

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE BIOCÊNCIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA**

**Caracterização por *DNA metabarcoding* da biodiversidade de  
ambientes neotropicais: investigação das comunidades presentes em  
fitotelmos de bromélias e sedimentos marinhos**

**Taiz Leonor Lopes Simão**

**TESE DE DOUTORADO**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**

**Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429**

**Fone: (051) 3320-3500**

**CEP 90619-900 Porto Alegre - RS**

**Brasil**

**2016**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE BIOCÊNCIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA**

**Caracterização por *DNA metabarcoding* da biodiversidade de  
ambientes neotropicais: investigação das comunidades presentes em  
fitotelmos de bromélias e sedimentos marinhos**

**Taiz Leonor Lopes Simão**

**Orientador: Dr. Eduardo Eizirik**

**TESE DE DOUTORADO**

**PORTO ALEGRE - RS - BRASIL**

**2016**

## SUMÁRIO

---

Agradecimentos .....	IV
Resumo .....	V
Abstract .....	VI
Apresentação .....	VII
Capítulo I – Introdução geral .....	1
Capítulo II – Artigo sobre fitotelmos de bromélias .....	16
<i>Complex community composition in bromeliad tank waters revealed by high throughput DNA sequencing</i>	
Capítulo III – Artigo sobre sedimentos marinhos .....	18
<i>Structure and spatial heterogeneity of a chemosynthesis-based deep-sea microbial community inferred from large-scale DNA metabarcoding analyses</i>	
Capítulo IV – Conclusões gerais .....	20
Referências Bibliográficas .....	26
Anexo 1 – Artigo publicado em coautoria .....	32
<i>Discovery of a Chemosynthesis-based Community in the Western South Atlantic Ocean</i>	

## **AGRADECIMENTOS**

---

Agradeço à minha família e amigos pelo amor, apoio e torcida incondicional para que todos os meus projetos sejam bem-sucedidos. Em especial ao meu companheiro de todos os dias, João Paulo, por ser meu porto seguro.

Ao meu orientador, Eduardo Eizirik, meu maior incentivador, pela confiança, ensinamentos e conselhos ao longo da minha formação científica.

À Laura Utz, pela amizade, apoio e diversas oportunidades de colaboração desde o início da minha formação.

Ao meu orientador durante o doutorado-sanduíche, Eric Triplett, bem como aos colegas de laboratório da UF, pela oportunidade e conhecimentos compartilhados.

À Raquel Dias, meu anjo-da-guarda, que além da enorme contribuição para esse trabalho, se tornou uma grande amiga e me apoiou incondicionalmente durante minha estadia em Gainesville.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular tanto do passado quanto do presente. Tenho certeza que foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto, bem como tantos outros que estive envolvida no decorrer destes 10 anos.

Aos colaboradores do Instituto de Recursos Naturais da PUCRS, especialmente à Adriana Giongo, João Ketzer, Adolpho Augustin, Luiz Frederico Rodrigues e Renata Medina pela auxílio no desenvolvimento do projeto de sedimentos marinhos.

Aos integrantes da missão oceanográfica *Marion Dufresne 195*, pelo empenho e dedicação que tornou possível a expedição onde parte das amostras deste projeto foram coletadas.

Aos funcionários e colaboradores do Pró-Mata, que possibilitam a existência deste importante centro de pesquisa em nosso estado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia da PUCRS, ao CNPq e a CAPES pelas bolsas de doutorado e doutorado-sanduíche

## RESUMO

---

O presente projeto aplicou a técnica de *DNA metabarcoding*, que visa caracterizar em larga escala a biodiversidade presente em determinada comunidade (através do sequenciamento do DNA total e sem a necessidade de cultivo ou isolamento), em dois ambientes brasileiros pouco explorados e com grande riqueza de espécies. O primeiro é um microambiente típico da região neotropical, denominado fitotelmo de bromélia, o qual é formado pelo acúmulo de água e detritos entre as folhas destas plantas. As bromélias investigadas neste estudo foram amostradas em áreas de Floresta Ombrófila Densa e/ou Mista no sul do Brasil (localizadas no Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata, PUCRS), e pertencem às espécies *Aechmea gamosepala* Wittmack, *Vriesea friburgensis* Mez e *Vriesea platynema* Gaud. A coleta englobou múltiplos indivíduos por espécie e também múltiplas amostras (diferentes cisternas) do mesmo indivíduo, possibilitando avaliar a complexidade da variação nestas comunidades. O segundo ambiente consiste de sedimentos marinhos coletados no Cone de Rio Grande (situado no sudeste do Brasil, na porção *offshore* da Baía de Pelotas), em profundidades de até 18 metros abaixo do fundo do mar. As amostras são provenientes de quatro áreas distintas, apresentando diferentes características geoquímicas e fortes indícios da presença de comunidades quimiossintéticas. Nossa investigação observou grande diversidade biológica em ambos os ambientes. Foram identificados 30 filões de procariotos e 67 filões de eucariotos nos fitotelmos de bromélia, os quais parecem compreender tanto organismos endêmicos deste ambiente peculiar como organismos com distribuição cosmopolita, comuns em habitats de água doce ou solo. Uma característica interessante é que, em alguns casos, amostras provenientes de diferentes cisternas do mesmo indivíduo são mais semelhantes a cisternas de outros indivíduos (e mesmo de outras espécies) do que entre si. Desta forma, nossos resultados indicam que cada cisterna atua como um corpo d'água isolado, onde os efeitos de predação, competição e eventos estocásticos como partículas carregadas pelo vento, restos de folhas ou animais mortos, bem como excreções de animais, podem interferir fortemente na composição específica da comunidade local. Em relação aos sedimentos marinhos, observamos a presença de 58 filões procarióticos, os quais compreendem diversos táxons já caracterizados em outras comunidades quimiossintéticas marinhas. Entre estes organismos, foram identificadas arqueas metanotróficas e seus parceiros sintróficos (bactérias redutoras de sulfato), que juntos formam um consórcio cujo papel é fundamental na oxidação anaeróbica do metano, um importante processo que controla a emissão deste gás de efeito estufa para a atmosfera. Análises estatísticas realizadas em ambos os estudos buscaram descrever padrões de diversidade destas comunidades em diferentes escalas espaciais, bem como interpretá-los à luz do conhecimento atual sobre estes ambientes. De forma geral, os resultados obtidos nesta tese revelam em detalhe a complexidade destas comunidades, e abrem caminho para estudos mais aprofundados dos processos que controlam sua dinâmica espaço-temporal.

## ABSTRACT

---

### **DNA Metabarcoding for biodiversity characterization of Neotropical environments: study of bromeliad phytotelmata and marine sediments communities.**

This project applied the DNA metabarcoding technique, which consists of a large-scale identification of the biodiversity present in a given community (through the total DNA sequencing without the need for isolation and laboratory cultivation) in two underexplored Brazilian environments with high biological diversity. The first is a typical Neotropical microenvironment, called bromeliad phytotelm, which is formed by the accumulation of water and debris among the leaves of these plants. The bromeliads investigated in this study were sampled in areas of dense ombrophilus forest and mixed ombrophilus forest in southern Brazil (located at the “Pro-Mata” Research Center), and belonged to the species *Aechmea gamosepala* Wittmack, *Vriesea friburgensis* Mez and *Vriesea platynema* Gaud. The collection comprised multiple individuals per species and also multiple samples (different tanks) from the same individual, making it possible to assess the complexity of the variation in these communities. The second environment consists of marine sediments collected in the Rio Grande Cone (located in southeastern Brazil, in the offshore portion of the Pelotas Basin), at depths of down to 18 meters below the seafloor. The samples originated from four different areas, with different geochemical characteristics and strong indications of the presence of chemosynthetic communities. This study demonstrated the presence of high biodiversity in both environments. We identified 30 prokaryotic phyla and 67 eukaryotic phyla in bromeliad phytotelmata, which seem to include both endemic organisms of this peculiar environment and organisms with ubiquitous distribution, common in freshwater or soil habitats. An interesting feature is that, in some cases, samples from different tanks of the same individual are more similar to tanks of other individuals (and even from other species) than between them. Thus, our results suggest that each bromeliad tank acts as an isolated body of water, where the effects of predation, competition and stochastic events such as wind-borne particles, fecal pellets and liquid excretions of terrestrial animals, dead leaves and animals can largely drive the community composition. Concerning the marine sediments, we observed the presence of 58 prokaryotic phyla, many of which are present in other chemosynthetic communities. Among these organisms were identified anaerobic methanotrophic archaeal groups and their syntrophic partners (sulfate-reducing bacteria), which together form a consortium with a significant role in the anaerobic oxidation of methane, a very important process that controls the emission of this greenhouse gas into the atmosphere. Statistical analysis performed in both studies sought to describe patterns of diversity of these communities at different spatial scales and to interpret them in the light of current knowledge about these environments. Overall, the results obtained in this thesis reveal in detail the complexity of these communities, opening new ways for further studies focusing on the processes that control their spatio-temporal dynamics.

## **APRESENTAÇÃO**

---

A presente tese está estruturada na forma de artigos científicos (Capítulos II e III) redigidos em inglês, contando também com capítulos de introdução geral (Capítulo I) e conclusões gerais (Capítulo IV) redigidos em português. Os artigos científicos seguem as normas estabelecidas pelos periódicos aos quais serão submetidos. Paralelamente aos artigos contidos nesta tese, encontra-se em anexo (Anexo 1) um artigo que foi publicado com a participação da aluna durante o período de doutoramento, o qual trata da caracterização inicial da comunidade quimiossintética aqui detalhada no Capítulo III.

## **CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL**

---

### **1.1. Histórico do problema**

O conhecimento humano acerca da biodiversidade do planeta Terra é ainda escasso. Estimativas atuais indicam que a maior parte das espécies de organismos que ocorrem no planeta não foi sequer descrita formalmente para a ciência. Dentre as espécies descritas, a maior parte é conhecida apenas em um nível muito incipiente, pouco se sabendo sobre aspectos básicos como biologia, ecologia e distribuição geográfica. A este desconhecimento se soma o grave problema de que as atividades humanas estão levando a uma acelerada taxa de extinção de formas de vida, em uma escala global. Neste contexto, muitos destes organismos ainda desconhecidos serão extintos antes de serem descritos e caracterizados pela comunidade científica. Além de seu valor intrínseco, muitos deles apresentam potenciais aplicações com benefício direto aos humanos, como fonte de nutrientes, fármacos, produtos químicos de aplicação industrial, ou modelos para inovação tecnológica. Torna-se, portanto, premente a aceleração dos esforços para caracterização da biodiversidade do planeta, empregando novas abordagens com especial foco em ambientes muito diversos e/ou ainda pouco explorados. Neste contexto, o presente projeto utilizou a estratégia de *DNA metabarcoding* (também conhecida como metagenômica ou genômica ambiental) para caracterizar a biodiversidade presente em dois ambientes brasileiros. O primeiro é um microambiente típico da região neotropical, a saber a água acumulada em cisternas de bromélias (uma comunidade denominada fitotelmo), pertencentes às espécies *Aechmea gamosepala*, *Vriesea friburgensis* e *Vriesea platynema* amostradas em áreas de Floresta Ombrófila Densa e/ou Floresta Ombrófila Mista no sul do Brasil. O segundo ambiente consiste na análise de sedimentos marinhos de diferentes profundidades, provenientes de áreas com características ecológicas particulares (p.ex. alta concentração de metano), bem como pontos amostrais adjacentes com propriedades químicas e geológicas distintas, localizados no Cone de Rio Grande (Bacia de Pelotas). Estudos prévios nestes dois ambientes indicam que ambos são muito diversos, abrigando um grande número de linhagens representantes dos domínios Bacteria, Archaea e Eukarya, muitos dos quais parecem ser desconhecidos da



ciência. Tais observações iniciais salientam a importância da caracterização em grande escala da biodiversidade ali presente, e justificam o investimento de esforço na sua investigação mais detalhada.

## **1.2. A genômica ambiental como ferramenta de investigação biológica**

O termo *DNA metabarcoding* foi cunhado por Taberlet et al. (2012) e refere-se à identificação em larga escala da comunidade presente em uma amostra ambiental através da extração do DNA total dos organismos ali presentes. Nesta técnica, o DNA genômico extraído de amostras ambientais é utilizado para a amplificação de genes conservados utilizando *primers* universais e sequenciado com tecnologias de sequenciamento de alto desempenho (Pavan-Kumar et al., 2015). Atualmente, a técnica de *DNA metabarcoding* é mais rápida e eficiente para a identificação da biodiversidade do que os métodos taxonômicos tradicionais que são mais caros, demorados, necessitam de um especialista treinado para cada grupo de organismos e geralmente não são capazes de lidar com problemas como espécies taxonomicamente semelhantes, estágios de vida juvenis e espécies crípticas. Esta é também uma ferramenta importante para a identificação de táxons raros, pois mesmo em baixa concentração o seu DNA pode ser detectado (Handley, 2015).

## **1.3 Fitotelmos de bromélias**

Bromeliaceae é uma família de monocotiledôneas, atualmente dividida em 58 gêneros e 3.140 espécies. Estes organismos constituem um dos grupos com maior diversidade taxonômica, morfológica e ecológica entre as plantas com flores nativas das regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo. Os representantes desta família podem ser encontrados em uma ampla variedade de habitats, abrangendo desde florestas úmidas a ambientes xerófitos, e apresentam hábitos distintos que incluem organismos epifíticos, terrícolas e rupícolas (Givnish et al., 2011). Benzing (2000) classificou as bromélias em cinco

categorias ecológicas, que variam de acordo com o estilo de vida destes organismos, os quais apresentam graus de dependência distintos para a absorção de nutrientes via raízes ou tricomas foliares absorventes, e diferentes vias fotossintéticas (C3 ou CAM). A distribuição geográfica de Bromeliaceae é predominantemente neotropical, havendo apenas uma única espécie, *Pitcairnia feliciana*, que ocorre no Golfo de Guiné, na África (Porembski & Barthlott, 1999), possivelmente decorrente de um evento de dispersão a longa distância há cerca de 12 milhões de anos (Givnish et al., 2004). O Brasil é provavelmente o principal centro de riqueza e endemismo desta família, abrigando somente na Mata Atlântica 31 gêneros, 803 espécies e 150 táxons infraespecíficos. Os dois gêneros mais abundantes de Bromeliaceae na Mata Atlântica brasileira são *Vriesea*, com 166 espécies, e *Aechmea* com 136 espécies (Martinelli et al., 2008). Dentre as espécies contidas nestes gêneros, serão os táxons focais do presente projeto: (i) *Aechmea gamosepala*, com distribuição geográfica predominantemente em Floresta Ombrófila Densa, ocorrendo do Rio Grande do Sul a São Paulo; (ii) *Vriesea friburgensis* presente do nordeste ao sul do Brasil, bem como, Paraguai e Argentina, habitando restingas litorâneas, Floresta Ombrófila Densa e Floresta Ombrófila Mista; e (iii) *Vriesea platynema*, que distribuiu-se por quase toda a América do Sul e ocorre preferencialmente em Floresta Ombrófila Densa (Negrelle et al., 2011) (Figura 1).



