 1

O efeito significativo da presença de indivíduos de *Campsurus violaceus* com relação à densidade bacteriana total e de bactérias metanotróficas (Tabelas 2 e 3) pode estar relacionado ao modo de forrageio do sedimento desta espécie. Os organismos da espécie *C. violaceus* são detritívoros, suas ninfas constroem tubos em forma de “U” e/ou “J” no sedimento onde eles estão presentes. Por não suportarem baixas concentrações de oxigênio dissolvido, estes organismos promovem continuamente a circulação de água nos tubos a partir de ondulações do abdômen e das projeções branquiais (Wang *et al.*, 2001). Deste modo, o organismo é capaz de alterar a densidade e distribuição vertical da comunidade bacteriana no sedimento através de fatores como (i) aumento na difusão de oxigênio para os estratos inferiores promovendo o aumento da zona oxidada do sedimento (Wang *et al.*, 2001; Leal *et al.*, 2005) (ii) remobilização de nutrientes e outros compostos estocados no sedimento (especialmente CH₄ e formas nitrogenadas e fosfatadas) tornando-os disponíveis para o consumo bacteriano (Leal *et al.*, 2003; Figueiredo-Barros, 2004; Figueiredo-Barros *et al.*, 2007); (iii) deslocamento de bactérias através do fluxo de água intersticial e aderidas a partículas ressuspensas (Figueiredo-Barros *et al.*, 2007; Gonçalves, 2013); (iv) ingestão de bactérias aderidas a detritos orgânicos (Nolte, 1987; Callisto & Esteves, 1996; Eller *et al.*, 2005) e (v) excreção inerente ao próprio metabolismo e fisiologia dos organismos fornecendo substrato para colonização bacteriana (Figueiredo-Barros *et al.*, 2009).

O fato do primeiro estrato (0-1 cm) do tratamento com organismos ser o único onde a densidade bacteriana aumentou em relação ao tratamento controle (Figura 6, Tabelas 2 e 4) pode ser justificado pela distribuição dos indivíduos de *C. violaceus* ao longo do perfil vertical do sedimento. Gonçalves (2013), trabalhando com tratamentos com macroinvertebrados com diferentes modos de forrageio do sedimento, incluindo *Campsurus sp.*, verificou em que fração do sedimento os organismos se encontravam ao final do experimento. Como resultado, este autor observou que os organismos desta espécie foram encontrados apenas a partir da segunda fração (2-4 cm), onde foram encontrados 33% dos indivíduos, ocorrendo em maior quantidade na terceira fração (4-6 cm), onde 50% dos indivíduos foram encontrados, e também ocorrendo no último estrato (6-8 cm), que apresentou 17% dos indivíduos. Sendo assim, é possível que o

deslocamento de bactérias através do fluxo de água intersticial e a ressuspensão de bactérias aderidas a partículas através da bioturbação promovida pelas ninfas tenha sido um fator determinante para este aumento na densidade bacteriana no primeiro estrato.

Figueiredo-Barros *et al.* (2007), em um experimento que avaliou o efeito do biorrevolvimento promovido por *C. violaceus* sobre a concentração de sólidos totais em suspensão (STS), observaram um aumento significativo nos valores de STS para coluna d'água no tratamento com a presença deste organismo, o que evidencia sua capacidade de através do intenso fluxo de água criado a partir da movimentação das projeções branquiais causar a suspensão de compostos dissolvidos e particulados depositados no substrato para a coluna d'água sobrejacente. Os resultados obtidos por estes autores fornecem mais um elemento que ajuda a sustentar a ideia de que este aumento na densidade bacteriana verificado no estrato superficial esteja relacionado ao aporte de bactérias aderidas ao material particulado que é ressuspenso em decorrência da atividade bioturbadora destes organismos.

No entanto, a explicação pode não estar restrita apenas ao efeito mecânico da bioturbação, pode ser que o aporte de nutrientes por meio do carreamento de frações dissolvidas e particuladas dos estratos internos do sedimento para a superfície através do processo de bombeamento e/ou bioirrigação tenha contribuído para este aumento na densidade bacteriana no estrato mais superficial. Portanto, é possível que a remobilização destes recursos antes estocados no sedimento tenha subsidiado um crescimento bacteriano mais elevado na primeira fração do sedimento. Uma série de trabalhos publicados descreve o efeito do biorrevolvimento promovido por ninfas do gênero *Campsurus* sobre o fluxo de nutrientes na interface sedimento-água, reforçando o papel exercido por este grupo de organismos na ciclagem de nutrientes e no acoplamento de compartimentos em ambientes aquáticos.

Neste contexto, Leal *et al.* (2003) observaram que o biorrevolvimento promovido por *C. violaceus* se mostrou muito eficiente na remobilização de N-NH_4^+ do sedimento promovendo sua liberação para a coluna d'água. Figueiredo-Barros (2004), trabalhando com a espécie *C. truncatus*, também demonstrou que o processo de bioturbação promovido por essas ninfas resulta em um aumento nos fluxos de N-NH_4^+ para a coluna d'água, sendo que os resultados obtidos neste estudo em questão ($107,74$ a $409 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$) são superiores aos observados para a espécie *C. violaceus* ($78,3$ a

165,3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$) por Leal *et al.* (2003), algo que, segundo o autor, deve estar relacionado com às diferentes características do sedimento de ambos os trabalhos. Figueiredo-Barros *et al.* (2007) demonstraram ainda que, além dos compostos nitrogenados dissolvidos, *C. violaceus* também contribui para o aumento da concentração de nitrogênio total para a coluna d'água o que reforça ainda mais sua importância no funcionamento de ambientes aquáticos. Neste caso, a contribuição das ninfas de *Campsurus* sp. para o aumento do fluxo de formas nitrogenadas para a coluna d'água deve estar relacionada principalmente a fatores como o estímulo a liberação de amônia acumulada na água intersticial (em condições anóxicas) através de sua atividade de construção de tubos, o estímulo a processos de decomposição por oxigenar estratos profundos do sedimento e através de seus excretas (Figueiredo-Barros, 2004).

Além das formas nitrogenadas, Figueiredo-Barros (2004), em estudo com ninfas de *C. truncatus*, verificou que o biorrevolvimento promovido por este organismo aumenta também as taxas de liberação de fósforo dissolvido. De maneira semelhante, Leal (2003), em estudo com ninfas de *C. violaceus*, também observou fluxos médios de fósforo dissolvido superiores para os cores submetidos à bioturbação. Nestes casos, a mistura causada pela bioturbação durante o processo de escavação dos tubos e pelo fluxo de água promovido pela movimentação do abdômen e das projeções branquiais das ninfas promove o transporte do fósforo orgânico proveniente da coluna d'água depositado no estrato superficial aeróbico do sedimento para os estratos mais profundos anaeróbicos. Durante esse transporte, ocorre a decomposição biológica do fósforo orgânico regenerando o fósforo reativo dissolvido nos estratos aeróbico e anaeróbico do sedimento. Este fósforo dissolvido regenerado passa então a estar sujeito à difusão, enterramento e adsorção em partículas de sedimento (Wang *et al.*, 2003).

O fluxo das formas de carbono orgânico, tanto da fração dissolvida (COD), como da particulada (COP), também parece estar sujeito ao efeito do biorrevolvimento promovido pelas ninfas de *Campsurus*. No entanto, diferentemente do que ocorre com as formas nitrogenadas e fosfatadas, não há um consenso tão grande na literatura. Figueiredo-Barros (2004) e Leal *et al.* (2003) não observaram diferenças significativas entre os controles e o tratamento com a presença de *Campsurus* sp. com relação aos fluxos de COD. Porém, resultados obtidos por Leal (2003) revelaram um aumento das concentrações médias tanto de COD, como um aumento das taxas de remobilização de

COP nos cores submetidos à bioturbação por ninfas de *C. violaceus*, no entanto, apenas o aumento no fluxo da fração dissolvida foi estatisticamente significativo.

Sendo assim, é bastante plausível supor que um processo semelhante de liberação de algum nutriente dissolvido para o estrato mais superficial possa ter ocorrido no presente estudo, culminando, neste caso, com um aumento da produtividade bacteriana nesta área, acarretando nos maiores valores de densidade bacteriana registrados para este estrato no tratamento com adição de ninfas de *C. violaceus*.

A ingestão de bactérias aderidas a detritos orgânicos nos locais de maior forrageamento do organismo pode ser outro fator a complementar a explicação, uma vez que esta também pode estar relacionada com a diminuição observada nos valores de densidade bacteriana nos estratos mais profundos (Figura 6, Tabelas 2 e 4). Diversos estudos têm demonstrado que a produtividade de invertebrados bentônicos pode ser largamente subsidiada pelo forrageamento sobre bactérias, e mais especificamente sobre bactérias metanotróficas, no sedimento (McCafferty, 1975; Kiyashko *et al.* 2001; Kiyashko *et al.*, 2004; Eller *et al.*, 2005; Grey & Deines, 2005; Jones & Grey, 2011; Nteziyayo, 2013; Mbaka *et al.*, 2014). Nolte (1987) descreve o hábito alimentar de *C. violaceus* como sendo detritívoro, se alimentando de bactérias e matéria orgânica aderida aos grãos de sedimento. Esta característica alimentar foi confirmada por Callisto & Esteves (1996), ao observarem que o trato digestivo destes organismos estava repleto de argila, assim como os palpos ou apêndices bucais também apresentavam coloração avermelhada típica do contato com material argiloso. Portanto, há elementos suficientes para sustentar a tese de que a ingestão de bactérias aderidas a detritos seja um fator capaz de influenciar na densidade bacteriana, em especial da porção formada pelas bactérias metanotróficas, e que o hábito de forrageio destes invertebrados aquáticos bentônicos influencie na distribuição bacteriana no perfil vertical do sedimento.

No que diz respeito à densidade de metanotróficas, verificou-se um aumento dos valores médios em todos os estratos do tratamento com organismos em relação ao controle, ainda que apenas o primeiro estrato (0-1 cm) tenha se diferenciado significativamente dos demais na comparação entre tratamentos (Figura 7, Tabela 5). A explicação mais provável é que o processo de bioirrigação promovido por *C. violaceus* tenha translocado água intersticial dos estratos mais profundos do sedimento (ricas em CH₄) para os estratos superficiais, assim como deve ter promovido um aumento da

difusão de oxigênio para estratos mais profundos do sedimento, intensificando assim a metanotrofia ao longo de todo o perfil do sedimento, o que conseqüentemente promoveu este aumento da densidade de metanotróficas.

Leal *et al.* (2005), em experimento avaliando o efeito do biorrevolvimento promovido por *C. violaceus* na difusão do oxigênio ao longo do perfil vertical do sedimento incubado do Lago Batata, observaram que a concentração de oxigênio no estrato superficial (0-0,4 mm) foi de aproximadamente 0,25 mmol l⁻¹ e o oxigênio se fez presente nos primeiros 3,5 mm. No entanto, as ninfas de *C. violaceus* podem construir longos tubos (>10 cm de comprimento), onde a concentração de oxigênio varia de 0,2 mmol l⁻¹ a 0,3 mmol l⁻¹, valores similares à concentração de oxigênio que foi medida no estrato superficial do sedimento. Leal *et al.* (2003), em estudo com a mesma espécie de macroinvertebrado, verificou que a presença destes organismos proporcionou a oxigenação do sedimento até cerca de 4 cm de profundidade através das construções das galerias, resultado este que diferiu bastante do encontrado para os tratamentos controles, onde o oxigênio alcançou somente os três primeiros milímetros da superfície do sedimento. Estes resultados indicaram a grande capacidade das ninfas de *C. violaceus* em influenciar os perfis de oxigênio dissolvido no sedimento, uma vez que estas ninfas criam um fluxo contínuo de água em seus tubos, fornecendo oxigênio para os estratos de sedimento adjacentes. Portanto, a água rica em oxigênio dos estratos superficiais é bombeada pela macrofauna para os estratos mais profundos do sedimento através do biorrevolvimento, influenciando assim na dinâmica dos processos metabólicos, uma vez que altera os sítios de oxirredução (Altmann *et al.*, 2004) e estimula a colonização destas galerias por bactérias aeróbicas (Wang *et al.*, 2001).

Leal *et al.* (2007), em experimento avaliando o efeito do biorrevolvimento promovido por *C. violaceus* sobre o fluxo de gases (CO₂ e CH₄) na interface sedimento-água, observaram um decréscimo significativo nas concentrações de CH₄ no sedimento no tratamento com *C. violaceus*, além de um aumento significativo nos fluxos de CH₄ e CO₂ do sedimento para coluna d'água no mesmo tratamento. Para os autores, a zona bioirrigada produzida pelas ninfas de *C. violaceus* estimulou a atividade microbológica, o que é comprovado pelos elevados fluxos de CO₂ do sedimento para coluna d'água, indicando que em decorrência do modo de forrageio do organismo houve um estímulo à colonização de seus tubos por bactérias aeróbicas e com isso metanotrofia foi intensificada ao longo do perfil vertical do sedimento. Gonçalves (2013), trabalhando

com o efeito do biorrevolvimento de uma espécie de *Campsurus* sobre o fluxo de CH₄, encontrou resultados bastante similares, com a redução das concentrações de CH₄ no sedimento decorrente de sua liberação para coluna d'água e aumento da metanotrofia no perfil vertical do sedimento. O referido autor ainda salienta que apesar de ter sido observado estímulo à emissão de CH₄ é importante ressaltar que os valores são próximos a zero, indicando que uma considerável fração do CH₄ foi consumido ao longo do fluxo entre as interfaces sedimento-água.

Figueiredo-Barros *et al.* (2009), em estudo avaliando o efeito do biorrevolvimento de *Heteromastus similis* (Polychaeta: Capitellidae) sobre o fluxo de CH₄, encontraram o mesmo padrão de redução das concentrações de CH₄ no sedimento, exceção feita apenas o estrato mais superficial do sedimento (0-2 cm), onde as concentrações aumentaram em relação ao tratamento controle. Segundo os autores, este aumento deve estar relacionado à um possível estímulo a metanogênese devido ao hábito desta espécie em promover a deposição de pelotas fecais na superfície, fornecendo assim substrato para colonização bacteriana e possivelmente criando uma condição anóxica neste estrato em decorrência do rápido consumo do oxigênio na interface sedimento água durante o processo de decomposição deste material.

O presente estudo, por sua vez, apresenta resultados que estão em consonância com o que foi observado pelos demais autores referenciados anteriormente, tendo em vista que estes autores fizeram estudos com macroinvertebrados de hábito escavador e observaram que estes organismos ao colonizarem o sedimento, contribuem para o aumento dos fluxos de CH₄ do sedimento para a coluna d'água, bem como estimulam o processo de oxidação do CH₄, o que se reflete na redução das concentrações de CH₄ ao longo do perfil vertical do sedimento. Sendo assim, este aumento observado na densidade de metanotróficas deve estar ligado a um possível aporte de CH₄ antes estocado no sedimento, tornando este recurso disponível para ser utilizado como substrato por estas bactérias permitindo assim o crescimento das mesmas. Mesmo sem mensurar o fluxo destes gases no presente trabalho, parece bastante aceitável inferir que, se este fosse o caso, os resultados seriam bastante similares, o que explicaria o aumento observado na densidade de bactérias metanotróficas no tratamento com *C. violaceus*.

Em relação à distribuição do percentual de bactérias metanotróficas por estrato (Figura 8, Tabelas 6 e 7), o tratamento controle exibiu um padrão esperado, uma vez

que o percentual mais elevado destas bactérias ocorreu justamente nos estratos mais superficiais (0-1 e 1-2 cm), onde há uma maior disponibilidade de oxigênio, enquanto que a menor proporção de metanotróficas se deu nos estratos mais profundos (2-4 e 4-6 cm), onde o oxigênio não está presente ou encontra-se em concentrações muito baixas. Já no tratamento com a presença de *C. violaceus*, a maior porcentagem de metanotróficas foi encontrada no estrato mais profundo do sedimento (4-6 cm), no qual o percentual de metanotróficas superou significativamente qualquer outro estrato do tratamento controle, além de superar também o estrato de 2-4 cm do próprio tratamento com adição de ninfas. A explicação para este resultado deve estar relacionada a fatores atrelados ao biorrevolvimento promovido pelo organismo, todos já abordados anteriormente, como o fato deste estrato ser seu local de maior forrageamento do organismo (Gonçalves, 2013), pelo aumento na difusão de oxigênio para os estratos mais profundos (Leal *et al.*, 2005) e pela liberação de CH₄ estocado no sedimento tornando-o disponível como substrato para estas bactérias (Leal *et al.*, 2007; Figueiredo-Barros *et al.*, 2009; Gonçalves, 2013), estimulando assim a colonização bacteriana e fomentando o seu crescimento.

4.2 EXPERIMENTO 2

A única diferença significativa na comparação entre os diferentes tratamentos na água se deu na comparação entre a abundância do gene *pmoA* de metanotróficas registrada para o tratamento controle inicial e os demais tratamentos (Figura 14, Tabelas 12 e 13). Os valores mais elevados com relação à densidade de metanotróficas na água apresentados pelo tratamento controle inicial devem estar relacionados ao tempo de exposição às condições experimentais, uma vez que as alíquotas deste tratamento foram retiradas três dias antes das alíquotas dos demais tratamentos. Neste sentido, a variação nos níveis de concentração de oxigênio do início do experimento até o momento da retirada das alíquotas após as 72 horas de incubação pode ter sido um fator importante, tendo em vista que o metabolismo destas bactérias está diretamente relacionado com a presença do oxigênio.

Ainda que os microcosmos tenham sido deixados sob constante oxigenação, tendo em vista que contavam com a inserção de agulhas conectadas a mangueiras conduzindo oxigênio diretamente das bombas de oxigenação, garantindo assim esse

aporte contínuo, foi verificado através de análise estatística que houve diferença significativa em relação à concentração de oxigênio no momento da retirada das alíquotas (Figura 15, Tabelas 14 e 15). Não coincidentemente, o tratamento controle inicial foi justamente quem apresentou os valores mais elevados desta variável, diferindo-se significativamente dos demais tratamentos. Sendo assim, a variação nos níveis de oxigênio, o qual apresentou redução significativa ao longo das 72 horas a mais de experimento em que estiveram submetidos os tratamentos controle final e tratamento com adição de *C. truncatus*, parece ter influenciado na densidade de metanotróficas.

Para entender melhor essa diminuição nos níveis de oxigênio dos tratamentos controle final e tratamento com adição de *C. truncatus* é preciso levar em consideração o tipo de sedimento da Lagoa do Vale Encantado, utilizado na montagem dos microcosmos, o qual era bastante lodoso e visivelmente rico em matéria orgânica. Isso ajuda a explicar o porquê desta depleção verificada nos níveis de oxigênio, uma vez que esta composição com alto teor de matéria orgânica poderia ter fornecido um ótimo substrato de colonização para a microbiota, aumentando assim as taxas de respiração. Soma-se a isso o fato de que a tendência era de que as taxas de consumo de oxigênio via respiração aumentassem gradativamente nos tratamentos controle final e tratamento com adição de *C. truncatus*, tendo em vista que o maior tempo de exposição ao qual foram submetidos estes tratamentos deve ter possibilitado um maior crescimento dos microrganismos. Além disso, no tratamento com adição de *C. truncatus* deve ser contabilizada ainda a respiração destes organismos, assim como a sua excreção, que, por sua vez, fornecia substrato adicional para colonização da microflora.

No entanto, talvez o peso da influência da variação nos níveis de oxigênio não tenha sido tão determinante assim, uma vez que mesmo com a redução em questão, a água dos microcosmos de todos os tratamentos continuou supersaturada em oxigênio dissolvido. É necessário considerar que a dinâmica de populações bacterianas é algo extremamente sensível e complexo, de modo que é muito provável que outros fatores não avaliados neste trabalho tenham atuado em conjunto e somente se tivéssemos acesso a tais parâmetros seria possível explicar este resultado em sua totalidade. Porém, é possível fazer inferências com base na literatura a respeito do que pode ter acontecido no tratamento com adição de *C. truncatus*, tendo em vista que, conforme apresentado em detalhes no item anterior (4.1), existe uma série de trabalhos que indicam que o

biorevolvimento promovido por este organismo gera um incremento nos fluxos de nutrientes (formas dissolvidas e particuladas de C, N e P) para a coluna d'água.

Portanto, existem evidências suficientes para sugerir que o transporte por carreamento de frações dissolvidas e particuladas de nutrientes (C, N e P) dos estratos internos do sedimento para a coluna d'água através do processo de bombeamento e/ou ventilação mecânica promovida pelas ninfas de *C. truncatus* ao forragear o sedimento pode ter favorecido outros grupos de bactérias, gerando uma competição que pode ter resultado nesta diminuição ainda mais pronunciada na densidade de metanotróficas observada para o tratamento com adição de *C. truncatus*.