Figura 1: Espécies de bromélias investigadas neste estudo. a) *Aechmea gamosepala*, crédito: Taiz Simão; b) *Vriesea friburgensis*, crédito: Daniel Saraiva, disponível em [http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=10606](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=10606) ; c) *Vriesea platynema*, crédito: Marcelo Pedron, disponível em [http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=4802](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=4802)

As bromélias possuem as folhas dispostas em rosetas, e em algumas espécies a sobreposição estreita das bases destas folhas permite a formação de reservatórios (também chamados de cisternas ou tanques) que acumulam água da chuva e matéria orgânica. Este ecossistema singular recebe o nome de fitotelmo, e apresenta características próprias que podem influenciar de forma importante a ecologia e fisiologia da planta hospedeira. Os fitotelmos não são exclusivos de bromélias, sendo também formados em outras cavidades vegetais, tais como folhas modificadas, axilas foliares, flores, ocos de árvores ou entrenós de bambu, com volumes que variam de quantidades ínfimas até mais de 45 litros (Maguire, 1971; Frank & Lounibos, 1987). A estratégia de armazenamento de água e nutrientes para posterior absorção via tricomas foliares, especialmente em espécimes epífitos e rupícolas (organismos sem contato com solo ou em contato com uma pequena porção de solo suspenso) garante a existência destes organismos nestes ambientes tão hostis. Desta forma, o sucesso ecológico e a ampla distribuição geográfica de Bromeliaceae podem ser explicados pelo desenvolvimento de atributos importantes como epifitismo, tricomas absorventes, formação de cisternas, e a fotossíntese CAM (metabolismo ácido crassuláceo) (Leroy et al., 2015). Neste contexto, a plasticidade ecológica encontrada entre os representantes desta família a torna frequentemente dominante entre as plantas epífitas das comunidades neotropicais (Benzing, 2000).

Estudos que visam a descrever a composição das comunidades presentes em fitotelmos de bromélias ainda são escassos, e geralmente focam apenas em um grupo taxonômico. Goffredi et al. (2015) foi o único estudo, até o momento, que utilizou sequenciamento de alto desempenho (neste caso, metatranscriptômico) para avaliar a comunidade procariótica, eucariótica e viral em fitotelmos de bromélias. Foram encontrados 25 filos distintos de bactérias, 7 ordens de arqueas, 21 classes de metazoários, 8 classes de fungos, bem como vírus associados a insetos, plantas e fungos. Apesar do grande passo no conhecimento acerca deste tipo de comunidade que este estudo proporcionou, apenas duas amostras de uma mesma espécie (*Werauhia gladioliflora*) foram avaliadas, com uma metodologia que não foca no sequenciamento dos genes padronizados, considerados “*barcodes*”, restando portanto muito ainda a ser

explorado. Diversos outros estudos focaram em grupos taxonômicos específicos, tais como: arqueas (Martinson et al., 2010; Brandt et al., 2015), ciliados (Foissner et al., 2003; Dunthorn et al., 2012; Duran-Ramirez et al., 2015), algas (Sophia et al., 2004; Brouard et al., 2011), fungos (Araujo et al., 2012; Ruivo et al., 2005; Safar et al., 2013), crustáceos (Jocque et al., 2013), e artrópodes (Bacigalupo et al., 2006; Frank and Lounibos, 2009; Marques et al., 2012). Alguns vetores de doenças de interesse à saúde pública, mesmo em baixas densidades, também foram relatados em associação com bromélias, como por exemplo os gêneros de mosquito *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* (Frank and Lounibos, 2009; Marques et al., 2012; Müller & Marcondes, 2007) e os agentes etiológicos da doença de Chagas conhecidos como "barbeiros" (subfamília Triatominae) infectados com o patógeno *Trypanosoma cruzi* (Bacigalupo et al., 2006). Todos estes organismos juntos constituem uma teia alimentar, com diferentes funções ecológicas, tais como produção primária, predação, competição e decomposição (Kitching, 2000).

As bromélias apresentam estrutura complexa, fornecendo uma ampla variedade de compartimentos e gradiente ecológicos (Richardson et al., 1999). Desta forma, é necessário salientar a importância que este microambiente possui não somente para os organismos aquáticos que vivem no interior das cisternas ou para a planta que absorve os nutrientes fornecidos a partir da atividade de decomposição da comunidade aquática, mas também para aves e pequenos mamíferos (visitantes ocasionais e importantes dispersores de sementes), que buscam nos fitotelmos um local de abrigo e reprodução, bem como fontes de água e alimento. Há também outros animais envolvidos em associações mutualísticas com a bromélia, como por exemplo formigas, aranhas, rãs e moluscos (Benzing, 2000; Leroy et al., 2015). Deste modo, os fitotelmos de bromélias contribuem substancialmente para aumentar a biodiversidade local dos ecossistemas em que estão inseridos, expandindo os recursos disponíveis, especialmente no que se refere à disponibilidade de habitat e alimento (Benzing, 2000).

O processo de colonização de tanques de bromélias parece ser muito complexo, envolvendo uma série de eventos interligados, tais como dispersão ativa e passiva, chegada e estabelecimento dos organismos em uma nova área

(Maguire, 1971). Mais de 50 anos atrás, Maguire (1963) (através de experimentos com recipientes artificiais) descreveu três mecanismos de dispersão de organismos para corpos d'água isolados, sendo estes: i) o vento e a chuva, ii) o voo (ativo), e iii) o transporte "passivo" que conta com a assistência de outras espécies (forésia). Posteriormente, Frank & Lounibos (1987) compararam o processo de colonização dos fitotelmos com o processo de colonização que ocorre em pântanos e ilhas, diferenciando-os em dois tipos: i) fitotelmo-especialistas, com grande riqueza de espécies, baixo *turnover* e colonização altamente seletiva e rápida (onde toda a biota vem de outro fitotelmo), e ii) não-especialistas, com baixa riqueza de espécies, alto *turnover* e colonização não-seletiva, onde ocorre a chegada sequencial e aleatória de espécies. Por exemplo, os mosquitos são altamente seletivos, usando da altura da planta, o tamanho, a cor e a química da água para selecionar seu habitat. No entanto, grupos de ciliados foram citados como não-especialistas, e alguns deles estariam provavelmente sujeitos a serem eliminados ao interagir com outros grupos de fitotelmo-especialistas. Alguns anos atrás, Dunthorn et al. (2012) conduziram um estudo de diversidade e endemismo de ciliados que habitam fitotelmos Neotropicais (incluindo bromélias, bambus e ocos de árvore) através do sequenciamento da subunidade menor do 18S rDNA, associado a investigações morfológicas. Neste estudo, foram descritos 45 isolados, representando 28 espécies possivelmente endêmicas deste tipo de ambiente. Sendo assim, tais resultados indicaram que os fitotelmos investigados pareciam ser compostos tanto por espécies cosmopolitas como endêmicas, e algumas delas podem ser resultado de especiação dentro desse habitat tão particular. Além disso, não verificou-se a presença de ciliados espécie-específicos, sendo provavelmente a distância espacial entre os fitotelmos o fator mais importante na diferenciação das suas comunidades.

Considerando a grande variação ambiental à qual os tanques de bromélias são expostos (principalmente a restrição nutricional, mas acima de tudo o estresse hídrico causado pelos períodos de estiagem), a manutenção a longo prazo dos organismos que habitam estes fitotelmos pode depender do desenvolvimento de mecanismos de sobrevivência para driblar condições adversas. Algumas adaptações já foram descritas em grupos de ciliados e

incluem por exemplo, a formação de cistos de resistência e a modificação do tamanho corporal e da ciliatura oral, permitindo mudanças nos hábitos alimentares (Foissner et al., 2003). Esta alternância de estilo de vida de bacterívoro (denominado morfotipo pequeno, com tamanho corporal de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ ) a predador de outros eucariotos unicelulares (morfotipo grande, medindo cerca de 600  $\mu\text{m}$ ), também foi documentada pelo nosso grupo de pesquisa em ciliados da família Tetrahymenidae, coletados em uma das espécies de bromélia aqui investigadas e no mesmo local onde este projeto está sendo desenvolvido. Essa predação foi registrada através da observação de indivíduos do gênero *Paramecium* em vacúolos digestivos do morfotipo grande, e é provavelmente reflexo da grande competição por alimento que ocorre neste ambiente (dados não publicados). Outros processos que podem ocorrer no habitat dos fitotelmos, permitindo tolerar flutuações ambientais, são a formação de esporos (esporulação) em bactérias (Hutchison et al., 2014) e um fenômeno chamado criptobiose, que é caracterizado por um estado ametabólico (latência) em resposta às condições hostis do ambiente (Keilin, 1959). A anidrobiose é induzida por dessecação e representa a forma mais difundida de criptobiose (que também engloba a criobiose – resistência a baixas temperaturas, e a anoxibiose – resistência à falta de oxigênio), promovendo adaptações morfológicas, fisiológicas e moleculares para reduzir os efeitos da desidratação (Welnicz et al., 2011). Ela é definida como um estado de extrema desidratação em que o organismo perde quase toda a água de seu corpo e não mostra qualquer sinal de vida em nível metabólico, mas mantém a capacidade de retomar a vida após a hidratação (Clegg, 2001). Este é um fenômeno generalizado entre os invertebrados e já foi registrado em tardígrados ("ursos-d'água") (Halberg et al., 2013), rotíferos (Marotta et al., 2010) e nematóides (Banton and Tunnacliffe, 2012).

Estudos anteriores em fitotelmos de bromélias revelaram a enorme diversidade de organismos que habitam estes tanques, destacando a necessidade de estudos mais abrangentes, incluindo várias amostras e ferramentas mais potentes para a caracterização da biodiversidade. Neste sentido, os principais objetivos deste estudo (Capítulo II) foram: (i) inventariar a biodiversidade procariótica e eucariótica presente em fitotelmos formados por três espécies de

bromélias; (ii) analisar de forma comparativa a composição da biota observada em diferentes níveis, especificamente: cisternas de um mesmo indivíduo, indivíduos da mesma espécie, indivíduos de espécies distintas; e (iii) investigar padrões de compartilhamento *versus* diferenciação na composição da biota, incluindo presença/ausência de táxons, bem como variação na abundância dos mesmos, avaliando a existência de padrões de composição e diversidade espécie-específicos.

#### **1.4 Sedimentos marinhos**

Os sedimentos marinhos são um dos ambientes com maior riqueza de espécies no mundo (Guardiola et al., 2015), representando de um décimo a um terço da biomassa total da Terra (Whitman et al., 1998). A presença de organismos no subsolo marinho já foi detectada em profundidades de aproximadamente 2,5 quilômetros (Km) para procariotos (Inagaki et al., 2015) e 1,7 Km para eucariotos (Ciobanu et al., 2014). Os microrganismos que habitam estas áreas realizam funções ecológicas fundamentais, desempenhando um papel crucial na ciclagem de nutrientes e energia em nosso planeta (Moran, 2015). A maioria dos sedimentos marinhos está localizada em profundidades superiores a 1.000 metros de coluna d'água. Deste modo, este habitat é frio, desprovido de luz, com alta pressão e com fontes energéticas geralmente fornecidas a partir de águas superficiais pela precipitação da matéria orgânica através da coluna d'água (Snelgrove, 1997). Entretanto, áreas de exsudações frias (*cold seeps*), caracterizadas pelas baixas temperaturas (2°C a 4°C) e pelo fluxo de metano, óleos e outros compostos hidrocarbonetos que chegam à interface água-sedimento através de frestas do assoalho marinho (Arvidson et al., 2004), fornecem o combustível necessário para suportar vida através da atividade quimiossintética. Estas comunidades apresentam grandes densidades populacionais, biomassa elevada, organismos altamente adaptados em comparação às áreas adjacentes, bem como a presença de relações simbióticas entre procariotos quimiossintéticos e diversos grupos animais (Paull et al., 1984; Sibuet & Olu, 1998; Tunnicliffe et al., 2003; Dubilier et al., 2008). As comunidades

quimiossintéticas tem sido descritas em uma ampla variedade de ambientes marinhos, ocorrendo em diferentes latitudes e profundidades (Sibuet & Olu, 1998). Além das áreas de exsudações frias, comunidades quimiossintéticas de profundidade também foram estudadas em fontes hidrotermais (Corliss et al., 1979, (Takai and Nakamura, 2011), carcaças de baleias (Smith et al., 1989, Smith e Baco, 2003) e pedaços de madeiras afundados, tais como troncos e naufrágios (Fagervold et al., 2012; Kalenitchenko et al., 2015) (Figura 2). Estes habitats apresentam diversos táxons endêmicos devido às suas propriedades físico-químicas únicas (Metaxas and Kelly, 2010), mas também apresentam uma parcela de compartilhamento de táxons entre si (Smith et al., 1989). Os habitats quimiossintéticos estão distribuídos de forma desigual ao longo do mundo (Figura 3), influenciados pelas características geológicas que os originam, assim como (i) aquelas induzidas tectonicamente por fluídos de alta pressão, escape de petróleo e gás natural, fluxo artesianos ou erosões catastróficas e deslizamentos ao longo de margens passivas e ativas para a formação de áreas de exsudação (Sibuet & Olu, 1998); (ii) fronteiras de placas tectônicas para fontes hidrotermais, (iii) rotas de migração de baleias para as carcaças, e (iv) proximidade a áreas florestadas no caso de madeiras afundadas, embora estas sejam mais difundidas espacialmente (Bernardino et al., 2012). Sendo assim, os habitantes destes ambientes precisam apresentar mecanismos de dispersão eficientes para colonizar com sucesso novos locais. Restos orgânicos em decomposição (tais como ossos de baleias e pedaços de madeira) provavelmente desempenham um papel importante, facilitando a dispersão destes organismos e servindo como pontes para a colonização/invasão de novos habitats (Smith et al., 1989; Distel et al., 2000). No que se refere à riqueza de espécies encontradas nesses ambientes, Bernardino e colaboradores (2012) mostraram que as comunidades são altamente heterogêneas entre diferentes pontos de coleta, no entanto há uma tendência geral para uma maior diversidade em áreas de exsudação e restos orgânicos em decomposição do que em fontes hidrotermais. A parcela da comunidade representada por espécies contendo relações simbióticas também muda entre estes habitats, sendo que apenas nas fontes hidrotermais e nas áreas de exsudação essas associações dominam a biomassa total. Em ossos de baleias e madeiras em decomposição, as simbioses



quimiossintéticas parecem formar apenas uma pequena parcela da comunidade (Dubilier et al., 2008). Além disso, há também uma tendência geral de diminuição de espécies com relações simbióticas à medida que aumenta a profundidade da coluna d'água. Nas áreas de exsudações frias mais profundas, tende a ocorrer apenas um pequeno número de espécies contendo simbiontes (Sibuet & Olu, 1998). Análises filogenéticas apontam que ocorreram eventos independentes de simbiose, causados por evolução convergente, sendo atualmente descritas relações de simbiose entre pelo menos nove diferentes linhagens de bactérias e sete filos de animais (Dubilier et al., 2008). Outro aspecto notável destas relações simbióticas é a diversidade de locais do corpo dos hospedeiros que podem ser colonizados por simbiontes. Estes microrganismos podem cobrir quase todo o corpo do animal, como em nematóides (Ott et al., 2004), ou se instalar em porções específicas, como os ectossimbiontes encontrados nas peças bucais e brânquias do camarão *Rimicaris* (Zbinden et al., 2004). Além disso, podemos salientar ainda casos de ocorrência simultânea de dois ou mais simbiontes quimiossintéticos no mesmo hospedeiro. Moluscos bivalves do gênero *Bathymodiolus* apresentam simbiontes sulfato-redutores e metanotróficos (Distel et al., 1995). Há casos ainda mais extremos, onde um único hospedeiro pode apresentar até seis simbiontes distintos, o que foi descrito para um bivalve do gênero *Idas* (Duperron et al., 2008).