Com relação aos resultados do sedimento, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa na comparação entre os diferentes tratamentos (Figuras 16 e 17, Tabelas 18 e 19), seja na comparação entre mesmos estratos ou entre estratos distintos, diferentemente do que ocorreu no Experimento 1, onde houve uma diferenciação significativa entre os tratamentos, especialmente com relação as metanotróficas, que apresentaram densidades mais elevadas em todas os estratos do tratamento com adição de *Campsurus* sp. em relação ao tratamento controle. As possíveis causas para as diferenças observadas entre os resultados dos dois experimentos serão abordadas em detalhes no próximo item (4.3).

A configuração da disposição das ninfas de *C. truncatus* ao longo do perfil vertical do sedimento ao final das 72 horas de incubação (Tabelas 23 e 24) se mostrou muito similar àquela encontrada por Gonçalves (2013), confirmando o hábito escavador destas ninfas e sua tendência em se posicionar e forragear preferencialmente os estratos mais profundos do sedimento, ocupando a curva do tubo em “U”. A principal diferença destes resultados para aqueles obtidos por Gonçalves (2013) reside no fato de que no trabalho deste autor não foram encontradas ninfas ocupando o estrato mais superficial (0-2 cm, no caso do referido trabalho), enquanto que no presente estudo foram encontrados dois organismos. Contudo, a explicação para este registro de dois organismos presentes no estrato mais superficial reside no fato de que, na verdade, tratava-se de dois indivíduos que haviam se transformado em adultos ao longo do período de incubação, de modo que estes dois indivíduos não encontravam-se mais presentes nos respectivos microcosmos no momento da partição e retirada das alíquotas de sedimento, apenas tendo deixado como vestígios as suas exúvias na superfície.

Ainda com relação aos resultados de abundância do gene *pmoA* no sedimento, chama atenção também os valores registrados para o tratamento controle final no estrato mais superficial (0-1 cm) (Figura 17). No entanto, é preciso levar em consideração que a confiabilidade deste resultado ficou prejudicada já que apenas uma das três amostras deste tratamento para este estrato foi amplificada corretamente nos ensaios de qPCR. É de se destacar ainda que este tratamento foi o único que apresentou valores nesta ordem de grandeza (10^9), o que poderia caracterizar este valor como um *outlier*. Porém, mesmo com o problema da perda de informação, do ponto de vista ecológico, este resultado não é tão aberrante assim, uma vez que a tendência natural é que as bactérias metanotróficas estejam presentes e de forma mais ativa nas zonas onde há presença tanto de metano como de oxigênio, o que normalmente ocorre na interface entre ambientes óxicos e anóxicos (Cicerone & Oremland, 1988), motivo pelo qual optou-se pela manutenção deste resultado para as análises realizadas.

O fato de terem sido registrados valores maiores para abundância de cópias do gene *pmoA* em comparação aos valores de abundância de cópias do gene *rrs* causou muita estranheza, uma vez que o conjunto de iniciadores utilizado para quantificar a comunidade bacteriana era do tipo universal para *Bacteria*, enquanto que o par utilizado para as metanotróficas era específico para o grupo, o que por si só torna este resultado inconcebível. No entanto, em biologia molecular é de certo modo recorrente deparar-se com problemas envolvendo conjuntos de iniciadores, seja porque eles apresentem algum grau de ineficiência em seu raio de detecção ou então por conta de algum nível de degeneração, o que pode acabar ocasionando leituras inespecíficas.

Um dos problemas mais recorrentemente reportados na literatura diz respeito às leituras inespecíficas envolvendo bactérias e arqueias nitrificantes em ensaios com o gene *pmoA* como marcador filogenético para metanotróficas. Tais problemas ocorrem porque os genes *pmoA*, que codifica a subunidade catalítica da forma particulada da enzima metano monooxigenase (pMMO), e *amoA*, que codifica a subunidade catalítica da enzima amônia monooxigenase (AMO), compartilham de uma alta similaridade em suas sequências. A própria enzima pMMO de metanotróficas possui muitas semelhanças com a enzima AMO, encontrada em bactérias e arqueias nitrificantes. Apesar das grandes diferenças fisiológicas entre bactérias metanotróficas e nitrificantes, as enzimas-chave destes grupos podem ser consideradas análogas, uma vez que possuem um papel crucial para o metabolismo celular de ambos os grupos de bactéria.

Holmes *et al.* (1995), em estudo com bactérias metanotróficas e nitrificantes, observaram que a forte conservação das estruturas primárias e secundárias dos genes *pmoA* e *amoA* de uma coleção diversificada de organismos sugeria que estes genes compartilham de uma ancestralidade comum. Além disso, os autores apontam ainda para outra evidência ainda mais convincente, que são as correlações de agrupamentos de identidade de sequências de *pmoA* e *amoA* com as afiliações filogenéticas destes organismos. Sendo assim, esses genes podem ser considerados homólogos evolutivamente, apesar dos seus papéis distintos em metanotróficas e nitrificantes.

Com relação às arqueias amônia-oxidantes, apesar do fato destes organismos pertencerem a um Domínio diferente, descobriu-se que eles também possuem genes relacionados àqueles que codificam a enzima amônia monooxigenase, e, dessa forma, é provável que a fisiologia da oxidação de amônia apresentada por bactérias e arqueias seja similar, uma vez que exploram enzimas homólogas para catalisar este processo (Pester *et al.*, 2012). Contudo, uma grande diferença reside no fato de que ao contrário das bactérias amônia-oxidantes, as arqueias que oxidam amônia podem fazer isso em níveis de mistura extremamente baixos, como os encontrados nos oceanos abertos. Nesse contexto, é possível que as arqueias nitrificantes que habitam solos em vez de oceanos podem ser os principais oxidantes de amônia em ambientes terrestres (Madigan, 2016). De fato, diversos estudos tem demonstrado que as arqueias nitrificantes dominam a oxidação de amônia no solo quando há baixa disponibilidade de nitrogênio ($< 15 \mu\text{g N-NH}_4^+$ por g peso seco de solo), enquanto que as bactérias nitrificantes tornam-se mais competitivas quando há maiores quantidades de nitrogênio (Erguder *et al.*, 2009; Jia & Conrad, 2009; Di *et al.*, 2010; Gubry-Rangin *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Pratscher *et al.*, 2011; Verhamme *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011).

Há ainda outro fator a ser levado em consideração, que é o fato de que muitas metanotróficas possuem múltiplas cópias do *pmo operon* (conjunto de genes que codificam pMMO) que inicialmente pensava-se se tratar de cópias do gene *pmoA* praticamente idênticas entre si, o que não afetaria os estudos de diversidade baseados na detecção deste gene como marcador filogenético para metanotróficas (Auman *et al.*, 2000; Gilbert *et al.*, 2000). No entanto, estudos posteriores identificaram cepas de metanotróficas que comprovadamente possuíam ao menos dois genes *pmoA* distintos, o gene convencional e uma segunda cópia, referida como *pmoA2*. Esta segunda cópia aparentemente permite que seus portadores possam crescer e oxidar metano em

ambientes com menores níveis de mistura de metano em relação ao que a enzima metano monooxigenase convencional permite.

Portanto, deve ser levado em consideração que cópias parálogas do gene *pmoA* e cópias de genes que codificam mono-oxigenases relacionadas evolutivamente presentes em organismos que não são metanotróficas são por vezes detectados em estudos independentes de cultivo, dependendo do conjunto de iniciadores utilizado para amplificar o gene alvo. Tais detecções podem assim contribuir para a diversidade de tipos de sequências detectadas em um estudo ambiental, mas não representam e nem devem ser contabilizados como metanotróficas distintas (Knief, 2015). No caso do presente estudo, como este não é um estudo de diversidade, ressalta-se o fato de que estes resultados devem ser interpretados apenas à luz da ecologia, de modo que os dados obtidos nesta pesquisa se configuram única e exclusivamente como parâmetros para avaliar o efeito do modo de forrageio do organismo alvo de estudo (*C. truncatus*) sobre a dinâmica da comunidade bacteriana na interface sedimento-água.

Contudo, a despeito da suspeita com relação aos dados de abundância de cópias do gene *pmoA*, foram tomadas medidas de precaução para evitar esse tipo de problema, tendo em vista que de antemão já se tinha a informação de que o par A189f e A682r (Holmes *et al.*, 1995) resultava na produção de produtos inespecíficos de PCR, uma vez que esta combinação amplificava também o gene *amoA* precursor da enzima amônia monooxigenase presente em bactérias e arqueias amônia-oxidantes. Por este motivo, optou-se por realizar os ensaios de qPCR utilizando o par de iniciadores A189f e mb661r (Costello & Lidstrom, 1999). Bourne *et al.* (2001), em estudo promovendo a comparação entre os conjuntos de iniciadores para o gene *pmoA*, verificaram que esta segunda combinação foi a que demonstrou a melhor amplitude de detecção da diversidade do gene *pmoA* dentre todos os conjuntos testados, que incluíam também o par A189/A682, dentre outros. Além deste resultado, o fato deste par não amplificar o gene *amoA*, evitando assim a produção de produtos de PCR inespecíficos adicionais, fez com que os referidos autores considerassem este conjunto de iniciadores como o mais indicado para investigar a diversidade de metanotróficas em estudos ambientais, uma vez que reflete de maneira mais realística a diversidade de metanotróficas do tipo I e II dentre todos os conjuntos de iniciadores disponíveis para o gene *pmoA*. Além disso, outro fator que argumenta a favor dos ensaios de qPCR utilizando o gene *pmoA* como

marcador para metanotróficas é o fato de que o Experimento 1 apresentou valores em ordem de grandeza similar ($\sim 10^8$) em relação à densidade de metanotróficas.

Portanto, devido às evidências apresentadas, a suspeita maior recai sobre um possível problema de ineficiência na leitura efetuada nos ensaios utilizando o conjunto de iniciadores 357F e 529R (Muyzer *et al.*, 1993). Na literatura, no entanto, não foram encontrados trabalhos que tenham reportado qualquer tipo de mau funcionamento deste par de iniciadores. Apenas Soriano *et al.*, 2015, em trabalho utilizando o mesmo *primer set*, verificou que as contagens bacterianas via qPCR foram inferiores aquelas obtidas pelo método de contagem de células viáveis. Porém, ainda que essa informação possa ser encarada como um indício de ineficiência do par de iniciadores, é possível também que as razões por trás das diferenças nos valores sejam de origem puramente metodológicas. Além do mais, como os autores não discutiram essa questão seria precipitado tomar qualquer tipo de conclusão. No entanto, seja como for, os ensaios de qPCR realizados no presente trabalho utilizando o gene *rrs* como marcador para bactérias em geral servem como um parâmetro, ainda que apenas parcialmente realístico, para se avaliar o efeito do biorrevolvimento promovidos pelas ninfas de *C. truncatus* sobre a comunidade bacteriana e por este motivo foram mantidos e analisados em contraposição aos resultados obtidos nos ensaios com o conjunto de iniciadores utilizado para detecção e quantificação de bactérias metanotróficas.

4.3 DISCUSSÃO GERAL

Esta seção irá dar maior ênfase nas diferenças nos resultados, procurando abordar os principais motivos pelos quais obtiveram-se resultados distintos em ambas as abordagens experimentais, sejam eles de origem estritamente metodológica ou ecológica. Além das diferenças entre os resultados dos experimentos realizados no presente estudo, esta seção irá abordar também as diferenças verificadas com relação aos resultados observados por outros autores.

De imediato, torna-se prudente salientar aqui que não existem evidências para suspeitar que as diferenças nos resultados obtidos para ambos os experimentos da presente pesquisa estejam relacionadas ao fato de terem sido utilizadas duas espécies distintas do mesmo gênero (*C. violaceus* e *C. truncatus*). Pelo contrário, a literatura

aponta para uma série de semelhanças entre os hábitos ecológicos de ambas as espécies, basta para isso analisar a similaridade de resultados obtidos em trabalhos de escopo parecido utilizando uma ou outra espécie. Zilli (2012), em estudo com a espécie *C. violaceus* em lagos da planície de inundação do Rio Paraná (Argentina), salienta que os seus resultados obtidos para produção secundária, tempo de geração, taxa de produção de biomassa, além de outros traços de ciclo de vida, foram muito similares àqueles obtidos para outras espécies do mesmo gênero na região neotropical (Irmiler, 1975; Pereira & Da Silva, 1991; Melo *et al.*, 1993; Takeda & Gryzbkowska 1997; Leal & Esteves, 2000). Feito este esclarecimento, o próximo passo será discutir os fatores que poderiam ter ocasionado as diferenças observadas entre os experimentos realizados nesta pesquisa.

No Experimento 1 foram observados valores superiores de densidade de metanotróficas em todos os estratos do tratamento com adição das ninfas de *Campsurus* sp. em relação ao tratamento controle (Figura 7), algo que não se repetiu no Experimento 2 (Figura 17), onde apenas o último estrato apresentou, ainda que discretamente, valores médios de abundância de cópias do gene *pmoA* superiores em relação aos demais tratamentos, e, ainda assim, tais diferenças não foram significativas do ponto de vista estatístico (Figura 17, Tabela 19). Uma das possíveis explicações para a não repetição do padrão apresentado pelo Experimento 1 reside na diferença nas densidades de ninfas de *Campsurus* sp. por core empregada em ambos os experimentos, tendo em vista que no primeiro experimento a incubação foi realizada utilizando-se 5 indivíduos por microcosmo, enquanto que para o segundo experimento foram utilizados 8 indivíduos. O maior adensamento de indivíduos pode ter acarretado em efeitos que ajudam a explicar as diferenças encontradas na comparação entre os resultados de ambos os experimentos. Um destes efeitos, e possivelmente o mais determinante, diz respeito a um provável aumento nas taxas de ingestão de metanotróficas por esses organismos. Tendo em vista que as ninfas desta espécie apresentam hábitos de detritivoria (Nolte, 1987; Callisto & Esteves, 1996; Leal & Esteves, 2000), é bastante plausível sustentar a proposição de que ao forragear o sedimento, as ninfas de *Campsurus* sp. estariam se alimentando também de bactérias aderidas a esses detritos.

A alimentação de macroinvertebrados bentônicos sobre bactérias metano-oxidantes é um fato bem consolidado na literatura, tendo em vista que diversos trabalhos relatam este hábito de forrageamento da fauna bentônica sobre este grupo de

bactérias, especialmente com relação às larvas de *Chironominae*, que apresentam o mesmo comportamento alimentar das ninfas de *Campsurus*, alimentando-se de detritos. Estas larvas são conhecidas pelo seu intenso forrageamento sobre bactérias metanotróficas, que pode ocorrer até mesmo de forma preferencial, fazendo com que o carbono biogênico deste grupo de bactérias tenha muita relevância na dieta destes organismos e na contribuição para a biomassa dos mesmos (representando até cerca de 60 % do carbono assimilado como biomassa) (McCafferty, 1975; Kiyashko *et al.*, 2001; Kiyashko *et al.*, 2004; Eller *et al.*, 2005; Grey & Deines, 2005; Deines *et al.*, 2007; Molineri & Emmerich, 2010; Jones & Grey, 2011; Mbaka *et al.*, 2014).

Nteziryayo (2013), em estudo analisando via isótopos estáveis a teia alimentar de um lago da planície de inundação do Pantanal sul-mato-grossense, sugeriu que as bactérias metano-oxidantes representam uma fonte de carbono para os insetos aquáticos bentônicos, incluindo tanto as larvas de *Chironominae* como as ninfas de *Campsurus*, que inclusive foram agrupadas no mesmo clado trófico pelo referido autor com base em suas assinaturas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$. O autor acredita que a ingestão de bactérias metanotróficas por esse grupo de organismos forneça uma explicação plausível para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ estimados para esses insetos, uma vez que organismos que consomem bactérias metano-oxidantes geralmente apresentam baixos valores de $\delta^{13}\text{C}$ (tipicamente na ordem de -40 ‰ segundo Mbaka *et al.*, 2014), sendo que as ninfas de *Campsurus* apresentaram taxas de $\delta^{13}\text{C}$ de -39.7‰ no estudo em questão. Sendo assim, existem elementos suficientes para sustentar a ideia de que a ingestão de bactérias metanotróficas tenha sido um fator determinante para os menores valores de densidade bacteriana encontrados no segundo experimento, efeito esse que acabou sendo potencializado pelo maior adensamento de organismos nos microcosmos em comparação com o primeiro experimento.

Porém, há ainda outro fator, também relacionado indiretamente a questão do maior adensamento dos organismos, que pode ter contribuído para esta não verificação de aumento nas densidades de metanotróficas ao longo de todo o perfil vertical do sedimento, que é a questão da inibição da metanotrofia mediante a determinadas concentrações de íon amônio, nitrito e elevadas concentrações (> 10 mM) de nitrato⁻ (Dunfield & Knowles, 1995). É possível que a alta densidade de organismos dentro dos microcosmos tenha produzido um ambiente com altas concentrações destes compostos, seja devido a um estímulo a remineralização da matéria orgânica em decorrência da

atividade de biorrevolvimento promovido pelas ninfas, ou pela própria excreção intrínseca ao metabolismo desses organismos. Aliado a esses fatores, contribui também para esta hipótese de um ambiente supersaturado em formas nitrogenadas a questão da natureza extremamente orgânica do sedimento da lagoa onde foi realizada a coleta. Portanto, há razões suficientes para sustentar a hipótese que teria havido uma inibição da oxidação de metano em decorrência da alta disponibilidade destes inibidores, o que teria influenciado diretamente sobre as taxas de crescimento deste grupo de bactérias, acarretando nesta não verificação de aumento nas densidades de metanotróficas.

Outro resultado que destoou bastante, mas desta vez com relação ao que já havia sido descrito na literatura, foram os resultados referentes às densidades bacterianas na água (Figura 13, Tabela 11), uma vez que já havia sido reportado que o processo de biorrevolvimento promovido por ninfas do gênero *Campsurus* influenciava diretamente sobre a produtividade bacteriana. Leal (2003), trabalhando com a espécie *C. violaceus*, verificou um aumento significativo da produção bacteriana nos cores submetidos à bioturbação em relação à produção inicial e aos cores do tratamento controle. Neste estudo em questão, a produção bacteriana foi avaliada no início (antes do período de incubação), e após 6, 12 e 24 horas de incubação. Verificou-se um aumento das taxas de produção bacteriana ao longo do período de incubação até o período de 12 horas, sendo registrada uma ligeira queda após 24 horas de incubação, ainda que essas mudanças ao longo do tempo não tenham sido estatisticamente significativas. De modo semelhante, Leal *et al.* (2007), em estudo com a mesma espécie do trabalho anterior, verificaram que após duas e três horas de incubação houve um aumento significativo na produção bacteriana registrada para os cores com a presença das ninfas de *C. violaceus*, enquanto que o tratamento controle não registrou mudanças significativas ao longo do tempo. Ambos os trabalhos citados avaliaram a produção bacteriana pela incorporação de ³H-leucina, segundo a metodologia proposta por Smith & Azam (1992). Com base nisto, era esperado que se registrasse para o presente estudo maiores densidades bacterianas para o tratamento com adição de *C. truncatus* em relação aos tratamentos controles, algo que, no entanto, não foi verificado.

Este aumento nas taxas de produção bacteriana verificados pelos referidos autores deve estar correlacionado ao incremento nas taxas de remobilização de nutrientes (frações dissolvidas e particuladas de C, N e P) promovida pela atividade de bioturbação, tornando estes elementos disponíveis para a comunidade microbiana na

água sobrejacente. Prova disso é que Leal (2003) demonstrou que o aumento significativo dos fluxos de NH_4^+ e de COD nos cores sujeitos a bioturbação apresentava elevadas correlações com a produção bacteriana, revelando a influência direta na disponibilidade destes elementos (C e N) sobre o crescimento bacteriano.