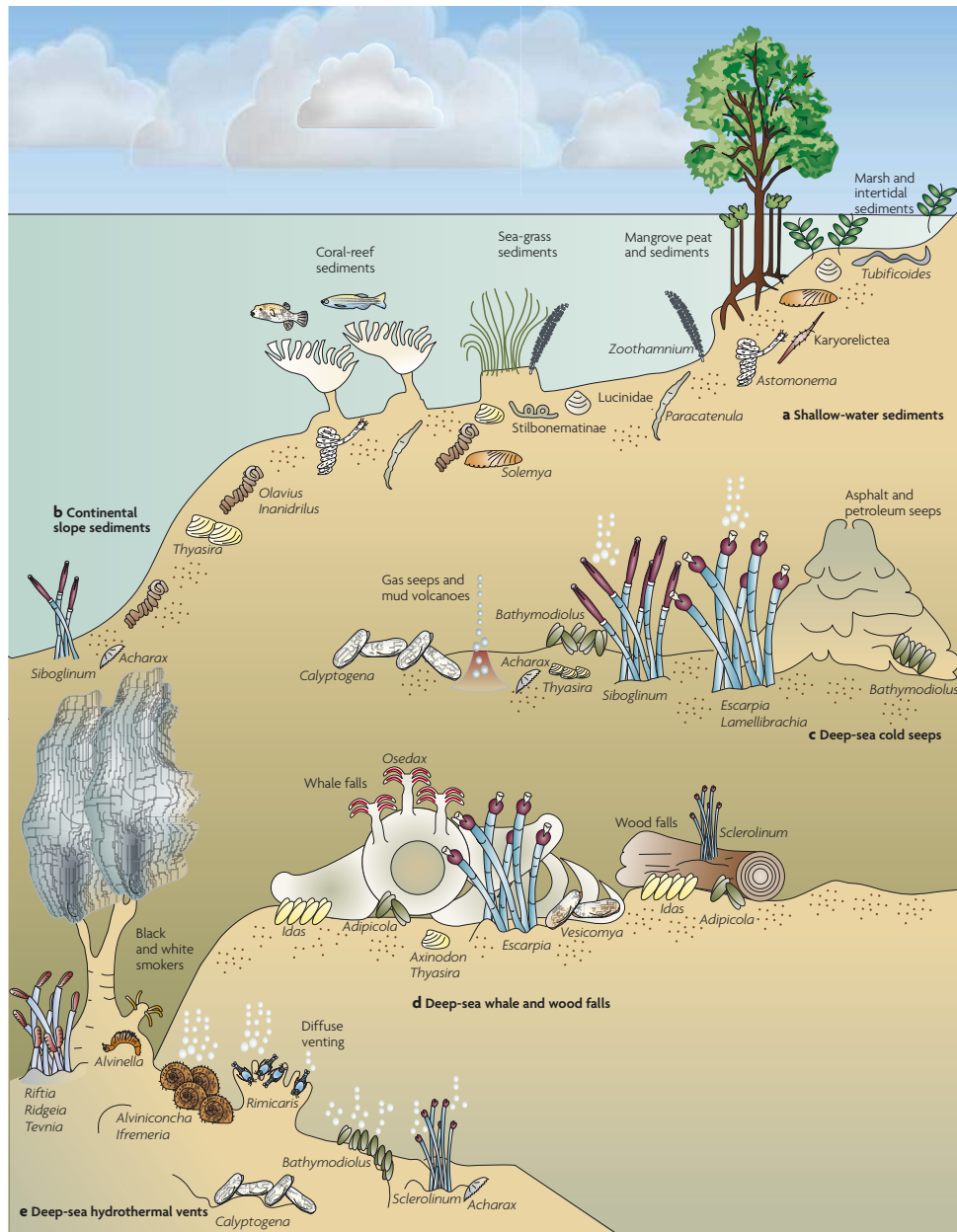


Figura 2: Representação dos habitats quimiossintéticos marinhos, bem como dos grupos de animais que possuem relações simbióticas com microrganismos. (a) sedimentos de águas rasas, (b) sedimentos do talude continental, (c) áreas de exsudações frias, (d) carcaças de baleias e madeiras em decomposição, e (e) fontes hidrotermais. Alguns grupos de hospedeiros são encontrados em apenas um habitat (como por exemplo, o gênero *Osedax* até o momento foi registrado somente em ossos de baleia), enquanto outros ocorrem em vários ambientes (tais como os bivalves do gênero *Thyasira*). Os animais não estão representados em escala real. Imagem disponível em Dubilier et al. (2008).

Nas últimas décadas, os ambientes quimiossintéticos marinhos foram amplamente estudados nos oceanos Atlântico Norte e Pacífico Norte, assim como em algumas poucas localidades do hemisfério sul (Baco et al., 2010; Sibuet & Olu, 1998; Smith & Baco, 2003; Tunnicliffe et al., 2003; Bernardino et al., 2012;

Dubilier et al., 2008; German et al., 2011; Inagaki et al., 2006; Takai and Nakamura, 2011). Entretanto, o oceano Atlântico Sul permanece muito pouco explorado, com a confirmação até o momento de apenas duas comunidades na costa brasileira, a primeira em uma área de exsudação fria do Cone de Rio Grande (Giongo et al., 2016) e a segunda em uma carcaça de baleia na costa do estado de São Paulo (Sumida et al., 2016); há ainda indícios de uma terceira comunidade associada a *pockmarks* na Bacia de Santos (Sumida et al., 2004).

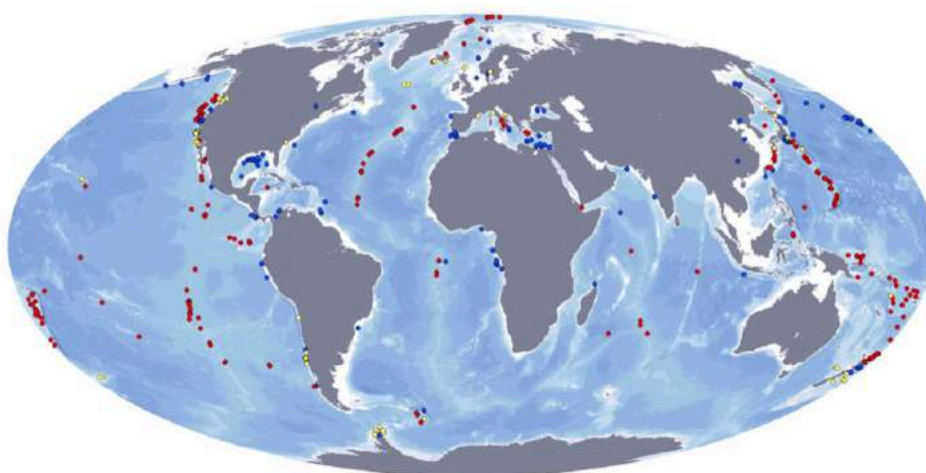


Figura 3: Mapa de distribuição global de comunidades quimiossintéticas pelos oceanos do mundo. Os pontos representam os estudos realizados em fontes hidrotermais (vermelho), áreas de exsudações frias (azul) e carcaças de baleia (amarelo). Imagem disponível em German et al. (2011), portando não compreendendo os dados publicados desde então; o que inclui duas novas comunidades brasileiras publicadas em 2016 (ver texto).

Os *pockmarks* são depressões no fundo do mar geralmente formadas pela ascensão de gases ou água (King & Maclean, 1970). Estudos anteriores identificaram a formação de *pockmarks* pela expulsão de metano, possivelmente liberado pela decomposição de matéria orgânica ou dissociação de hidratos de gás. Hidratos de gás (ou clatratos) são formados pela associação entre moléculas de água, ligadas entre si por pontes de hidrogênio, que aprisionam gases, em condições de alta pressão e baixa temperatura (Buffett, 2000). Como os gases aprisionados tendem a ser hidrocarbonetos, e a quantidade destes materiais no planeta pode ser superior a todos os recursos energéticos provenientes do petróleo, gás e carvão somados (Kvenvolden, 1995), há considerável interesse na caracterização de ambientes com potencial presença destes compostos, tanto do ponto de vista de ciência básica quanto aplicada.

À medida que a profundidade aumenta e a luz diminui, a atividade quimiossintética se torna a principal fonte de energia dos produtores primários. Em áreas de exsudações frias a produção primária é desempenhada pela atividade quimiossintética de arqueas e bactérias. Estes microrganismos convertem uma ou mais moléculas de carbono (geralmente dióxido de carbono ou metano) em matéria orgânica, através da oxidação de compostos inorgânicos (por exemplo, sulfeto) ou metano como fonte de energia (Dubilier et al., 2008). A oxidação anaeróbica do metano (*Anaerobic oxidation of methane - AOM*), juntamente com o processo de sulfato-redução, tem um papel crucial na ciclagem de carbono e enxofre em ambientes marinhos (Milucka et al., 2012). Este processo desempenha um papel significativo na regulação climática do planeta por controlar as emissões para a atmosfera do metano, um importante gás de efeito estufa (Reeburgh, 2007). Grupos de arqueas metanotróficas (*anaerobic methanotrophic - ANME*) foram descritos como parte de um consórcio formado com bactérias redutoras de sulfato (*sulphate-reducing bacteria - SRB*), sendo apontados como os principais responsáveis pela AOM, um processo globalmente distribuído e muito abundante em sedimentos ricos em hidratos de gás (Boetius et al., 2000). Os táxons de bactérias sulfato-redutoras envolvidas neste consórcio incluem os gêneros de Deltaproteobacteria *Desulfosarcina*, *Desulfococcus* e *Desulfobolbus* (Boetius et al., 2000; Knittel and Boetius, 2009). O metabolismo destes agregados provavelmente envolve uma associação sintrófica, baseada na transferência de elétrons entre espécies, que precisam estar espacialmente próximas. Resumidamente, as arqueas que compõem o consórcio parecem oxidar o metano e posteriormente transferir os compostos reduzidos para as bactérias sulfato-redutoras (Valentine, 2002). Mais detalhamento deste processo de AOM pode ser visualizado na Figura 4. Além das Deltaproteobacterias redutoras de sulfato, Pernthaler et al. (2008) identificaram outras linhagens bacterianas (fisicamente associados com o grupo ANME-2c), tais como o gênero *Sphingomonas* (Alphaproteobacteria) e membros da família Burkholderiaceae (Betaproteobacteria). Estes resultados ampliam a gama de parceiros bacterianos que atuam em consórcio com os grupos ANME, potencialmente apresentando estratégias ecológicas distintas e/ou novas capacidades metabólicas.

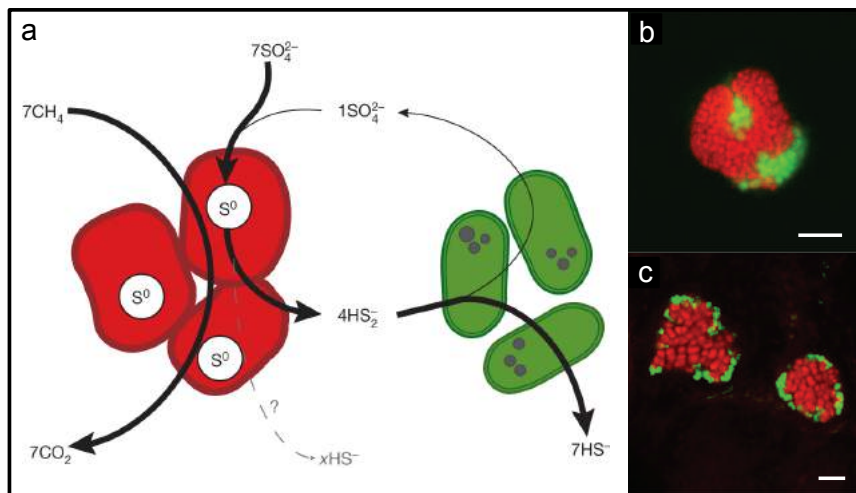


Figura 4: (a) Modelo de oxidação anaeróbica de metano acoplado ao processo de sulfato-redução proposto por Milucka et al. (2012). Em vermelho estão representadas as arqueas metanotróficas e em verde as bactérias redutoras de sulfato, da classe Deltaproteobacteria. Na ilustração, o grupo ANME-2 oxida o metano concomitantemente com a redução de sulfato para enxofre zero-valente ( $S^0$ , enxofre elementar), que é parcialmente depositado intracelularmente. O  $S^0$  produzido é exportado ou difundido para fora da célula, onde ele reage com o sulfeto de modo a formar polissulfetos (dissulfeto, entre outros). O dissulfeto é capturado pela proteobactéria associada e é transformado em sulfato e sulfeto. O sulfato pode ser reutilizado pela ANME, e a ANME, por sua vez, pode também reduzir uma porção do sulfato a sulfeto (linha pontilhada cinza). Círculos escuros nas bactérias representam precipitados intracelulares ricos em ferro e fósforo. (b-c) micrografias de fluorescência onde os grupos ANME estão representados em vermelho e as bactérias sulfato-redutoras em verde; micrografias disponíveis em Knittel & Boetius, (2009). b) Consócio entre ANME-3 e *Desulfobulbus*. c) Consócio tipo “concha” entre ANME-2c e bactérias do gênero *Desulfosarcina*.