Sendo assim, é notório que a ausência de diferenciação significativa entre os diferentes tratamentos do presente estudo com relação às abundâncias de cópias do gene *rrs* na coluna d'água (Figura 13, Tabela 11) contrasta com os resultados obtidos por outros trabalhos, os quais verificaram um aumento da produção bacteriana associado à atividade bioturbadora promovida por ninfas do gênero *Campsurus*. No entanto, é preciso atentar para a questão da diferença nos tempos de incubação empregados nos diferentes trabalhos, tendo em vista que o segundo experimento do presente estudo promoveu um período incubatório de 72 horas, enquanto que o trabalho de Leal (2003) fez medidas na escala de 24 horas e Leal *et al.* (2007) determinaram as taxas de produção bacteriana em uma escala de apenas três horas. Interessante observar o decréscimo relatado por Leal (2003) nas taxas de produção bacteriana entre as marcas de 12 horas e 24 horas, isto fornece um indício de que talvez o tempo de incubação tenha sido um fator determinante para a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos com relação à densidade bacteriana verificadas neste trabalho. É possível que após um período inicial onde supostamente teria havido um grande estímulo a produtividade bacteriana decorrente da atividade de bioturbação promovida pelas ninfas, atingiu-se um momento de estabilização deste crescimento, seguido então por um período de redução (entre 12 e 24 horas), que devido ao longo tempo de incubação empregado (72 horas) teria sido o suficiente para explicar a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

Porém, é importante ressaltar também que, no presente estudo, foi registrada para o tratamento com a presença de *C. truncatus* o maior valor de cópias do gene *rrs* em uma única amostra. No entanto, o valor em questão foi tão discrepante que ele foi tido como um *outlier* e excluído da análise estatística. Por mais que, como argumentado anteriormente, faça sentido do ponto de vista ecológico haver valores mais elevados de densidade bacteriana neste tratamento, não seria correto aproveitar um resultado tão aberrante, uma vez que o referido valor registrado está na ordem de grandeza de 10^9 enquanto os demais valores de todos os tratamentos ficaram entre 10^5 e 10^4 . Neste caso, o que deve ter ocorrido é que o microcosmo de onde foi retirada a alíquota de água

deveria estar com a água extremamente turva em decorrência da ressuspensão de material particulado sedimentar promovendo assim um considerável aumento da densidade bacteriana, já que este material particulado ressuspendido poderia estar carreando consigo um elevado número de bactérias aderidas. Esta ressuspensão do material sedimentar, no entanto, poderia ser uma consequência natural do processo de biorrevolvimento, o que fica evidenciado pelo aumento da turbidez na água de todos os cores que compuseram o tratamento com adição de *C. truncatus*, mas também pode ter sido fruto de um descuido no momento da retirada da alíquota, onde a seringa pode ter encostado no sedimento e conseqüentemente ressuspendido e coletado este material. Seja como for, optou-se pela exclusão deste valor exorbitantemente alto a fim de não comprometer a análise estatística e gerar informação equivocada.

Seguindo uma linha de raciocínio similar, havia também a expectativa por um aumento na abundância de cópias do gene *pmoA* (marcador para metanotróficas) na água no tratamento com adição de ninfas de *C. truncatus*, algo que, no entanto, não se concretizou (Figura 14, Tabelas 12 e 13). Essa expectativa não confirmada por um possível aumento na densidade de metanotróficas se justifica pelos trabalhos que demonstraram que o biorrevolvimento promovido por ninfas do gênero *Campsurus* aumenta os fluxos de CH₄ para a coluna d'água. Por exemplo, estudos realizados por Leal *et al.* (2007) e Gonçalves (2013), ambos trabalhando com ninfas do gênero *Campsurus*, verificaram um aumento significativo nas taxas de emissão de CH₄ para a água sobrejacente no tratamento sujeito a bioturbação em relação ao tratamento controle e, no caso do segundo autor, valores superiores de liberação de CH₄ também na comparação com tratamentos com outros macroinvertebrados.

No caso do estudo realizado por Gonçalves (2013), foi avaliada também a emissão de CH₄ para o compartimento atmosférico, e os resultados indicaram que o tratamento com adição das ninfas de *Campsurus* sp. mesmo apresentando a maior concentração de CH₄ na coluna d'água, apresentava os menores valores na atmosfera. Este resultado indicaria, conforme discorre o autor, que *Campsurus* sp., por criar um fluxo intenso de água a partir do bombeamento físico, desloca uma elevada quantidade de CH₄ do sedimento para a coluna d'água além de grande quantidade de partículas de sedimento, podendo esse processo físico sobrepor outros fatores como a ingestão de bactérias metanotróficas e a produção e liberação de CH₄ via decomposição anaeróbica no intestino desta espécie. Desta forma, o CH₄ seria liberado por fluxo difusivo na

coluna d'água e, neste compartimento, seria consumido pela ação das metanotróficas, podendo este consumo ainda ser agravado pelo aumento da quantidade de metanotróficas liberadas na água aderidas às partículas de sedimento.

No entanto, é preciso salientar que, conforme relatado por Gonçalves (2013), apesar de ter sido observado um estímulo à emissão de CH_4 nos tratamentos sujeitos a bioturbação, é importante ressaltar que os valores de liberação deste gás para a coluna d'água sobrejacente são muito baixos (valores próximos à zero), indicando que uma considerável fração do CH_4 é consumida ao longo do fluxo difusivo entre as interfaces sedimento-água. Sendo assim, não fica claro se talvez este efeito do biorrevolvimento promovido pelas ninfas do gênero *Campsurus* seja mesmo suficiente para gerar um aumento significativo na densidade de metanotróficas ou então este aumento até ocorre, mas ele não foi verificado devido novamente à questão da escala de tempo em que as alíquotas foram retiradas. É possível supor, da mesma forma com que foi conduzido o raciocínio com relação à densidade bacteriana, que também teria ocorrido um período inicial de estímulo a metanotrofia na coluna d'água como reflexo da liberação de CH_4 proveniente do sedimento, gerando assim um aumento na densidade de metanotróficas, que seria seguido por um momento de estabilização e posteriormente de queda devido a possíveis efeitos competitivos com outros grupos de bactéria que viriam a se beneficiar do intenso fluxo de nutrientes para a coluna d'água promovido pelo biorrevolvimento.

Contudo, existe ainda outro fator aparentemente ainda mais preponderante para esta não verificação de aumento na densidade de metanotróficas na água, que é novamente a questão do efeito inibitório que determinados compostos nitrogenados (amônia, íon amônio, nitrito e nitrato) exercem sobre o processo de oxidação do metano promovido pelas bactérias metanotróficas. Isto ocorre devido à plasticidade catalítica da enzima metano monooxigenase (MMO) presente nas metanotróficas, que é capaz de oxidar uma variedade de outros substratos além do metano gerando assim uma competição destes compostos pelo sítio ativo da enzima. Dentre estes substratos alternativos estão tanto a amônia (NH_3), como o íon amônio (NH_4^+), que geram nitrito (NO_2^-) como produto final da reação (Bédard & Knowles, 1989).

Além de uma variedade de estudos publicados ter demonstrado que NH_3 atua como um competidor inibitivo da oxidação de CH_4 (O'Neill & Wilkinson, 1977; Carlsen *et al.*, 1991; Dunfield & Knowles, 1995), padrões de inibição mais complexos do que a

simples competição enzimática entre CH_4 e NH_3 são ocasionalmente evidentes quando se trata da inibição da oxidação de metano realizada por bactérias metanotróficas. Curiosamente, e ao mesmo tempo muito relevante para os propósitos desta discussão, é o fato de que a própria adição de CH_4 pode estimular, ao invés de inibir, a oxidação de NH_3 por bactérias metanotróficas (Knowles & Topp, 1988; Megraw & Knowles, 1989; King & Schnell, 1994). Sendo assim, dados os elementos fornecidos, o cenário deste não aumento das densidades de metanotróficas na água registrado para o tratamento com adição de ninfas de *C. truncatus* começa a fazer mais sentido, tendo em vista que os efeitos presumivelmente esperados do biorrevolvimento promovido por estes organismos envolvem tanto o aumento nas taxas de liberação de amônia do sedimento, bem como dos fluxos de CH_4 para a coluna d'água sobrejacente. Soma-se a estes fatores a questão da natureza orgânica (possivelmente rica em formas nitrogenadas) do sedimento em questão e o efeito da excreção inerente ao próprio metabolismo e fisiologia do organismo, que proporcionou um incremento adicional na concentração de amônia, fator este que acabou sendo ainda potencializado pelo maior adensamento de organismos em cada microcosmo. Portanto, com base em tudo que foi relatado na literatura, existem evidências suficientes para supor que este resultado tenha sido um reflexo tanto de um mecanismo simples de competição enzimática inibitória, uma vez que havia a disponibilidade tanto de CH_4 como de NH_3 , mas também de um efeito inibitório em cascata mais complexo, envolvendo o estímulo à oxidação de NH_3 por metanotróficas em decorrência do aporte de CH_4 e consequente inibição da metanotrofia associada à liberação de NO_2^- , produto da oxidação de NH_3 .

V. CONCLUSÕES

De modo geral, os resultados do EXPERIMENTO 1 indicaram que o biorrevolvimento promovido pelas ninfas de *Campsurus* sp. foi capaz de alterar a densidade e distribuição vertical da comunidade bacteriana ao longo do perfil vertical do sedimento. Esta resposta, porém, diferiu entre a totalidade e a fração da comunidade bacteriana formada pelas metanotróficas, corroborando assim com a hipótese apresentada no presente trabalho.

Estes resultados evidenciam que o modo de forrageio do sedimento promovido por ninfas de *Campsurus* sp. pode estimular processos aeróbicos de mineralização da matéria orgânica, o que fica evidenciado pelo aumento na densidade de metanotróficas no tratamento com a presença destes organismos.

Os resultados do EXPERIMENTO 2, no entanto, não corroboraram com a hipótese em questão. No entanto, existem fortes indícios para sustentar a ideia de que a maior densidade de ninfas por microcosmo pode ter sido determinante para as diferenças nas respostas entre ambos os experimentos.

É possível que o maior adensamento de organismos, aliado a natureza orgânica do sedimento, possa ter causado efeitos como a intensificação da ingestão de metanotróficas, bem como a liberação de compostos nitrogenados que ativaram mecanismos de inibição da metanotrofia, de modo que estes fatores acabaram por limitar o crescimento deste grupo de bactérias.

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em vista que há uma discordância entre os resultados obtidos nos EXPERIMENTOS 1 e 2, seria interessante a realização de estudos que analisassem a influência dos fatores os quais suspeita-se terem sido determinantes para a ocorrência de tais diferenças. Neste sentido, um estudo analisando o efeito do biorrevolvimento promovido por ninfas de *Campsurus* sp. sobre a densidade de bactérias metanotróficas em sedimentos com diferentes composições orgânicas (com riqueza de formas nitrogenadas distintas), promovendo assim um gradiente destas condições, poderia elucidar a questão da influência da natureza do sedimento em relação a resposta deste grupo de bactérias frente a atividade de bioturbação. De modo similar, outro fator que poderia ser analisado é a questão do efeito da densidade de ninfas de *Campsurus* sp. sobre a resposta das bactérias metanotróficas frente ao biorrevolvimento, realizando-se, portanto, um experimento denso-dependente em uma oportunidade futura.

Trabalhos que tenham por objetivo responder sobre a questão da influência destes fatores citados anteriormente, caso venham a ser realizados, ajudariam a solucionar as dúvidas geradas por este trabalho em torno da temática apresentada. Anteriormente a este trabalho, as evidências apontavam na direção de um aumento na densidade de metanotróficas condicionado a atividade de bioturbação promovida por ninfas de *Campsurus* sp., algo corroborado pelos resultados do primeiro experimento. No entanto, os resultados obtidos pelo segundo experimento deste trabalho geram perguntas que provocam uma incerteza em relação à confiabilidade deste padrão de resposta. Sendo assim, somente ao preencher as lacunas deixadas no presente estudo, seria possível haver novamente um consenso no que diz respeito à resposta da comunidade bacteriana, em especial das bactérias metanotróficas, frente à atividade de bioturbação promovida por *Campsurus* sp.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altmann, D., Stief, P., Amann, R., & de Beer, D. (2004). Nitrification in freshwater sediments as influenced by insect larvae: quantification by microsensors and fluorescence in situ hybridization. *Microbial ecology*, 48(2), 145-153.
- Amann, R. I., Krumholz, L., & Stahl, D. A. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of bacteriology*, 172(2), 762-770.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.
- Amann, R., & Ludwig, W. (2000). Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 555-565.
- Amann, R., Fuchs, B. M., & Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 231-236.
- Ambühl, H., & Bühner, H. (1975). Zur Technik der Entnahme ungestörter Grossproben von Seesediment: ein verbessertes Bohrlot. *Aquatic Sciences-Research Across Boundaries*, 37(1), 175-186.
- Auman, A. J., Stolyar, S., Costello, A. M., & Lidstrom, M. E. (2000). Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5259-5266.
- Bastviken, D., Cole, J., Pace, M., & Tranvik, L. (2004). Methane emissions from lakes: Dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate. *Global biogeochemical cycles*, 18(4).
- Beal, E. J., House, C. H., & Orphan, V. J. (2009). Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. *Science*, 325(5937), 184-187.

- Bédard, C., & Knowles, R. (1989). Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiological reviews*, 53(1), 68-84.
- Bertics, V. J., & Ziebis, W. (2009). Biodiversity of benthic microbial communities in bioturbated coastal sediments is controlled by geochemical microniches. *The ISME journal*, 3(11), 1269.
- Boetius, A., Ravenschlag, K., Schubert, C. J., & Rickert, D. (2000). A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 407(6804), 623.
- Bosse, U., Frenzel, P., & Conrad, R. (1993). Inhibition of methane oxidation by ammonium in the surface layer of a littoral sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 13(2), 123-134.
- Bourne, D. G., McDonald, I. R., & Murrell, J. C. (2001). Comparison of pmoA PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3802-3809.
- Bowman, J. (2006). The methanotrophs - the families Methylococcaceae and Methylocystaceae. In *The prokaryotes*. Springer New York. 266-289pp.
- Bozelli, R. L. (2000). *Lago Batata: impacto e recuperação de um ecossistema amazônico*. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Eds. IB-UFRJ/SBL, 342p.
- Caliman, A. (2005). *Biodiversidade de Macroinvertebrados Bentônicos e Funcionamento de Ecossistemas Aquáticos: Uma Abordagem Experimental*. Dissertação-Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro-RJ. 96p.
- Caliman, A., Leal, J. J., Esteves, F. A., Carneiro, L. S., Bozelli, R. L., & Farjalla, V. F. (2007). Functional bioturbator diversity enhances benthic–pelagic processes and properties in experimental microcosms. *Journal of the North American Benthological Society*, 26(3), 450-459.
- Caliman, A., Carneiro, L. S., Leal, J. J. F., Farjalla, V. F., Bozelli, R. L., & Esteves, F. A. (2013). Biodiversity effects of benthic ecosystem engineers on the spatial patterns of

sediment CH₄ concentration in an urban Neotropical coastal lagoon. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 25(3), 302.

Callisto, M., & Esteves, F. A. (1996). Macroinvertebrados bentônicos em dois lagos amazônicos: lago Batata (um ecossistema impactado por rejeito de bauxita) e lago Mussurá (Brasil). *Acta Limnologica Brasiliensia*, 8, 137-147.

Campos, T. R. M., Da-Silva, E. R., Baffa, A. F., Coelho, L. B. N., & Ferreira, P. S. F. (2016). Flutuação populacional de *Campsurus truncatus* Ulmer, 1920 (Ephemeroptera: Polymitarcyidae) na Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais. *III Simpósio de Entomologia do Rio de Janeiro*, 77.

Carlsen, H. N., Joergensen, L., & Degn, H. (1991). Inhibition by ammonia of methane utilization in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(1), 124-127.

Carmouse, G. P. (1994). *Metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análise química*. São Paulo: Editora Edgard Brucher, Fapesp.

Chanton, J. P. & Dacey, J. W. H. (1991). Effects of vegetation on methane flux, reservoirs, and atmosphere carbon isotopic composition. In: Sharkey, T., Holland, E. & Mooney, H. *Trace gas emissions from plants*, 65-92.

Chanton, J. P., & Whiting, G. J. (1995). Trace gas exchange in freshwater and coastal marine environments: ebullition and transport by plants. *Biogenic trace gases: measuring emissions from soil and water*, 98-125.

Chowdhury, T. R., & Dick, R. P. (2013). Ecology of aerobic methanotrophs in controlling methane fluxes from wetlands. *Applied Soil Ecology*, 65, 8-22.

Cicerone, R. J., & Oremland, R. S. (1988). Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global biogeochemical cycles*, 2(4), 299-327.

Conrad, R., & Rothfuss, F. (1991). Methane oxidation in the soil surface layer of a flooded rice field and the effect of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 12(1), 28-32.

- Conrad, R. (1996). Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological reviews*, 60(4), 609-640.
- Conrad, R. (2007). Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. *Advances in agronomy*, 96, 1-63.
- Conrad, R. (2009). The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports*, 1(5), 285-292.
- Costello, A. M., & Lidstrom, M. E. (1999). Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 5066-5074.
- Costello, A. M., Auman, A. J., Macalady, J. L., Scow, K. M., & Lidstrom, M. E. (2002). Estimation of methanotroph abundance in a freshwater lake sediment. *Environmental Microbiology*, 4(8), 443-450.
- Dalton, H. (1977). Ammonia oxidation by the methane oxidising bacterium *Methylococcus capsulatus* strain Bath. *Archives of Microbiology*, 114(3), 273-279.
- Dedysh, S. N., Liesack, W., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Semrau, J. D., *et al.* (2000). *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 955-969.
- Dedysh, S. N., Berestovskaya, Y. Y., Vasylieva, L. V., Belova, S. E., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., *et al.* (2004). *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), 151-156.
- Dedysh, S. N., Knief, C., & Dunfield, P. F. (2005). *Methylocella* species are facultatively methanotrophic. *Journal of Bacteriology*, 187(13), 4665-4670.
- Deines, P., Bodelier, P. L., & Eller, G. (2007). Methane-derived carbon flows through methane-oxidizing bacteria to higher trophic levels in aquatic systems. *Environmental Microbiology*, 9(5), 1126-1134.

- Deutzmann, J. S., & Schink, B. (2011). Anaerobic oxidation of methane in sediments of Lake Constance, an oligotrophic freshwater lake. *Applied and environmental microbiology*, 77(13), 4429-4436.
- Deutzmann, J. S., Stief, P., Brandes, J., & Schink, B. (2014). Anaerobic methane oxidation coupled to denitrification is the dominant methane sink in a deep lake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(51), 18273-18278.
- Di, H. J., Cameron, K. C., Shen, J. P., Winefield, C. S., O'Callaghan, M., Bowatte, S., & He, J. Z. (2010). Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions. *FEMS microbiology ecology*, 72(3), 386-394.
- Domínguez, E. (2006). Ephemeroptera de América del sur (Vol. 2). *Pensoft Publishers*.
- Dunfield, P., & Knowles, R. (1995). Kinetics of inhibition of methane oxidation by nitrate, nitrite, and ammonium in a humisol. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 3129-3135.
- Dunfield, P. F., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., & Dedysh, S. N. (2003). *Methylocella silvestris* sp. nov., a novel methanotroph isolated from an acidic forest cambisol. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1231-1239.
- Dunfield, P. F., Yuryev, A., Senin, P., Smirnova, A. V., Stott, M. B., Hou, S., ... & Wang, J. (2007). Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. *Nature*, 450(7171), 879.
- Eller, G., Deines, P., Grey, J., Richnow, H. H., & Krüger, M. (2005). Methane cycling in lake sediments and its influence on chironomid larval $\delta^{13}\text{C}$. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(3), 339-350.
- Eller, G., Känel, L., & Krüger, M. (2005). Cooccurrence of aerobic and anaerobic methane oxidation in the water column of Lake Plußsee. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8925-8928.
- Epstein, S. S., & Rossel, J. (1995). Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 117(1), 289-298.

Erguder, T. H., Boon, N., Wittebolle, L., Marzorati, M., & Verstraete, W. (2009). Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS microbiology reviews*, 33(5), 855-869.

Ettwig, K. F., Butler, M. K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M. M., ... & Gloerich, J. (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 464(7288), 543.

Fey, A., & Conrad, R. (2000). Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 4790-4797.

Figueiredo-Barros, M. P. (2004). *Bioturbação na interface sedimento-água por três espécies de macroinvertebrados bentônicos com ênfase na ciclagem de nutrientes*. Instituto Carlos Chagas Filho (Biofísica), Rio de Janeiro, RJ, UFRJ, 71p.

Figueiredo-Barros, M. P., Savassi, F., Pires, A. P. F., Dantas, M., Leal, J. J. F., Esteves, F. A., & Bozelli, R. L. (2007). Efeito da bioturbação por *Campsurus notatus* (Ephemeroptera: Polymitarcidae) sobre a concentração de sólidos totais em suspensão e nitrogênio do séston.

Figueiredo-Barros, M. P., Caliman, A., Leal, J. J., Bozelli, R. L., Farjalla, V. F., & Esteves, F. A. (2009). Benthic bioturbator enhances CH₄ fluxes among aquatic compartments and atmosphere in experimental microcosms. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 66(10), 1649-1657.

Felix, R. W. Fluxos de Metano e Dióxido de Carbono Em Lagoas Costeiras Húmicas: Uma Abordagem Espaço-Temporal. (2014). Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé (NUPEM), Programa de Pósgraduação em Ciências Ambientais e Conservação (PPGCiAC).