Referente à comunidade microbiana presente na área de estudo deste projeto, uma investigação anterior baseada em sequenciamento de clones feita por Giongo e colaboradores (2016) encontraram uma alta concentração de grupos ANME indicando que o metano contribui substancialmente como fonte de nutrição para esta comunidade. Adicionalmente aos grupos de ANME encontrados neste local, o estudo também identificou outros táxons que são componentes típicos de comunidades quimiossintéticas, incluindo duas linhagens de animais (um poliqueta da família Siboglinidae e um bivalve do gênero *Acharax*) e clones microbianos classificados como pertencentes à classe Deltaproteobacteria, intimamente relacionados à espécie *Desulfofaba fastidiosa*, uma bactéria sulfato-redutora que foi isolada de uma zona de transição de sulfato-metano (*sulfate-methane transition zone - SMTZ*) (Abildgaard et al.,

2004). A saber, a SMTZ é definida como o horizonte dentro do sedimento marinho onde o sulfato e o metano coexistem; sendo assim, esta interface divide dois metabolismos microbianos distintos, a sulfato-redução e a metanogênese. Esta zona é também caracterizada pelo aumento da atividade microbiana, frequentemente associada à AOM (Harrison et al., 2009).

Neste contexto, nossos objetivos neste estudo (Capítulo III) são: (i) caracterizar a composição de procariotos da comunidade quimiossintética presente no Cone de Rio Grande (Bacia de Pelotas), (ii) avaliar se há diferença entre as comunidades presentes em diferentes profundidades do assoalho marinho, bem como entre as quatro áreas amostradas dentro do Cone de Rio Grande, (iii) identificar quais táxons presentes em nossa área de estudo já foram encontrados em outras áreas de exsudações frias, e (iv) investigar se fatores ambientais, tais como a concentração de metano, influenciam a composição desta comunidade.

*Complex community composition in bromeliad tank waters revealed by high throughput DNA sequencing*

Artigo a ser submetido ao periódico *Molecular Ecology*

**Complex community composition in bromeliad tank waters revealed by high throughput DNA sequencing**

Taiz L. L. Simão<sup>(1)</sup>, Laura R.P. Utz<sup>(2)</sup>, Raquel Dias<sup>(3)</sup>, Adriana Giongo<sup>(4)</sup>, Eric W. Triplett<sup>(3)</sup>, Eduardo Eizirik<sup>(1)\*</sup>

<sup>(1)</sup> PUCRS, Faculdade de Biociências, Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>(2)</sup> PUCRS, Faculdade de Biociências, Laboratório de Ecologia Aquática, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>(3)</sup> University of Florida, Department of Microbiology and Cell Science, Gainesville, FL, USA

<sup>(4)</sup> PUCRS, Instituto do Petróleo e Recursos Naturais, Porto Alegre, RS, Brazil

\*Corresponding author: Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12, Sala 134, Porto Alegre, RS, Brazil, [eduardo.eizirik@pucrs.br](mailto:eduardo.eizirik@pucrs.br)

**Artigo em processo de submissão para periódico científico.  
Dados inéditos sob proteção.**



### **CAPÍTULO III - ARTIGO CIENTÍFICO**

---

*Structure and spatial heterogeneity of a chemosynthesis-based deep-sea microbial community inferred from large-scale DNA metabarcoding analyses*

Artigo a ser submetido ao periódico *Environmental Microbiology*

## **Structure and spatial heterogeneity of a chemosynthesis-based deep-sea microbial community inferred from large-scale DNA metabarcoding analyses**

Taiz L. Lopes Simão<sup>a</sup>, Raquel Dias<sup>b</sup>, João M. M. Ketzer<sup>c</sup>, Adolpho H. Augustin<sup>c</sup>, Rogério V. Lourega<sup>c</sup>, Luiz F. Rodrigues<sup>c</sup>, Renata Medina-Silva<sup>c</sup>, Dennis J. Miller<sup>d</sup>, Claudia Groposo<sup>d</sup>, Adriano R. Viana<sup>e</sup>, Eric W. Triplett<sup>b</sup>, Adriana Giongo<sup>c</sup>, Eduardo Eizirik<sup>a\*</sup>

### **Affiliations**

<sup>a</sup> PUCRS, Faculdade de Biociências, Porto Alegre, Brazil

[taiz.lopes@gmail.com](mailto:taiz.lopes@gmail.com), [eduardo.eizirik@pucrs.br](mailto:eduardo.eizirik@pucrs.br)

<sup>b</sup> Department of Microbiology and Cell Science, University of Florida, FL, USA

[rdlady@gmail.com](mailto:rdlady@gmail.com), [ewt@ufl.edu](mailto:ewt@ufl.edu)

<sup>c</sup> PUCRS, Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais, Porto Alegre, Brazil

[adriana.giongo@pucrs.br](mailto:adriana.giongo@pucrs.br), [jketzer@pucrs.br](mailto:jketzer@pucrs.br), [adolpho.augustin@pucrs.br](mailto:adolpho.augustin@pucrs.br),  
[rogerio.lourega@pucrs.br](mailto:rogerio.lourega@pucrs.br), [frederico.rodrigues@pucrs.br](mailto:frederico.rodrigues@pucrs.br),  
[renata.medina@pucrs.br](mailto:renata.medina@pucrs.br)

<sup>d</sup> Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello – CENPES – PETROBRAS, Rio de Janeiro, Brazil

[miller@petrobras.com.br](mailto:miller@petrobras.com.br), [groposo@petrobras.com.br](mailto:groposo@petrobras.com.br)

<sup>e</sup> E&P-EXP – PETROBRAS, Rio de Janeiro, Brazil

[aviana@petrobras.com.br](mailto:aviana@petrobras.com.br)

\*Corresponding author: Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12, Sala 134, Porto Alegre, RS, Brazil, [eduardo.eizirik@pucrs.br](mailto:eduardo.eizirik@pucrs.br).

**Artigo em processo de submissão para periódico científico.  
Dados inéditos sob proteção.**

## **CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES GERAIS**

---

Os dois ambientes investigados neste estudo apresentaram grande diversidade biológica, assim como grande heterogeneidade espacial. Estes resultados demonstram a complexidade das comunidades investigadas, salientando a necessidade da intensificação de estudos que visem à caracterização detalhada de sua estrutura e dinâmica, do papel ecológico dos muitos táxons ali presentes, bem como a realização de investigações semelhantes em outras localidades.

Com relação à biodiversidade encontrada nos sedimentos marinhos, foi possível observar grande semelhança entre os microrganismos presentes em nossa área de estudo com outras comunidades quimiossintéticas ao redor do mundo. Este padrão já foi reportado em estudos prévios, os quais indicam que a composição da comunidade microbiana varia de um habitat marinho para outro, mas pode ser relativamente constante em ambientes marinhos com características ecológicas semelhantes, separados por grandes distâncias. Por exemplo, massas d'água adjacentes com diferentes propriedades ambientais possuem comunidades microbianas distintas. Da mesma forma, sedimentos marinhos com propriedades diferentes separados por pequenas distâncias (que em escala oceânica podem ser representadas por algumas dezenas de quilômetros) também apresentam comunidades distintas. Inversamente, comunidades que habitam massas d'água e sedimentos com propriedades físico-químicas semelhantes são bastante similares, mesmo quando separadas por milhares de quilômetros (Walsh et al., 2015). Apesar de este fenômeno já ter sido reportado previamente, a sua caracterização detalhada (identificando quantos e quais componentes de cada biota local apresentam este padrão) é ainda incipiente em nível global, e vastas regiões do planeta foram sequer amostradas até o momento para inventariar de forma básica sua composição biótica. Uma das regiões que permanecem pouco conhecidas, do ponto de vista da biota de sedimentos marinhos, é o oceano Atlântico sul ocidental, cuja investigação empregando sequenciamento de DNA ambiental se iniciou apenas recentemente (Giongo et al., 2016; Sumida et al., 2016). Neste contexto, o presente estudo representa o primeiro esforço detalhado, empregando *DNA metabarcoding* com

sequenciamento de nova geração, que visa a caracterizar padrões espaciais de diversidade microbiana em uma comunidade quimiossintética localizada nessa região.

Da mesma forma, o conhecimento acerca da estrutura e dinâmica de comunidades bióticas presentes em fitotelmos de bromélias é ainda incipiente. A fim de contribuir para o avanço na compreensão destes sistemas, este estudo caracterizou pela primeira vez, utilizando *DNA metabarcoding* com sequenciamento de nova geração, a estrutura e heterogeneidade espacial deste tipo de comunidade biológica, avaliando sua diversidade e composição em diferentes escalas (interespecífica, intraespecífica, e intraindividual). Observou-se a presença de táxons possivelmente endêmicos deste tipo de habitat, indicando a possível ocorrência de eventos de especiação dentro deste ambiente, provavelmente influenciados por episódios de isolamento e adaptação às grandes flutuações ambientais que tendem a ocorrer nestes sistemas. Ao mesmo tempo, foram também registrados organismos típicos de solos e ambientes aquáticos (de água doce), o que reflete a provável contribuição constante dos ecossistemas circundantes para a composição destas comunidades.

Apesar da observação de grandes grupos nas análises de diversidade beta não ponderada (*Unweighted Unifrac*, que utiliza a distância filogenética entre táxons, mas não a sua abundância), refletindo a espécie de bromélia hospedeira, em alguns casos amostras provenientes de espécies distintas apresentaram biotas procarióticas e eucarióticas mais semelhantes entre si do que amostras obtidas da mesma bromélia. Nas análises ponderadas, que consideraram tanto a informação filogenética quanto a abundância relativa de cada unidade taxonômica para calcular a distância entre amostras (*Weighted Unifrac*), os casos de agrupamento entre espécies distintas tornaram-se ainda mais frequentes. Esse padrão parece ser fortemente influenciado pela grande heterogeneidade observada entre amostras da mesma espécie (e mesmo cisternas do mesmo indivíduo), provavelmente induzida por eventos estocásticos de colonização, os quais afetam mais frequentemente táxons raros do que táxons abundantes. Estes resultados ressaltam a fundamental importância da utilização de múltiplas amostras no delineamento de estudos que visem a comparar de forma mais conclusiva padrões de composição de ambientes complexos.

Por fim, é necessário destacar o padrão observado nas amostras provenientes da espécie *Vriesea platynema*. Apesar de esta espécie ter sido amostrada nos dois extremos da área analisada, e em pontos imediatamente adjacentes a indivíduos de outras espécies, tanto nas análises ponderadas como nas análises não ponderadas foi possível observar o maior agrupamento de suas amostras. Esta observação indica que a composição de sua biota parece ser consistentemente distinta em relação às duas outras espécies de bromélia, potencialmente devido a restrições físicas e/ou químicas induzidas pelo microambiente de seus fitotelmos. Esta hipótese pode ser testada de forma direta através de estudos adicionais em campo, bem como experimentos controlados de colonização.

Com relação aos microrganismos encontrados nos sedimentos marinhos investigados, foi observada uma tendência geral de diminuição da diversidade à medida que aumenta a profundidade (abaixo do fundo do mar). Constatamos também que a variação na abundância de alguns táxons foi associada à zona de transição de sulfato-metano, corroborando a hipótese proposta em estudos prévios (Carr et al., 2015; Oni et al., 2015) de que a concentração destes compostos influencia a distribuição vertical de organismos. Ao mesmo tempo, os padrões observados neste estudo revelaram-se muito mais complexos do que seria esperado se os indutores principais fossem apenas estes dois compostos. Houve extensa variação entre os diferentes perfis (*piston cores*) amostrados, e padrões variáveis de distribuição vertical entre os muitos grupos taxonômicos presentes nestes ambientes. Desta forma, pode-se concluir que há vários outros parâmetros ambientais regulando a composição e estratificação destas comunidades, e que as causas da grande heterogeneidade entre pontos espacialmente próximos devem ser alvo de investigações detalhadas.

Além de seu valor intrínseco, e da sua relevância geral na estocagem e ciclagem de nutrientes, a caracterização da biodiversidade presente em sedimentos marinhos, associada a características geoquímicas destes locais, é relevante no contexto da potencial extração e utilização de recursos naturais (p.ex. metano, petróleo ou hidratos de gás) presentes nestas áreas como fontes energéticas. Neste sentido, após identificar-se a estrutura estratigráfica das comunidades e a associação das mesmas com compostos químicos específicos,

pode ser possível utilizar esta informação biológica para inferir processos subjacentes, como por exemplo, se altas concentrações de metano encontradas em áreas de interesse econômico são de origem biogênica, termogênica ou ambas. Da mesma forma, o conhecimento detalhado acerca da dinâmica destas comunidades permite avaliar de forma mais clara os potenciais impactos de atividades extrativistas humanas sobre estas áreas.