Fenchel, T., Blackburn, T. H., & King, G. M. (2012). Bacterial biogeochemistry: the ecophysiology of mineral cycling. Academic Press.

Frenzel, P. (2000). Plant-associated methane oxidation in rice fields and wetlands. In *Advances in microbial ecology* (pp. 85-114). Springer US.

- Giangrande, A., Montresor, M., Cavallo, A., & Licciano, M. (2002). Influence of *Naineris laevigata* (Polychaeta: Orbiniidae) on vertical grain size distribution, and dinoflagellate resting stages in the sediment. *Journal of Sea Research*, 47(2), 97-108.
- Gilbert, B., McDonald, I. R., Finch, R., Stafford, G. P., Nielsen, A. K., & Murrell, J. C. (2000). Molecular analysis of the pmo (particulate methane monooxygenase) operons from two type II methanotrophs. *Applied and environmental microbiology*, 66(3), 966-975.
- Gonçalves, F.A. (2013). *Efeito do biorrevolvimento por macroinvertebrados bentônicos sobre a concentração de metano (CH₄) nas interfaces sedimento – água – atmosfera*. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação.
- Green, P. N. (1992). Taxonomy of methylotrophic bacteria in “*Microbial Growth on C1-compounds*”, eds J. C. Murrell and D. P. Kelly (Andover: Intercept Press. Ltd.), 23-84.
- Grey, J., & Deines, P. (2005). Differential assimilation of methanotrophic and chemoautotrophic bacteria by lake chironomid larvae. *Aquatic Microbial Ecology*, 40(1), 61-66.
- Gubry-Rangin, C., Nicol, G. W., & Prosser, J. I. (2010). Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(3), 566-574.
- Hallam, S. J., Putnam, N., Preston, C. M., Detter, J. C., Rokhsar, D., Richardson, P. M., & DeLong, E. F. (2004). Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science*, 305(5689), 1457-1462.
- Hanson, R. S., & Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiological reviews*, 60(2), 439-471.
- Harrits, S. M., & Hanson, R. S. (1980). Stratification of aerobic methane-oxidizing organisms in Lake Mendota, Madison, Wisconsin. *Limnology and Oceanography*, 25(3), 412-421.

Heilskov, A. C., & Holmer, M. (2001). Effects of benthic fauna on organic matter mineralization in fish-farm sediments: importance of size and abundance. *ICES Journal of Marine Science*, 58(2), 427-434.

Hirayama, H., Abe, M., Miyazaki, M., Nunoura, T., Furushima, Y., Yamamoto, H., & Takai, K. (2014). *Methylomarinovum caldicuralii* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic methanotroph isolated from a shallow submarine hydrothermal system, and proposal of the family Methylothermaceae fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(3), 989-999.

Holmes, A. J.; Costello, A.; Lidstrom, M. E. & Murrell, J. C. (1995). Evidence that participate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS microbiology letters*, 132(3), 203-208.

Hu, B. L., Shen, L. D., Lian, X., Zhu, Q., Liu, S., Huang, Q., ... & Xu, X. Y. (2014). Evidence for nitrite-dependent anaerobic methane oxidation as a previously overlooked microbial methane sink in wetlands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(12), 4495-4500.

Hunting, E. R., Whatley, M. H., van der Geest, H. G., Mulder, C., Kraak, M. H., Breure, A. M., & Admiraal, W. (2012). Invertebrate footprints on detritus processing, bacterial community structure, and spatiotemporal redox profiles. *Freshwater Science*, 31(3), 724-732.

Hyman, M. R., & Wood, P. M. (1983). Methane oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Biochemical Journal*, 212(1), 31-37.

IPCC. (2013). Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. *Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA*, 1535 pp, doi:10.1017/CBO9781107415324.

Irmiler, U. (1975). Ecological studies of the aquatic soil invertebrates in three inundation forests of Central Amazonia. *Amazoniana*, 5(3), 337-409.

- Islam, T., Jensen, S., Reigstad, L. J., Larsen, Ø., & Birkeland, N. K. (2008). Methane oxidation at 55 C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the Verrucomicrobia phylum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(1), 300-304.
- Jia, Z., & Conrad, R. (2009). Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental microbiology*, *11*(7), 1658-1671.
- Jones, R. I., & Grey, J. (2011). Biogenic methane in freshwater food webs. *Freshwater Biology*, *56*(2), 213-229.
- King, G. M. (1990). Dynamics and controls of methane oxidation in a Danish wetland sediment. *FEMS Microbiology Letters*, *74*(4), 309-323.
- King, G. M., Roslev, P., & Skovgaard, H. (1990). Distribution and rate of methane oxidation in sediments of the Florida Everglades. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(9), 2902-2911.
- King, G. M. (1992). Ecological aspects of methane oxidation, a key determinant of global methane dynamics. In *Advances in microbial ecology*(pp. 431-468). Springer US.
- King, G. M., & Schnell, S. (1994). Ammonium and nitrite inhibition of methane oxidation by *Methylobacter albus* BG8 and *Methylosinus trichosporium* OB3b at low methane concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(10), 3508-3513.
- Kiyashko, S. I., Narita, T., & Wada, E. (2001). Contribution of methanotrophs to freshwater macroinvertebrates: evidence from stable isotope ratios. *Aquatic Microbial Ecology*, *24*(2), 203-207.
- Kiyashko, S. I., Imbs, A. B., Narita, T., Svetashev, V. I., & Wada, E. (2004). Fatty acid composition of aquatic insect larvae *Stictochironomus pictulus* (Diptera: Chironomidae): evidence of feeding upon methanotrophic bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *139*(4), 705-711.
- Knief, C. (2015). Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on pmoA as molecular marker. *Frontiers in microbiology*, *6*.

- Knowles, R., & Topp, E. (1988). Some factors affecting nitrification and the production of nitrous oxide by the methanotrophic bacterium *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Current Perspectives in Environmental Biogeochemistry*, 383-93.
- Kogure, K., & Wada, M. (2005). Impacts of macrobenthic bioturbation in marine sediment on bacterial metabolic activity. *Microbes and Environments*, 20(4), 191-199.
- Kolb, S., Knief, C., Stubner, S., & Conrad, R. (2003). Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA-targeted real-time PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2423-2429.
- Kristensen, E. (1985). Oxygen and Inorganic Nitrogen Exchange in a “*Nereis virens*” (Polychaeta) Bioturbated Sediment-Water System. *Journal of Coastal Research*, 109-116.
- Kristensen, E., Hjorth Jensen, M., & Aller, R. C. (1991). Direct measurement of dissolved inorganic nitrogen exchange and denitrification in individual polychaete (*Nereis virens*) burrows. *Journal of Marine Research*, 49(2), 355-377.
- Kristensen, E. (2000). Organic matter diagenesis at the oxic/anoxic interface in coastal marine sediments, with emphasis on the role of burrowing animals. *Hydrobiologia*, 426(1), 1-24.
- Kristensen, E., & Holmer, M. (2001). Decomposition of plant materials in marine sediment exposed to different electron acceptors (O₂, NO₃⁻, and SO₄²⁻), with emphasis on substrate origin, degradation kinetics, and the role of bioturbation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65(3), 419-433.
- Kristensen, E., Penha-Lopes, G., Delefosse, M., Valdemarsen, T., Quintana, C. O., & Banta, G. T. (2012). What is bioturbation? The need for a precise definition for fauna in aquatic sciences. *Marine Ecology Progress Series*, 446, 285-302.
- Laanbroek, H. J. (2009). Methane emission from natural wetlands: interplay between emergent macrophytes and soil microbial processes. A mini-review. *Annals of botany*, 105(1), 141-153.

- Leal, J. J. F. & Esteves, F. A. (1999). Influence of bauxite tailings on the structure of the benthic macroinvertebrate community in an Amazonian Lake (Lago Batata, Pará-Brazil). *Revista Brasileira de Biologia*, 59(3), 397-405.
- Leal, J. J. F. & Esteves, F. A. (2000). Life cycle and production of *Campsurus notatus* (Ephemeroptera, Polymitarcyidae) in an Amazonian lake impacted by bauxite tailings (Pará, Brazil). *Hydrobiologia*, 437(1), 91-99.
- Leal, J. J. F. (2003). *Bioturbação e ciclagem de nutrientes na interface sedimento-água de um lago amazônico impactado com rejeito de bauxita (Pará, Brasil)*. In: Departamento de Ecologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 264.
- Leal, J. J. F., Esteves F. A., Farjalla V. F. & Enrich-Prast, A. (2003). Effect of *Campsurus notatus* on NH_4^+ , DOC fluxes, O_2 uptake and bacterioplankton production in experimental microcosms with sediment-water interface of an Amazonian lake impacted by bauxite tailings. *International Review of Hydrobiology*, 88(2), 167-178.
- Leal, J. J. F., Enrich-Prast, A., Esteves, F. A., Bozelli, R., & Farjalla, V. F. (2005). Influence of *Campsurus notatus* bioturbation on oxygen profile and uptake in sediments of an Amazonian lake impacted by bauxite tailings. *Archiv für Hydrobiologie*, 162(4), 557-574.
- Leal, J. J. F., Furtado, A. L. D., Esteves, F. A., Bozelli R. L. & Figueiredo-Barros, M. P. (2007). The role of *Campsurus notatus* (Ephemeroptera : Polymitarcyidae) bioturbation and sediment quality on potential gas fluxes in a tropical lake. *Hydrobiologia*, 586(1), 143-154.
- Logan, J. M., Edwards, K. J., & Saunders, N. A. (Eds.). (2009). *Real-time PCR: current technology and applications*. Horizon Scientific Press.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2016). *Microbiologia de Brock-14ª Edição*. Artmed Editora.
- Margalef, R. (1983). *Limnología* (No. 504.45 MAR). Barcelona: Omega.