Um aspecto em comum entre os dois tipos de ambiente investigados nesta tese é o desconhecimento acerca do papel destas comunidades nos ciclos biogeoquímicos, como por exemplo, no ciclo do metano. O metano é um gás de efeito estufa que apresenta um potencial de aquecimento 25 vezes maior do que o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), sendo, portanto premente a caracterização dos organismos envolvidos na sua produção e consumo, a fim de inferir de forma mais confiável a dinâmica global deste gás. O equilíbrio das emissões de metano para a atmosfera é resultado de processos microbianos, tais como a atividade de arqueas metanogênicas em zonas de clima úmido, agricultura (p.ex. plantações de arroz), sistemas digestivos de animais (p.ex. ruminantes) e a oxidação do metano sob condições aeróbicas e anaeróbicas (Conrad, 2009). Sendo assim, o clima da Terra é determinado por um número complexo de processos biológicos, físicos e químicos, interligados entre si, os quais ocorrem na atmosfera, terra e mar (Denman et al., 2007). Este assunto é amplamente abordado em ambientes marinhos, sendo este habitat provavelmente o principal regulador das emissões de metano para a atmosfera. Como discutido no Capítulo II, o processo de oxidação anaeróbica do metano em sedimentos marinhos é parcialmente mediado pelo consórcio formado por arqueas metanotróficas e bactérias redutoras de sulfato, organismos abundantes em nossa área de estudo, mas cuja diversidade bioquímica é ainda pouco compreendida de forma geral. O desconhecimento é ainda mais marcante no que tange à caracterização dos organismos envolvidos no ciclo do metano em áreas úmidas terrestres. Sabe-se que as concentrações de metano nas florestas Neotropicais são altas, entretanto a contribuição das diferentes comunidades como fonte deste gás, dentro deste ambiente, permanece incerta (Martinson et al., 2010). Os tanques de bromélias, que são abundantes em florestas Neotropicais, assim como outros tipos de fitotelmos, possivelmente desempenham um importante papel neste ciclo

biogeoquímico. Martinson et al. (2010) investigaram o fluxo de metano em 167 bromélias, e verificaram que todas emitiam o gás, identificando a presença de arqueas metanogênicas (pertencentes aos grupos Methanomicrobiales, Methanobacteriales, Methanosaetaceae e Methanocellales) dentro de seus tanques. Brandt et al. (2015), em um estudo que buscou avaliar a relação entre a quantidade de água e a taxa de produção de metano em tanques de bromélias, também identificou alguns grupos de arqueas metanogênicas, como Methanobacteriales, Methanosarcinaceae, Methanosaetaceae e Methanomicrobiales. Em nossa investigação também foi possível encontrar nestes ambientes grupos de arqueas associadas à produção de metano, tais como os gêneros *Methanosarcina* (família Methanosarcinaceae) e *Methanocella* (família Methanocellaceae), e representantes das famílias Methanomassiliicoccaceae, Methanoregulaceae e Methanomicrobiaceae. Como a metodologia aplicada neste estudo não visava ao sequenciamento de genes que estão sendo expressos no momento da coleta, não é possível afirmar com certeza que os genes de metanogênese estão ativos nas comunidades amostradas. No entanto, a presença destes grupos taxonômicos indica fortemente que a produção deste gás está ocorrendo nos tanques de bromélias investigados, salientando a importância deste microambiente neste ciclo global.

Características como a fácil amostragem, a possibilidade de delineamento amostral em diferentes distâncias e escalas (interespecífica, intraespecífica e intraindividual), bem como a análise tanto em campo quanto em laboratório sob variáveis controladas, tornam os fitotelmos de bromélias ferramentas úteis no estudo de diversos processos ecológicos, como dispersão, colonização, interação entre espécies e efeito fundador em corpos d'água isolados. A investigação detalhada dos ambientes em que os fitotelmos estão inseridos, incluindo a amostragem de solos e outros ambientes aquáticos próximos, bem como a coleta de dados físico-químicos detalhados destes microambientes, tornará possível determinar quais fatores ambientais induzem e mantêm a diferenciação da comunidade de um fitotelmo em relação a outros fitotelmos, ambientes aquáticos ou solos adjacentes.

Com relação ao estudo de comunidades procarióticas em sedimentos marinhos, devido à complexa interação com os organismos da coluna d'água, e o

grande desconhecimento acerca da plasticidade metabólica destes microrganismos, a melhor abordagem para compreender a dinâmica de tais ambientes é a utilização conjunta de metodologias que visem à classificação taxonômica de seus componentes e aquelas que identifiquem quais genes estão sendo expressos em cada ponto. Ambos os tipos de informação, associados a medições cada vez mais detalhadas de variáveis físico-químicas do mesmo ponto, devem viabilizar a inferência da porção metabolicamente ativa da comunidade em cada estrato, e sua relação com o ambiente em que está inserida.

Para ambos os tipos de ambiente, espera-se que o presente estudo tenha provido avanços relevantes em termos da caracterização das biotas ali presentes. Os resultados aqui obtidos permitem vislumbrar de forma mais clara a complexidade destes sistemas, e podem servir de base para o delineamento de estudos aprofundados com foco nos processos que regem a dinâmica destas comunidades biológicas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Abildgaard, L., Ramsing, N.B., Finster, K., 2004. Characterization of the marine propionate-degrading, sulfate-reducing bacterium *Desulfofaba fastidiosa* sp. nov. and reclassification of *Desulfomusa hansenii* as *Desulfofaba hansenii* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 393-399.
- Arvidson, R.S., Morse, J.W., Joye, S.B., 2004. The sulfur biogeochemistry of chemosynthetic cold seep communities, Gulf of Mexico, USA. *Mar. Chem.* 87, 97-119.
- Araujo, F.V., Rosa, C.A., Freitas, L.F., Lachance, M.A., Vaughan-Martini, A., Mendonca-Hagler, L.C., Hagler, A.N., 2012. *Kazachstania bromeliacearum* sp. nov., a yeast species from water tanks of bromeliads. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1002-1006.
- Bacigalupo, A., Segura, J.A., Garcia, A., Hidalgo, J., Galuppo, S., Cattán, P.E., 2006. [First finding of Chagas disease vectors associated with wild bushes in the Metropolitan Region of Chile]. *Rev Med Chil* 134, 1230-1236.
- Baco, A.R., Rowden, A.A., Levin, L.A., Smith, C.R., Bowden, D.A., 2010. Initial characterization of cold seep faunal communities on the New Zealand Hikurangi margin. *Mar. Geol.* 272, 251-259.
- Banton, M.C., Tunnacliffe, A., 2012. MAPK phosphorylation is implicated in the adaptation to desiccation stress in nematodes. *J Exp Biol* 215, 4288-4298.
- Benzing, D. H., 2000. *Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Bernardino, A.F., Levin, L.A., Thurber, A.R., Smith, C.R., 2012. Comparative composition, diversity and trophic ecology of sediment macrofauna at vents, seeps and organic falls. *PLoS One* 7, e33515.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jorgensen, B.B., Witte, U., Pfannkuche, O., 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* 407, 623-626.
- Brandt, F.B., Martinson, G.O., Pommerenke, B., Pump, J., Conrad, R., 2015. Drying effects on archaeal community composition and methanogenesis in bromeliad tanks. *FEMS Microbiol Ecol* 91, 1-10.
- Brouard, O., Le Jeune, A-H., Leroy, C., Cereghino, R., Roux, O., Pelozuelo, L., Dejean, A., Corbara, B., Carrias, J-F., 2011. Are Algae Relevant to the Detritus-Based Food Web in Tank-Bromeliads? *PLoS ONE* 6, e20129.
- Buffett, B.A., 2000. Clathrate hydrates. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 28, 477-507.
- Carr, S.A., Orcutt, B.N., Mandernack, K.W., Spear, J.R., 2015. Abundant Atribacteria in deep marine sediment from the Adelie Basin, Antarctica. *Front Microbiol* 6, 872.
- Ciobanu, M.C., Burgaud, G., Dufresne, A., Breuker, A., Redou, V., Ben Maamar, S., Gaboyer, F., Vandenabeele-Trambouze, O., Lipp, J.S., Schippers, A., Vandenkoornhuyse, P., Barbier, G., Jebbar, M., Godfroy, A., Alain, K., 2014.

- Microorganisms persist at record depths in the subseafloor of the Canterbury Basin. *ISME J* 8, 1370-1380.
- Clegg, J.S., 2001. Cryptobiosis--a peculiar state of biological organization. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 128, 613-624.
- Conrad, R., 2009. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports* 1, 285-292
- Corliss JB, Dymond J, Gordon LI, Edmond JM, von Herzen RP, et al. 1979. Submarine Thermal Springs on the Galápagos Rift. *Science* 203: 1073-1083.
- Denman, K.L., G. Brasseur, A. Chidthaisong, P. Ciais, P.M. Cox, R.E. Dickinson, D. Hauglustaine, C. Heinze, E. Holland, D. Jacob, U. Lohmann, S. Ramachandran, P.L. da Silva Dias, S.C. Wofsy and X. Zhang, 2007. Couplings Between Changes in the Climate System and Biogeochemistry. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Distel, D. L., Lee, H. K.-W. Cavanaugh, C. M., 1995. Intracellular coexistence of methano- and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 9598-9602.
- Distel, D.L., Baco, A.R., Chuang, E., Morrill, W., Cavanaugh, C., Smith, C.R., 2000. Do mussels take wooden steps to deep-sea vents? *Nature* 403, 725-726.
- Dubilier, N., Bergin, C., Lott, C., 2008. Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nat Rev Microbiol* 6, 725-740.
- Dunthorn, M., Stoeck, T., Wolf, K., Breiner, H.W., Foissner, W., 2012. Diversity and endemism of ciliates inhabiting neotropical phytotelmata. *Syst. Biodivers.*, 10, 195-205.
- Duperron, S., Halary, S., Lorion, J., Sibuet, M., Gaill, F., 2008. Unexpected co-occurrence of six bacterial symbionts in the gills of the cold seep mussel *Idas* sp. (Bivalvia: Mytilidae). *Environ Microbiol* 10, 433-445.
- Duran-Ramirez, C.A., Garcia-Franco, J.G., Foissner, W., Mayen-Estrada, R., 2015. Free-living ciliates from epiphytic tank bromeliads in Mexico. *Eur J Protistol* 51, 15-33.
- Fagervold, S.K., Galand, P.E., Zbinden, M., Gaill, F., Lebaron, P., Palacios, C., 2012. Sunken woods on the ocean floor provide diverse specialized habitats for microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* 82, 616-628.
- Foissner, W., Struder-Kypke, M., Van Der Staay, G.W.M., Moon-Van Der Staay, S.Y., Hackstein, J.H.P. 2003. Endemic ciliates (Protozoa, Ciliophora) from tank bromeliads (Bromeliaceae): a combined morphological, molecular, and ecological study. *European Journal of Protistology* 39, 365-372.
- Frank, J.H., Lounibos, L.P., 1987. Phytotelmata: swamps or islands? *Florida Entomologist* 70, 14-20.
- Frank, J.H., Lounibos, L.P., 2009. Insects and allies associated with bromeliads: a review. *Terr Arthropod Rev* 1, 125-153.
- German, C.R., Ramirez-Llodra, E., Baker, M.C., Tyler, P.A., ChEss Scientific Steering, C., 2011. Deep-water chemosynthetic ecosystem research during

- the census of marine life decade and beyond: a proposed deep-ocean road map. *PLoS One* 6, e23259.
- Giongo, A., Haag, T., Simão, T.L.L., Medina-Silva, R., Utz, L.R.P., Bogo, M.R., Bonatto, S.L., Zamberlan, P.M., Augustin, A.H., Lourega, R.V., Rodrigues, L.F., Sbrissa, G.F., Kowsmann, R.O., Freire, A.F.M., Miller, D.J., Viana, A.R., Ketzer, J.M.M., Eizirik, E., 2015. Discovery of a Chemosynthesis-based Community in the Western South Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research Part I*. doi.org/10.1016/j.dsr.2015.10.010
- Givnish, T.J., Millam, K.C., Evans, T.M., Hall, J.C., Pires, J.C., Berry, P.E., Sysytsma, J.K., 2004. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and south american- african disjunctions in Rapataceae and Bromeliaceae based on ndhf sequence data. *Int J Plant Sci* 165 (4 Suppl.): S35-S54.
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H., Van Ee, B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P.A., Jabaily, R.S., Crayn, D.M., Smith, J.A., Winter, K., Brown, G.K., Evans, T.M., Holst, B.K., Luther, H., Till, W., Zizka, G., Berry, P.E., Sysytsma, K.J., 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am J Bot* 98, 872-895.
- Goffredi, S.K., Jang, G.E., Haroon, M.F., 2015. Transcriptomics in the tropics: Total RNA-based profiling of Costa Rican bromeliad-associated communities. *Comput Struct Biotechnol J* 13, 18-23.
- Guardiola, M., Uriz, M.J., Taberlet, P., Coissac, E., Wangensteen, O.S., Turon, X., 2015. Deep-Sea, Deep-Sequencing: Metabarcoding Extracellular DNA from Sediments of Marine Canyons. *PLoS One* 10, e0139633.
- Halberg, K.A., Jorgensen, A., Mobjerg, N., 2013. Desiccation tolerance in the tardigrade *Richtersius coronifer* relies on muscle mediated structural reorganization. *PLoS One* 8, e85091.
- Handley, L.L., 2015. How will the 'molecular revolution' contribute to biological recording? *Biol J Linnean Society* 115, 750-766
- Harrison, B.K., Zhang, H., Berelson, W., Orphan, V.J., 2009. Variations in archaeal and bacterial diversity associated with the sulfate-methane transition zone in continental margin sediments (Santa Barbara Basin, California). *Appl Environ Microbiol* 75, 1487-1499.
- Hutchison, E.A., Miller, D.A., Angert, E.R., 2014. Sporulation in Bacteria: Beyond the Standard Model. *Microbiol Spectr* 2.
- Inagaki, F., Hinrichs, K.U., Kubo, Y., Bowles, M.W., Heuer, V.B., Hong, W.L., Hoshino, T., Ijiri, A., Imachi, H., Ito, M., Kaneko, M., Lever, M.A., Lin, Y.S., Methe, B.A., Morita, S., Morono, Y., Tanikawa, W., Bihan, M., Bowden, S.A., Elvert, M., Glombitza, C., Gross, D., Harrington, G.J., Hori, T., Li, K., Limmer, D., Liu, C.H., Murayama, M., Ohkouchi, N., Ono, S., Park, Y.S., Phillips, S.C., Prieto-Mollar, X., Purkey, M., Riedinger, N., Sanada, Y., Sauvage, J., Snyder, G., Susilawati, R., Takano, Y., Tasumi, E., Terada, T., Tomaru, H., Trembath-Reichert, E., Wang, D.T., Yamada, Y., 2015. DEEP BIOSPHERE. Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~2.5 km below the ocean floor. *Science* 349, 420-424.

- Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A., Suzuki, M., Takai, K., Delwiche, M., Colwell, F.S., Nealson, K.H., Horikoshi, K., D'Hondt, S., Jorgensen, B.B., 2006. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2815-2820.
- Jocque, M., Fiers, F., Romero, M., Martens, K., 2013. Crustacea in Phytotelmata: A Global Overview. *J Crustacean Biology* 33, 451-460
- Kalenitchenko, D., Fagervold, S.K., Pruski, A.M., Vetion, G., Yucel, M., Le Bris, N., Galand, P.E., 2015. Temporal and spatial constraints on community assembly during microbial colonization of wood in seawater. *ISME J* 9, 2657-2670.
- Keilin, D., 1959. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 150, 149-191.
- King, L.H., MacLean, B., 1970. Pockmarks on the Scotian Shelf. *GSA Bull.* 81, 3141-3148
- Kitching, R.L., 2000. *Food Webs and Container Habitats: The Natural History and Ecology of Phytotelmata*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Knittel, K., Boetius, A., 2009. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annu Rev Microbiol* 63, 311-334.
- Kvenvolden, K.A., 1995. A review of the geochemistry of methane in natural gas hydrate. *Org. Geochem* 23, 997-1008
- Leroy, C., Carrias, J-F., Céréghino, R., Corbara, B., 2015. The contribution of microorganisms and metazoans to mineral nutrition in bromeliads. *J Plant Ecology*
- Maguire, B.Jr., 1963. The Passive Dispersal of Small Aquatic Organisms and their Colonization of Isolated Bodies of Water. *Ecol. Monogr* 33, 161-85
- Maguire, B.Jr., 1971. Phytotelmata: Biota and Community Structure Determination in Plant-Held Waters. *Annual Review of Ecology and Systematics* 2, 439-464.
- Marotta, R., Leasi, F., Uggetti, A., Ricci, C., Melone, G., 2010. Dry and survive: morphological changes during anhydrobiosis in a bdelloid rotifer. *J Struct Biol* 171, 11-17.
- Marques, T.C., Bourke, B.P., Laporta, G.Z., Sallum, M.A., 2012. Mosquito (Diptera: Culicidae) assemblages associated with *Nidularium* and *Vriesea* bromeliads in Serra do Mar, Atlantic Forest, Brazil. *Parasit Vectors* 5, 41.
- Martinelli, G., Vieira, C.M., Gonzalez, M., Leitman, P., Piratininga, A., Costa, A. Forzza, R.C., 2008. Bromeliaceae da Mata Atlântica: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59, 209-258.
- Martinson, G.O., Werner, F.A., Scherber, C., Conrad, R., Corre, M.D., Flessa, H., Wolf, K., Klose, M., Gradstein, S.R., Veldkamp, E., 2010. Methane emissions from tank bromeliads in neotropical forests. *Nat Geosci* 3, 766-769.
- Metaxas, A., Kelly, N.E., 2010. Do larval supply and recruitment vary among chemosynthetic environments of the deep sea? *PLoS One* 5, e11646.
- Milucka, J., Ferdelman, T.G., Polerecky, L., Franzke, D., Wegener, G., Schmid, M., Lieberwirth, I., Wagner, M., Widdel, F., Kuypers, M.M., 2012. Zero-valent sulphur is a key intermediate in marine methane oxidation. *Nature* 491, 541-546.
- Moran, M.A., 2015. The global ocean microbiome. *Science* 350, aac8455.

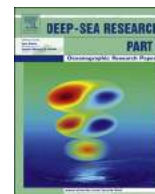
- Müller, G.A., Marcondes, C.B., 2007. Immature mosquitoes (Diptera: Culicidae) on the bromeliad *Nidularium innocentii* in ombrophilous dense forest of Santa Catarina Island, Florianópolis, Santa Catarina State, southern Brazil. *Biotemas* 20, 27-31
- Negrelle, R.R.B., Sampaio, L.K.A., Morokawa, R., Lewiski, I., 2011. Bromeliaceae Juss. do Pico Pirai, município de Guaratuba (Paraná, Brasil). *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* 32, 155-176
- Oni, O.E., Schmidt, F., Miyatake, T., Kasten, S., Witt, M., Hinrichs, K.U., Friedrich, M.W., 2015. Microbial Communities and Organic Matter Composition in Surface and Subsurface Sediments of the Helgoland Mud Area, North Sea. *Front Microbiol* 6, 1290.
- Ott, J., Bright, M., Bulgheresi, S., 2004. Symbioses between marine nematodes and sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacteria. *Symbiosis* 36, 103–126.
- Pavan-Kumar A, Gireesh-Babu P, Lakra WS. 2015. DNA Metabarcoding: A New Approach for Rapid Biodiversity Assessment. *J Cell Sci Molecul Biol* 2(1): 111.
- Paull, C.K., Hecker, B., Commeau, R., Freeman-Lynde, R.P., Neumann, C., Corso, W.P., Golubic, S., Hook, J.E., Sikes, E., Curray, J., 1984. Biological communities at the Florida escarpment resemble hydrothermal vent taxa. *Science* 226, 965–967.
- Pernthaler, A., Dekas, A.E., Brown, C.T., Goffredi, S.K., Embaye, T., Orphan, V.J., 2008. Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7052-7057.
- Porembski, S., Barthlott, W., 1999. *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous African bromeliad. *Harv Pap Bot* 4:175–184.
- Reeburgh, W.S., 2007. Oceanic methane biogeochemistry. *Chem Rev* 107, 486-513.
- Richardson, A.A., 1999. The Bromeliad Microcosm and the Assessment of Faunal Diversity in a Neotropical Forest. *Biotropica* 31, 321-336
- Ruivo, C.C., Lachance, M.A., Rosa, C.A., Bacci, M., Jr., Pagnocca, F.C., 2005. *Candida bromeliacearum* sp. nov. and *Candida ubatubensis* sp. nov., two yeast species isolated from the water tanks of *Canistropsis seidelii* (Bromeliaceae). *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2213-2217.
- Safar, S.V., Gomes, F.C., Marques, A.R., Lachance, M.A., Rosa, C.A., 2013. *Kazachstania rupicola* sp. nov., a yeast species isolated from water tanks of a bromeliad in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 1165-1168.
- Sibuet, M., Olu, K., 1998. Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins. *Deep-Sea Res. PT II* 45, 517–567.
- Smith, C. R., Kukert, H., Wheatcroft, R. A., Jumars, P. A. & Deming, J. W. 1989. Vent fauna on whale remains. *Nature* 34, 27–128.
- Smith C, Baco A. 2003. The ecology of whale falls at the deep-sea floor. *Oceanography and Marine Biology* 41, 311–354.
- Snelgrove, P.V.R., 1997. The Importance of Marine Sediment Biodiversity in Ecosystem Processes. *Ambio* 26,578-583

- Sophia, M.G., Carmo, B.P., Huszar, V.L.M., 2004. Desmids of phytotelm terrestrial bromeliads from the National Park of "Restinga de Jurubatiba", Southeast Brasil. *Algological Studies* 114, 99-119.
- Sumida, P.Y.G., Yoshinaga, M.Y., Madureira, L.A.S.P., Hovland, M., 2004. Seabed pockmarks associated with deep water corals off SE Brazilian continental slope, Santos Basin. *Mar. Geol.* 207, 159-167.
- Sumida, P.Y., Alfaro-Lucas, J.M., Shimabukuro, M., Kitazato, H., Perez, J.A., Soares-Gomes, A., Toyofuku, T., Lima, A.O., Ara, K., Fujiwara, Y., 2016. Deep-sea whale fall fauna from the Atlantic resembles that of the Pacific Ocean. *Sci Rep* 6, 22139.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., Willerslev, E., 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol Ecol* 21, 2045-2050.
- Takai, K., Nakamura, K., 2011. Archaeal diversity and community development in deep-sea hydrothermal vents. *Curr Opin Microbiol* 14, 282-291.
- Tunnicliffe, V., Juniper, S. K., Sibuet, M., 2003. Reducing Environments of the Deep-Sea Floor. Pp. 81-110 in: Tyler, P. A. (ed.) *Ecosystems of the World: The Deep Sea*. Amsterdam: Elsevier Press.
- Valentine, D.L., 2002. Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 271-282.
- Walsh, E.A., Kirkpatrick, J.B., Rutherford, S.D., Smith, D.C., Sogin, M., D'Hondt, S., 2015. Bacterial diversity and community composition from seafloor to subseafloor. *ISME J*.
- Welnicz, W., Grohme, M.A., Kaczmarek, L., Schill, R.O., Frohme, M., 2011. Anhydrobiosis in tardigrades--the last decade. *J Insect Physiol* 57, 577-583.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6578-6583.
- Zbinden, M., Le Bris, N., Gaill, F., Compère, P., 2004. Distribution of bacteria and associated minerals in the gill chamber of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* and related biogeochemical processes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 284, 237-251.

*Discovery of a Chemosynthesis-based Community in the Western South  
Atlantic Ocean*

Deep-Sea Research Part I 112 (2016) 45-56

doi:10.1016/j.dsr.2015.10.010



## Discovery of a chemosynthesis-based community in the western South Atlantic Ocean



Adriana Giongo<sup>a</sup>, Taiana Haag<sup>a,b</sup>, Taiz L. Lopes Simão<sup>b</sup>, Renata Medina-Silva<sup>a,b</sup>, Laura R.P. Utz<sup>b</sup>, Maurício R. Bogo<sup>b</sup>, Sandro L. Bonatto<sup>b</sup>, Priscilla M. Zamberlan<sup>b</sup>, Adolpho H. Augustin<sup>a</sup>, Rogério V. Lourega<sup>a</sup>, Luiz F. Rodrigues<sup>a</sup>, Gesiane F. Sbrissa<sup>a</sup>, Renato O. Kowsmann<sup>c</sup>, Antonio F.M. Freire<sup>d</sup>, Dennis J. Miller<sup>c</sup>, Adriano R. Viana<sup>d</sup>, João M.M. Ketzer<sup>a</sup>, Eduardo Eizirik<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> PUCRS, Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> PUCRS, Faculdade de Biociências, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Miguez de Mello – CENPES – PETROBRAS, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> E&P-EXP – PETROBRAS, Rio de Janeiro, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 May 2015

Received in revised form

14 October 2015

Accepted 19 October 2015

Available online 28 October 2015

#### Keywords:

ANME

Methanogens

Methanotrophs

Deep-sea

### ABSTRACT

Chemosynthetic communities have been described from a variety of deep-sea environments across the world's oceans. They constitute very interesting biological systems in terms of their ecology, evolution and biogeography, and also given their potential as indicators of the presence and abundance of consistent hydrocarbon-based nutritional sources. Up to now such peculiar biotic assemblages have not been reported for the western South Atlantic Ocean, leaving this large region undocumented with respect to the presence, composition and history of such communities. Here we report on the presence of a chemosynthetic community off the coast of southern Brazil, in an area where high-levels of methane and the presence of gas hydrates have been detected. We performed metagenomic analyses of the microbial community present at this site, and also employed molecular approaches to identify components of its benthic fauna. We conducted phylogenetic analyses comparing the components of this assemblage to those found elsewhere in the world, which allowed a historical assessment of the structure and dynamics of these systems. Our results revealed that the microbial community at this site is quite diverse, and contains many components that are very closely related to lineages previously sampled in ecologically similar environments across the globe. Anaerobic methanotrophic (ANME) archaeal groups were found to be very abundant at this site, suggesting that methane is indeed an important source of nutrition for this community. In addition, we document the presence at this site of a vestimentiferan siboglinid polychaete and the bivalve *Acharax* sp., both of which are typical components of deep-sea chemosynthetic communities. The remarkable similarity in biotic composition between this area and other deep-sea communities across the world supports the interpretation that these assemblages are historically connected across the global oceans, undergoing colonization from distant sites and influenced by local ecological features that select a stereotyped suite of specifically adapted organisms.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Cold seep areas are widespread around the world's oceans, occurring at different latitudes and depths (Sibuet and Olu, 1998).

They are characterized by the presence of fluxes of methane, oil, and/or other hydrocarbon components that reach the sediment–water interface from below via relatively focused conduits, such as faults (Arvidson et al., 2004). Chemosynthesis often occurs in

\* Correspondence to: PUCRS, Faculdade de Biociências, Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12, Sala 134, Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail addresses: [adriana.giongo@pucrs.br](mailto:adriana.giongo@pucrs.br) (A. Giongo), [taianahaag@gmail.com](mailto:taianahaag@gmail.com) (T. Haag), [taiz.lopes@gmail.com](mailto:taiz.lopes@gmail.com) (T.L.L. Simão), [renata.medina@pucrs.br](mailto:renata.medina@pucrs.br) (R. Medina-Silva), [laura.utz@pucrs.br](mailto:laura.utz@pucrs.br) (L.R.P. Utz), [mbogo@pucrs.br](mailto:mbogo@pucrs.br) (M.R. Bogo), [sbonatto@pucrs.br](mailto:sbonatto@pucrs.br) (S.L. Bonatto), [priscilla.zamberlan@gmail.com](mailto:priscilla.zamberlan@gmail.com) (P.M. Zamberlan), [adolfo.augustin@pucrs.br](mailto:adolfo.augustin@pucrs.br) (A.H. Augustin), [rogerio.lourega@pucrs.br](mailto:rogerio.lourega@pucrs.br) (R.V. Lourega), [frederico.rodrigues@pucrs.br](mailto:frederico.rodrigues@pucrs.br) (L.F. Rodrigues), [gesianesbrissa@yahoo.com.br](mailto:gesianesbrissa@yahoo.com.br) (G.F. Sbrissa), [kowsmann@petrobras.com.br](mailto:kowsmann@petrobras.com.br) (R.O. Kowsmann), [fernandofreire@petrobras.com.br](mailto:fernandofreire@petrobras.com.br) (A.F.M. Freire), [miller@petrobras.com.br](mailto:miller@petrobras.com.br) (D.J. Miller), [aviana@petrobras.com.br](mailto:aviana@petrobras.com.br) (A.R. Viana), [jketzer@pucrs.br](mailto:jketzer@pucrs.br) (J.M.M. Ketzer), [eduardo.eizirik@pucrs.br](mailto:eduardo.eizirik@pucrs.br) (E. Eizirik).



these areas, supporting biotic communities sustained by gases such as methane and byproducts of its decompositions such as H<sub>2</sub>S (Sibuet and Olu, 1998; Milucka et al., 2012), usually at temperatures of ~2–4 °C (Reed et al., 2006; Jørgensen and Boetius, 2007; Baco et al., 2010 and Das et al., 2011). Although such environments have been the focus of multiple studies for more than 20 years in the Northern Atlantic and Pacific Oceans (Paull et al., 1984; Barry et al., 2000; Sassen et al., 2004; Genio et al., 2008; Nunoura et al., 2008; Van Gaever et al., 2009a; Sibuet and Vangriesheim, 2009; Das et al., 2011; German et al., 2011; Hilário et al., 2011a; Vigneron et al., 2013a, 2013b), equivalent systems in the Southern Hemisphere have received less attention. A few studies have indicated that chemosynthetic communities also occur in western Africa and Peru, at equatorial latitudes, as well as further south off Chile and New Zealand (Olu et al., 1996a, 1996b; Sellanes et al., 2004; Ondreas et al., 2005; Cambon-Bonavita et al., 2009; Van Gaever et al., 2009b; Baco et al., 2010; Olu et al., 2010 and Rodrigues et al., 2010). Still, in spite of a previous study showing the existence of a faunal element (the polychaete *Amelinna* sp.) suggestive of a reducing environment in pockmarks off the coast of Brazil (Sumida et al., 2004), until now no clear documentation of such communities exists for the western South Atlantic Ocean. Such scarcity of information raises questions of whether these assemblages are also present in cold seeps found in this region, and if they have a similar composition to those identified so far in other areas.