- Mbaka, J. G., Somlai, C., Köpfer, D., Maeck, A., Lorke, A., & Schäfer, R. B. (2014). Methane-derived carbon in the benthic food web in stream impoundments. *PloS one*, 9(10), e111392.
- McCafferty, W. P. (1975). The burrowing mayflies of the United States (Ephemeroptera: Ephemeroidea). *Transactions of the American Entomological Society (1890-)*, 101(3), 447-504.
- Megraw, S. R., & Knowles, R. (1989). Methane-dependent nitrate production by a microbial consortium enriched from a cultivated humisol. *FEMS Microbiology Letters*, 62(6), 359-365.
- Melo, S. M., Takeda, A. M., & Büttow, N. C. (1993). Variação temporal de ninfas de *Campsurus violaceus* Needham & Murphy, 1924 (Ephemeroptera: Polymitarcyidae) do Rio Baía (MS-Brasil). *Unimar*, 15, 95-107.
- Meysman, F. J., Middelburg, J. J., & Heip, C. H. (2006). Bioturbation: a fresh look at Darwin's last idea. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(12), 688-695.
- Molineri, C., & Emmerich, D. (2010). New species and new stage descriptions of *Campsurus* major species group (Polymitarcyidae: Campsurinae), with first report of silk-case construction in mayfly nymphs. *Aquatic Insects*, 32(4), 265-280.
- Molineri, C., & Salles, F. F. (2013). Phylogeny and biogeography of the ephemeral *Campsurus* Eaton (Ephemeroptera, Polymitarcyidae). *Systematic Entomology*, 38(2), 265-277.
- Molineri, C., Salles, F. F., & Emmerich, D. (2015). Revision of *Campsurus violaceus* species group (Ephemeroptera: Polymitarcyidae) with new synonymies and *nomina dubia* in *Campsurus Eaton*, 1868. *Zootaxa*, 3920(1), 51.
- Mullis, K. B. (1989, December). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. In *Annales de biologie Clinique*, 48(8), 579-582.
- Mulsow, S., Boudreau, B. P., & Smith, J. A. (1998). Bioturbation and porosity gradients. *Limnology and Oceanography*, 43(1), 1-9.

- Murase, J., & Kimura, M. (1994). Methane production and its fate in paddy fields VII. Electron acceptors responsible for anaerobic methane oxidation. *Soil science and plant nutrition*, 40(4), 647-654.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695-700.
- Needham, J. G., & Murphy, H. E. (1924). *Neotropical mayflies*. *Bull. Lloyd Libr*, 24, 1-79.
- Nolte, U. (1987). *Campsurus notatus* (Polymitarcidae, Ephemeroptera), a bioturbator in varzea lakes. *Amazoniana. Kiel*, 10(2), 219-222.
- Nteziryayo, L. R. (2013). *Food web structure of a Pantanal shallow lake revealed by stable isotopes*. Master's thesis. Science for Sustainable Development program. Linköping University, Sweden.
- O'Neill, J. G., & Wilkinson, J. F. (1977). Oxidation of ammonia by methane-oxidizing bacteria and the effects of ammonia on methane oxidation. *Microbiology*, 100(2), 407-412.
- Op den Camp, H. J., Islam, T., Stott, M. B., Harhangi, H. R., Hynes, A., Schouten, S., ... & Dunfield, P. F. (2009). Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia. *Environmental Microbiology Reports*, 1(5), 293-306.
- Oremland, R. S., & Culbertson, C. W. (1992). Importance of methane-oxidizing bacteria in the methane budget as revealed by the use of a specific inhibitor. *Nature*, 356(6368), 421.
- Panosso, R. F., Muehe, D., & Esteves, F. A. (1995). Morphological characteristics of an Amazon floodplain lake (Lake Batata, Para State, Brazil). *Amazoniana. Kiel*, 13(3), 245-258.
- Pereira, S. M., & Da-Silva, E. R. (1991). Descrição de uma nova espécie de *Campsurus* Eaton, 1868 do sudeste do Brasil, com notas biológicas (Ephemeroptera: Polymitarcyidae: Campsurinae). *Revista Brasileira de Biologia*, 51(2), 321-326.

- Pester, M., Rattei, T., Flechl, S., Gröngröft, A., Richter, A., Overmann, J., ... & Wagner, M. (2012). *amoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions. *Environmental Microbiology*, *14*(2), 525-539.
- Petersen, S. O., Amon, B., & Gattinger, A. (2005). Methane oxidation in slurry storage surface crusts. *Journal of Environmental Quality*, *34*(2), 455-461.
- Petr, T. (1977). *Bioturbation and exchange of chemicals in the mud-water interface*. In *Interactions Between Sediment and Fresh Water* (edited by H. L. Gotterman). Junk Publishers. 216-226pp.
- Pol, A., Heijmans, K., Harhangi, H. R., Tedesco, D., Jetten, M. S., & Den Camp, H. J. O. (2007). Methanotrophy below pH 1 by a new Verrucomicrobia species. *Nature*, *450*(7171), 874.
- Pratscher, J., Dumont, M. G., & Conrad, R. (2011). Ammonia oxidation coupled to CO₂ fixation by archaea and bacteria in an agricultural soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(10), 4170-4175.
- Raghoebarsing, A. A., Pol, A., Van de Pas-Schoonen, K. T., Smolders, A. J., Ettwig, K. F., Rijpstra, W. C., ... & Strous, M. (2006). A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, *440*, 918-921.
- Revsbech, N. P., Jørgensen, B. B., & Brix, O. (1981). Primary production of microalgae in sediments measured by oxygen microprofile, H¹⁴CO₃-fixation, and oxygen exchange methods. *Limnology and Oceanography*, *26*(4), 717-730.
- Salles, F. F., Da-Silva, E. R., Hubbard, M. D., & Serrão, J. E. (2004). The species of mayflies (Ephemeroptera: Insecta) recorded from Brazil. *Biota Neotropica*, *4*(2), 1-34.
- Salles, F. F. (2006). *A ordem Ephemeroptera no Brasil (Insecta): taxonomia e diversidade*. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 313f.
- Schnell, S., & King, G. M. (1994). Mechanistic analysis of ammonium inhibition of atmospheric methane consumption in forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(10), 3514-3521.

- Segers, R. (1998). Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry*, 41(1), 23-51.
- Semrau, J. D., DiSpirito, A. A., & Yoon, S. (2010). Methanotrophs and copper. *FEMS microbiology reviews*, 34(4), 496-531.
- Sioli, H. (Ed.). (2012). The Amazon: limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin (Vol. 56). *Springer Science & Business Media*.
- Smith, D. C., & Azam, F. (1992). A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using ^3H -leucine. *Mar. Microb. Food Webs*, 6(2), 107-114.
- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology*, 67(1), 6-20.
- Soriano, A. U., Martins, L. F., Ventura, E. S. A., Landa, F. H. T. G., Valoni, E. A., Faria, F. R. D., Ferreira, R. F., Faller, M. C. K., Valério, R. R., Leite, D. C. A., Carmo, F. L. & Peixoto, R. S. (2015). Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, 102-114.
- Svensson, J. M. (1998). The role of benthic macrofauna in nitrogen cycling in eutrophic lake sediment. *Department of Limnology, Ecology Building, Sölveg. 37, 223 62 Lund, Sweden*.
- Sweerts, J. P. R., Bär-Gilissen, M. J., Cornelese, A. A., & Cappenberg, T. E. (1991). Oxygen-consuming processes at the profundal and littoral sediment-water interface of a small meso-eutrophic lake (Lake Vechten, The Netherlands). *Limnology and Oceanography*, 36(6), 1124-1133.
- Takeda, A. M., & Grzybkowska, M. (1997). Seasonal dynamics and production of *Campsurus violaceus* nymphs (Ephemeroptera, Polymitarcyidae) in the Baia River, upper Parana River floodplain, Brazil. *Hydrobiologia*, 356(1), 149-155.
- Theisen, A. R., Ali, M. H., Radajewski, S., Dumont, M. G., Dunfield, P. F., McDonald, I. R., ... & Murrell, J. C. (2005). Regulation of methane oxidation in the facultative methanotroph *Methylocella silvestris* BL2. *Molecular microbiology*, 58(3), 682-692.

- Trotsenko, Y. A., & Murrell, J. C. (2008). Metabolic Aspects of Aerobic Obligate Methanotrophy. *Advances in applied microbiology*, 63, 183-229.
- Utsumi, M., Nojiri, Y., Nakamura, T., Nozawa, T., Otsuki, A., Takamura, N., Watanabe, M., & Seki, H. (1998). Dynamics of dissolved methane and methane oxidation in dimictic Lake Nojiri during winter. *Limnology and Oceanography*, 43(1), 10-17.
- Verhamme, D. T., Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2011). Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. *The ISME journal*, 5(6), 1067.
- Vekeman, B. (2016). *Methanotrophic microbiomes from North Sea sediment* (Doctoral dissertation, Ghent University).
- Vorobev, A. V., Baani, M., Doronina, N. V., Brady, A. L., Liesack, W., Dunfield, P. F., & Dedysh, S. N. (2011). *Methyloferula stellata* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, obligately methanotrophic bacterium that possesses only a soluble methane monooxygenase. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(10), 2456-2463.
- Wang, F., Tessier, A., & Hare, L. (2001). Oxygen measurements in the burrows of freshwater insects. *Freshwater Biology*, 46(3), 317-327.
- Wang, H., Appan, A., & Gulliver, J. S. (2003). Modeling of phosphorus dynamics in aquatic sediments: I—model development. *Water Research*, 37(16), 3928-3938.
- Whittenbury, R., & Dalton, H. (1981). *The methylotrophic bacteria*. In *The prokaryotes* (pp. 894-902). Springer Berlin Heidelberg.
- Woodruff, S. L., House, W. A., Callow, M. E., & Leadbeater, B. S. C. (1999). The effects of biofilms on chemical processes in surficial sediments. *Freshwater Biology*, 41(1), 73-89.
- Xia, W., Zhang, C., Zeng, X., Feng, Y., Weng, J., Lin, X., *et al.* (2011) Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. *The ISME Journal*, 5(7), 1226.
- Zehnder, A. J., & Brock, T. D. (1980). Anaerobic methane oxidation: occurrence and ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(1), 194-204.

Zehnder, A. J. B., & Stumm, W. (1988). Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats, p. 1–38. In A. J. B. Zehnder (ed.), *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Zhang, L. M., Offre, P. R., He, J. Z., Verhamme, D. T., Nicol, G. W., & Prosser, J. I. (2010). Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(40), 17240-17245.

Zhu, B., van Dijk, G., Fritz, C., Smolders, A. J., Pol, A., Jetten, M. S., & Ettwig, K. F. (2012). Anaerobic oxidization of methane in a minerotrophic peatland: enrichment of nitrite-dependent methane-oxidizing bacteria. *Applied and environmental microbiology*, *78*(24), 8657-8665.

Zilli, F. L. (2012). Life history traits and secondary production of *Campsurus violaceus* (Ephemeroptera: Polymitarcyidae) in the Paraná River floodplain lakes, Argentina. *Studies on neotropical fauna and environment*, *47*(1), 61-71.