Amongst the previous assessments of such ecosystems in other regions, some common features have emerged, such as the presence of the mat-forming vacuolated sulfur-oxidizing bacteria *Beggiatoa*, *Arcobacter*, *Thiothrix* and *Thiomargarita* (Olu et al., 1997; Levin, 2005; Portnova et al., 2011 and Vigneron et al., 2013a). These communities also tend to include representatives of specialized animal groups, including bivalve mollusks belonging to families Solemyidae (e.g. genus *Acharax*), Vesicomidae (e.g. *Calyptogena*) and Mytilidae, which generally carry in their gills endosymbiotic bacteria that are able to oxidize methane or hydrogen sulfide (Sibuet and Olu, 1998; Imhoff et al., 2003; Treude et al., 2003; Kalanetra et al., 2005; Levin, 2005; Cordes et al., 2010). Other animals that are typical of these habitats are highly specialized polychaete annelids belonging to the ‘Vestimentifera’ clade within the family Siboglinidae (e.g. genus *Lamellibrachia*) (Hilário et al., 2011a, 2011b). An interesting feature of these communities is the intricate interaction between such metazoan specialists and a complex and specialized microbiota, involving relationships ranging from direct predation to endosymbiosis. Across the range of such interactions, the ecological role of symbionts as well as free-living microorganisms is critically important and still poorly understood. Available evidence indicates that many of them are related directly or indirectly to the oxidation of hydrocarbon compounds by using oxygen, nitrate, ferric iron or sulfate as the terminal electron acceptor (Knittel and Boetius, 2009; Burgin et al., 2011). An important process affecting such dynamics (and influencing global deep-sea geochemistry) is the anaerobic oxidation of methane (AOM) using sulfate as a terminal electron acceptor (Zhang et al., 2011), a reaction which is mediated by a consortium of sulfate-reducing bacteria (SRB) and methanotrophic archaea (ANME) (Boetius et al., 2000; Orphan et al., 2002; Knittel et al., 2003; Knittel et al., 2005 and Knittel and Boetius, 2009). Among the former, the genera *Desulfosarcina*, *Desulfococcus* and *Desulfobolbus*, belonging to the class Deltaproteobacteria, are the most typical. The archaeal component of the consortium has been described on the basis of DNA sequences, and is presently allocated in one of three major ANME groups (ANME-1, ANME-2 and ANME-3) (Boetius et al., 2000). The ANME groups are related to the methanogens within the phylum Euryarchaeota, with ANME-1 being distantly affiliated with the orders Methanosarcinales and Methanomicrobiales, and ANME-2 and ANME-3

belonging to the order Methanosarcinales (Orphan et al., 2001; Knittel et al., 2005 and Lanoil et al., 2005). The mechanisms of the anaerobic oxidation of methane by ANME-1 and ANME-2 in the context of the archaeal–bacterial consortia are still unclear, but presumably involve a syntrophic association based on interspecies electron transfer. The archaeal member of the consortium apparently oxidizes methane and shuttles reduced compounds to the sulfate-reducing bacteria (Valentine, 2002 and Milucka et al., 2012).

Given the global biogeochemical relevance of anaerobic methane oxidation, as well as the role methane plays in atmospheric temperature regulation (Valentine, 2002), it is important to understand the structure and function of these deep-sea systems, which are likely critical components of the world’s methane source-sink dynamics. More specifically, characterizing the biological diversity that occurs in each of these areas is necessary to understand their common as well as unique features, which may help unravel more completely their underlying biogeochemical properties.

In this study, we employ multiple approaches to document the occurrence of a chemosynthetic biotic community within a deep-sea pockmark off the coast of southern Brazil, located in the Rio Grande Cone area (Pelotas Basin). We show that methane seepage occurs in the area, and demonstrate that it harbors several biological components that are typical of cold-seep assemblages, opening up new avenues to comparatively characterize these systems across multiple sites in the world’s oceans.

## 2. Material and methods

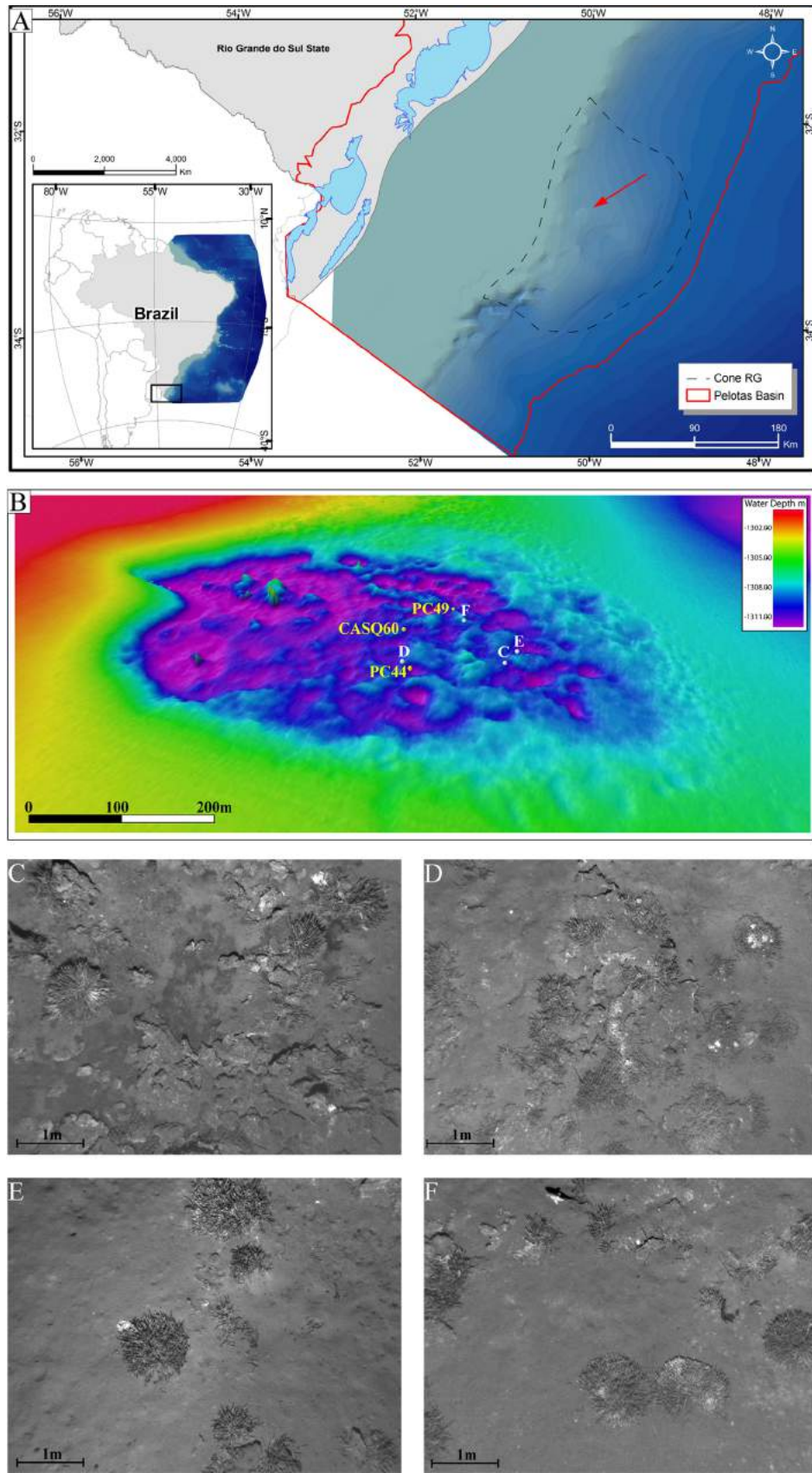
### 2.1. Site location and characterization

The study area consists of a pockmark named ‘Pockmark 22’, located at approximately 1200 m water depth on the northeastern flank of the Rio Grande Cone (Fig. 1). The latter is a large protuberance in the continental slope of the Pelotas Basin, western South Atlantic, where major bottom simulating reflectors (BSR) indicating the probable occurrence of gas hydrate deposits have been mapped both in Brazil (Sad et al., 1998; Fontana and Musumeci, 1994; Clennell, 2000; Oliveira et al., 2010) and Uruguay (Tomasini et al., 2011).

To investigate the possible occurrence of shallow (e.g. a few meters below the seafloor) gas hydrates in this area, we performed two oceanographic campaigns in February/March 2011 (MR11 campaign) and in May/June 2011 (MD186 campaign). The MR11 campaign used the Brazilian research vessel *Marechal Rondon*, equipped with a deep-water Reson Seabat 7150 high-resolution multi-beam echo sounder (MBES; operating frequency of 24 KHz) and a SyQwest Bathy 2010 CHIRP sub-bottom profiler (SBP; central frequency of 3.5 KHz). The vessel was also equipped with a 6 m long piston corer. The MD186 campaign used the French research vessel *Marion Dufresne*, equipped with a MBES/SBP Thomson Seafalcon 11 (with operating frequencies of 12 KHz for MBES and 3.5 KHz for SBP), as well as a 40 m long, giant Calypso piston corer, and a 25 × 25 cm<sup>2</sup>, 12 m long gravity box-coring device (CASQ core sampler).

### 2.2. Imaging of the pockmark using an autonomous underwater vehicle (AUV)

In addition to the two sampling campaigns, we also performed a separate research cruise that focused on the photographic documentation of the seafloor inside Pockmark 22. We used an autonomous underwater vehicle (AUV) model C-Surveyor II operated by the *R/V Rig Supporter*, which carried a high-resolution black-



**Fig. 1.** Characterization of the pockmark analyzed in this study. (A) Location of the pockmark in the Pelotas Basin, off the coast of southern Brazil; (B) detailed view of the pockmark, showing its depth variation, as well as the location of the sampled piston cores (PC44 and PC 49), the sampled box-core (CASQ60), and four selected AUV images (shown in panels C–F); (C–F) photographs of the seafloor within the pockmark, showing areas with carbonate accumulation associated with tube-worm clusters.

and-white camera that produced sequential images of the seabed. The pictures were taken from an average altitude of 8 m with an interval of 1.75 s (i.e. yielding one photo every 3.5 m), covering an area of approximately  $5 \times 5 \text{ m}^2$ , with ca. 60% overlap with the adjacent images. All pictures were referenced to the AUV navigation data. The image resolution is 0.75 times the height of the AUV with a ratio of 4:3, which corresponds to a resolution of 5 mm and an area of  $6.7 \times 5 \text{ m}^2$  for a 9 m flight altitude, for example.

### 2.3. Sampling of sediments and biological material

The two sampling campaigns included the collection of sediment samples using piston cores (PCs), which were complemented by CASQ samples in the case of the MD186 expedition. On board, PCs and box cores were opened and subsamples were collected for geological, geochemical and biological analyses. Upon the sectioning of each piston core, the superficial layer of its top portion was removed to avoid contamination, and approximately 100 g of sediment were collected from the underlying 10 cm. All collection procedures were performed with sterile materials, and sediment samples were immediately frozen at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  for further biological analyses. Shell and animal fragments recovered from piston cores and box cores were cleaned with distilled water, dried and stored, with the latter being kept at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  for further DNA-based analyses. Based on the observed features (see below and Section 3), we selected one piston core (PC49) for detailed characterization, and collected additional data on benthic fauna from a second PC (PC44) and a box core (CASQ60) (see Fig. 1B).

### 2.4. Geochemical analyses

An initial characterization of the collected sediments consisted of measurements of the concentration of hydrocarbons (C1–C5) employing the headspace method (May et al., 1975; Snow, 2002). The sediment sample was used to fill up a third of an Isojar container and another third of the volume was filled with distilled water, leaving the last third of the volume for the formation of headspace. We added five drops of the diluted bactericide Zephiran chloride into the jar, which was kept dry and refrigerated at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  until shipping to the laboratory for analysis. Methane was determined by injecting 0.5 mL of the headspace gas into a Thermo gas chromatograph equipped with a splitless injector, a capillary column VP-Plot Alumina/KCl (size: 30 m; 0.53 mm) and a flame ionization detector (FID). Helium was used as carrier gas, with a flow rate of  $5 \text{ mL min}^{-1}$ . The retention time of methane was about 2 min.

Sediment samples were also assessed for ammonia concentration and alkalinity, which were measured in interstitial water collected using stainless steel hydraulic squeezers. Immediately after squeezing, the interstitial water was filtered (using a  $3\text{-}\mu\text{m}$  mesh) into 50 mL plastic syringes attached to the apparatus. Approximately 10 mL were used to perform onboard analyses of these parameters, while another 40 mL were transferred to plastic bottles for shore-laboratory analyses. All samples were stored at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Ammonia was determined potentiometrically (Gilbert and Clay, 1973; Evans and Partridge, 1974) with an ion-selective electrode (Model 9512BNWP, Orion Thermo), with concentrations being assessed using five standards. Samples were similarly measured against the reference standard concentration. The reference concentration was calibrated frequently to minimize drifts in potential. The procedure included transferring 5 mL of the sample to a polypropylene tube, adding 100  $\mu\text{L}$  of a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  NaOH and performing constant mixing via magnetic stirring.

Alkalinity was determined using a single beam spectrophotometer (V-1 100D), read at 590 nm. Standards of known alkalinity (100, 200, 400 and  $800 \text{ mg L}^{-1}$ ) were prepared by dilution

of a titrated  $\text{NaHCO}_3$  solution in aqueous solution. The experimental points fit very well with a first order function, allowing the estimation of the sample alkalinity (Breland and Byrne, 1993). The indicator was prepared by mixing 5 mL of  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  methanoic acid (formic acid) and 25 mL of a  $500 \text{ mg L}^{-1}$  bromophenol-blue solution. The final volume was adjusted to 250 mL with a  $0.7 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl solution. Standards and samples were prepared by mixing 1.5 mL of indicator with 1.5 mL of prepared alkalinity standards or seawater samples in polypropylene tubes, followed by thorough shaking to achieve  $\text{CO}_2$  outgassing. Samples above  $800 \text{ mg L}^{-1}$  (the last value of the calibration curve) were carefully diluted by a known factor with the same NaCl solution.

### 2.5. Characterization of the microbial community

Based on the observed chemical features (especially the concentration of methane and ammonia) and the presence of gas hydrates, we selected one piston core (PC49) to perform a DNA-based characterization of the microbial community present in the area. We analyzed two different sediment samples, obtained from distinct depths of PC49: sample 's1' from the sediment surface (0 cm), and sample 's2' from 100 cm below the sediment surface.

Total DNA was extracted using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) following the manufacturer's protocol except for the increase in the centrifugation times to 5 min at all centrifugation steps, and the increase to 20 min in the incubation time at the final step before the last centrifugation. DNA extractions were performed in a UV-sterilized PCR workstation, located in a laboratory area isolated from PCR products, microbial clones and genomic DNA from potential contaminants. Dedicated instruments (e.g. micro-pipettes) and consumables were also employed to minimize the chance of contamination with exogenous DNA sources.

To characterize the archaeal and bacterial populations present in these samples, we amplified and characterized fragments of the 16S rRNA gene that are commonly employed in analyses of environmental microbial diversity. We used the universal primers F515 and R806 (Bates et al., 2010) and the archaeal-specific primer W178 and W179 (Takai and Horikoshi, 2000), with amplified fragment sizes of 291 bp and 457 bp, respectively. PCR reactions using the universal primers were performed in a 20  $\mu\text{L}$  volume containing 1  $\mu\text{L}$  of DNA,  $1 \times$  PCR Buffer, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  of each dNTP, 0.2  $\mu\text{M}$  of the forward and the reverse primers and 1U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). The PCR reaction using the archaeal primers was performed as described above, except for the final volume of 25  $\mu\text{L}$  and the use of 0.4  $\mu\text{M}$  of the forward and the reverse primers. Amplification using the universal primers was carried out as follows: one initial denaturation step at  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  for 2 min, 25 cycles including denaturation for 45 s at  $94 \text{ }^\circ\text{C}$ , annealing for 45 s at  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ , and extension for 1 min at  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ , followed by one final extension step for 6 min at  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ . PCRs with the archaeal-specific primers were performed with the following protocol: one initial denaturation step at  $96 \text{ }^\circ\text{C}$  for 5 min, 35 cycles including denaturation for 1 min at  $94 \text{ }^\circ\text{C}$ , annealing for 45 s at  $54 \text{ }^\circ\text{C}$ , and extension for 45 s at  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ , with one final extension step for 5 min at  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ . The amplified 16S rRNA gene fragments were cloned into the pGEM-T Easy Vector System (Promega) following the manufacturer's instructions for the construction of clone libraries. Plasmid DNA sequences were generated using the DYE-namic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare) and a MegaBACE 1000 automated sequencer (GE Healthcare).

Classification of reads was performed using PANGEA (Giongo et al., 2010a, 2010b) modified to deal with Sanger sequences. For the overall analysis of the microbial communities, sequences were classified into operational taxonomic units (OTUs) using BLAST based on the NCBI taxonomy database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Full taxonomic descriptions were generated for the entries in

the RDP database using TaxCollector (Giongo et al., 2010b). Matches were filtered at the 80% length fraction and classified at the 80% identity level for domain and phylum, 90% identity level for class, order and family, 95% identity level for genus, and 99% identity level for species (Hong et al., 2006).

### 2.6. Identification of the macrofauna

Soft animal tissue fragments were submitted to DNA extraction using the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen). A segment of the 18S rRNA gene was amplified by PCR using the forward primer INVf1 (5'-GGCTACCACATCTACGGAAGGC-3') and the reverse primer GEOr1 (5'-GTTCGTTATCGGAATTAACAGAC-3', Mochizuki et al., 2008). PCR reactions were performed in a 20  $\mu$ L volume containing 1  $\mu$ L of DNA, 1  $\times$  PCR Buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M of each dNTP, 0.25  $\mu$ M of the forward and the reverse primers and 0.2U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). The amplification was performed as follows: 10 cycles (touchdown) of 94 °C for 45 s, 60–51 °C for 45 s, 72 °C for 1.5 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 45 s, 50 °C for 45 s, 72 °C for 1.5 min and a final extension at 72 °C for 30 min. PCR products were analyzed on a 1% agarose gel stained with GelRed (Biotium), then purified using Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) and exonuclease I (GE Healthcare), and sequenced in a MegaBACE 1000 automated sequencer (GE Healthcare) following the manufacturer's protocols.

### 2.7. Phylogenetic analyses

DNA sequences obtained from both the microbial clone libraries and from animal tissue samples were initially inspected and manually edited using Mega 5.1 (Kumar et al., 2004). The same package was also employed to retrieve similar sequences from GenBank, using the BLAST tool, and were used to build four different alignments: (i) bacterial sequences; (ii) archaeal sequences; (iii) polychaete annelids; and (iv) bivalve mollusks (see Section 3). In each case, sequences from this study and those from GenBank were aligned using the ClustalW algorithm implemented in MEGA, followed by manual checking and adjusting. Blocks of ambiguously aligned nucleotides were removed from the final data sets to decrease the phylogenetic noise derived from these segments. To identify the most suitable model of nucleotide substitution for each data set, we used the Akaike Information Criterion as implemented in jModeltest 0.1.1 (Posada, 2008), as well as the maximum-likelihood (ML) approach available in MEGA 6.05. Phylogenetic analyses were performed using the Bayesian method implemented in BEAST 1.8 (Drummond et al., 2012), incorporating the available substitution model that was most similar to the best-fit model for each data set, and a relaxed molecular clock (random local clock) assumption. The MCMC procedure was run for 10 million generations, with samples taken every 1000 steps. After visual confirmation of convergence using the program Tracer 1.5 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>), we removed the initial 10% of the trees from each run as 'burn-in', so that only samples taken from the stabilized posterior distribution were analyzed.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Description of the pockmark

The analyzed pockmark (Fig. 1) is a semi-circular depression, measuring approximately 1200 m in diameter and 8 m in depth, characterized by a high-amplitude of the backscattered acoustic signal near the center of the depression (*i.e.*, 'eyed pockmark' *sensu* Hovland et al., 2002), indicating the presence of hard grounds formed by hydrates and/or carbonate crusts. Indeed, gas hydrates

were recovered from a depth of 1.45 m in this pockmark, demonstrating their occurrence at this site (Miller et al., 2015). Sub-bottom profiles across the pockmark showed a strong disturbance (blanking) in the acoustic signal below the pockmark, which is commonly attributed to gas flux in sediments fed by deep fault systems (Ondreas et al., 2005).

The piston cores (PCs) used for this study were up to 6 m long and contained mainly a succession of massive to poorly laminated, homogeneous dark olive gray and dark green muddy sediments. The release of gas bubbles from the sediment was observed in the first meters of some PCs at the time of sampling on deck.

We acquired approximately 10,500 photographs covering 212,000 m<sup>2</sup> of seabed in the pockmark (*i.e.* ~20% of the pockmark area). Images obtained with the AUV revealed the existence of extensive outcrops of carbonate rocks located mainly in the middle portion of the pockmark. Such carbonates are commonly associated with sulfate reduction and oxidation of methane (Raiswell, 1988; Hornbach et al., 2007).

### 3.2. Geochemical features

The concentration of methane varied between 2 ppm (v/v) and 63,000 ppm (v/v) across the sampled PCs. High-concentrations of ammonia (up to 40 mg L<sup>-1</sup>) were also detected. We selected one particular piston core (PC49) for detailed characterization. This PC recovered 150 cm depth of sediment, with the presence of gas hydrates below this blocking further penetration. Samples for geochemical analyses were retrieved from the depths of 100 cm and 150 cm below the seafloor, down to the point where the gas hydrates were observed. Methane concentration increased from 1000 ppm (v/v) at 100 cm and 8000 ppm (v/v) at 150 cm below the sediment surface. Since methane can be a product of microbial activity and is also an energy source, the observed variation may indicate biological synthesis and/or degradation. For the same depth interval, alkalinity varied from 120 to 1200 mg L<sup>-1</sup> and the ammonia concentration increased from 0.2 to 1 mg L<sup>-1</sup>. These observations may also be related to net subsurface microbial activity (Pimmel and Claypool, 2001; D'Hondt et al., 2003; Pohlman et al., 2008; Xinpeng et al., 2010). For example, alkalinity concentrations above 260 mg L<sup>-1</sup> have been reported for marine pore waters from different locations, with high-values being generally observed in coastal environments where the mineralization of high-amounts of organic matter contribute to this increase (Snyder et al. 2007; Koretsky et al., 2008). Moreover, previous studies have indicated that increased alkalinity at cold seeps is often related to microbial-related anaerobic oxidation of methane (*e.g.* Bayon et al., 2013). Therefore, our results from the chemical analyses highlighted the need for a biological assessment targeting this system, focusing on the site sampled with PC49.

### 3.3. Characterization of the microbial community

To investigate the microbial community present in the sediment obtained from PC49, segments of the 16S rRNA gene were amplified and sequenced for samples 's1' and 's2' described above. A total of 300 clones (29 from sample 's1' and 271 from sample 's2') was screened (Table 1) and their sequences were compared to reference data retrieved from GenBank.

Out of the 300 analyzed clones, 288 sequences presented > 95% identity to one or more GenBank entries, 179 of which were found to belong to the domain Archaea and 109 to Bacteria. Both sets of primers used in this study successfully amplified 16S rRNA gene fragments from distinct microorganisms at the domain level. The universal primers generated 57% fragments classified by BLAST as Bacteria, with the other 43% being classified as Archaea. Although the archaeal primers were designed specifically for this

domain, approximately 10% of the clones obtained with them were classified as Bacteria (Table 1). Both sets of primers were able to recover most of the ‘uncultured archaeon’ and/or Euryarchaeota lineages, including clones found to be related to ANME groups (see below). However, some groups of Archaea were only identified using the archaeal primers. This was the case of two clones found to be closely related to the methanogen *Methanococcoides* sp. and the ammonia-oxidizing archaeon *Nitrosopumilus maritimus*. On the other hand, clones related to the methane-oxidizing archaeon ANME-X5 were solely detected when using the universal set of primers. These results support the notion that a strategy employing distinct sets of primers does contribute to a more complete assessment of microbial communities in such environments.

### 3.4. Taxonomic composition of the microbial community

The analysis of 16S rRNA fragment sequences by BLAST indicated that the Bacteria and Archaea present at this pockmark were quite diverse (comparable to what has been observed at other seep sites (e.g. Cambon-Bonavita et al., 2009; Urich et al., 2014)). Most of our clones were highly similar to sequences representing uncultivated microorganisms detected in previous studies of other marine seep communities (Arakawa et al., 2006; Schubert et al., 2006; Nunoura et al., 2008; Cambon-Bonavita et al., 2009; Urich et al., 2014). Of the 288 analyzed clones, 280 were identified as uncultured microorganisms. The majority of the uncultured clones (55%) were classified as ‘uncultured euryarchaeota’ or ‘uncultured archaeon’ belonging to ANME-1, one of the groups of anaerobic methanotrophic Archaea that compose the AOM consortia (Boetius et al., 2000). This finding is an indication that AOM likely occurs in these marine sediment samples.

Overall, the archaeal clones that could be classified at phylum level were identified as belonging to the phyla Crenarchaeota, Euryarchaeota or Thaumarchaeota (Fig. 2). The archaeal phylum Euryarchaeota was represented by 166 clones, the vast majority of them (99%) having an uncultured-derived sequence as the best hit. Most of them were isolated 100 cm below the sediment surface (sample s2), although some ANME-1-related clones were also observed at the seafloor level (sample s1).

In addition to archaeal clones that were strongly related to ANME-1, we identified one clone whose best hit was

*Methanococcoides* spp., a genus that participates in a potentially methanogenic microbial consortium in Antarctica, Japan and in the Norwegian-Barents–Spitzbergen continental margin (Franzmann et al., 1992; Lösekann et al., 2007; Imachi et al., 2011), and which has been described as related to the ANME-3 group (Knittel et al., 2005). Another marine archaeon, *N. maritimus* (phylum Thaumarchaeota, formerly Crenarchaeota; Brochier-Armanet et al., 2008) was also identified in sample s1. This genus encodes genes for the synthesis of 2-hydroxyethylphosphonate (HEP), which is a common intermediate in phosphonate biosynthetic pathways, thus producing cell-associated methylphosphonate esters, that can be a source of methane in the ocean (Metcalf et al., 2012). Five clones grouped with the GenBank sequences from Crenarchaeota, most of them related to deep sea and methane cycling communities.

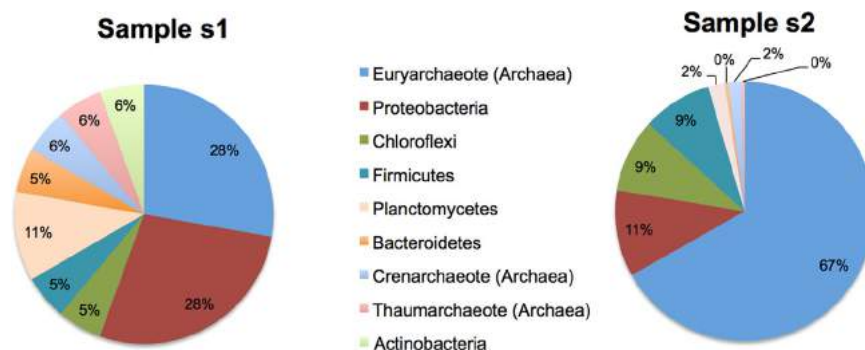
Within the domain Bacteria, the clones that could be classified at phylum level belonged to Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria and Spirochetes (Fig. 2). Members of Proteobacteria were important components of the clonal library, comprising 26.8% of the total clones. Within this group, there was a dominance of the class Deltaproteobacteria, which comprised more than 83% of the total Proteobacteria clones. The next most abundant phyla were Chloroflexi and Firmicutes, each accounting for ~11% of the total clones. The presence of several clones classified in the phylum Chloroflexi (also known as ‘green no-sulfur bacteria’) is interesting, as this group includes members that are aerobic thermophiles, anoxygenic phototrophs, and anaerobic halorespirers (Bedard et al., 2007; Nunoura et al., 2013). Within Chloroflexi, two clones from sample s2 presented a best hit with *Dehalococcoides* sp., a microbe that obtains energy via the oxidation of hydrogen gas using reductive dehalogenase (Rdh) enzymes and subsequent reductive dehalogenation of derived organic compounds (Maymo-Gatell et al., 1997; Kaster et al., 2014). These findings illustrate the potential diversity of microbial ecological processes present in these sediments. More importantly, the predominance of Deltaproteobacteria is noteworthy, since this class contains five orders encompassing bacterial families that bear sulfate-reducing ability (Radionov et al., 2004). Since sulfate-reducing bacteria are the partners of ANME in the AOM consortia (Boetius et al., 2000), this finding supports the inference that this prokaryotic methanotrophic association occurs in the marine sediments analyzed in this study.

### 3.5. Phylogenetic assessment of the microbial community

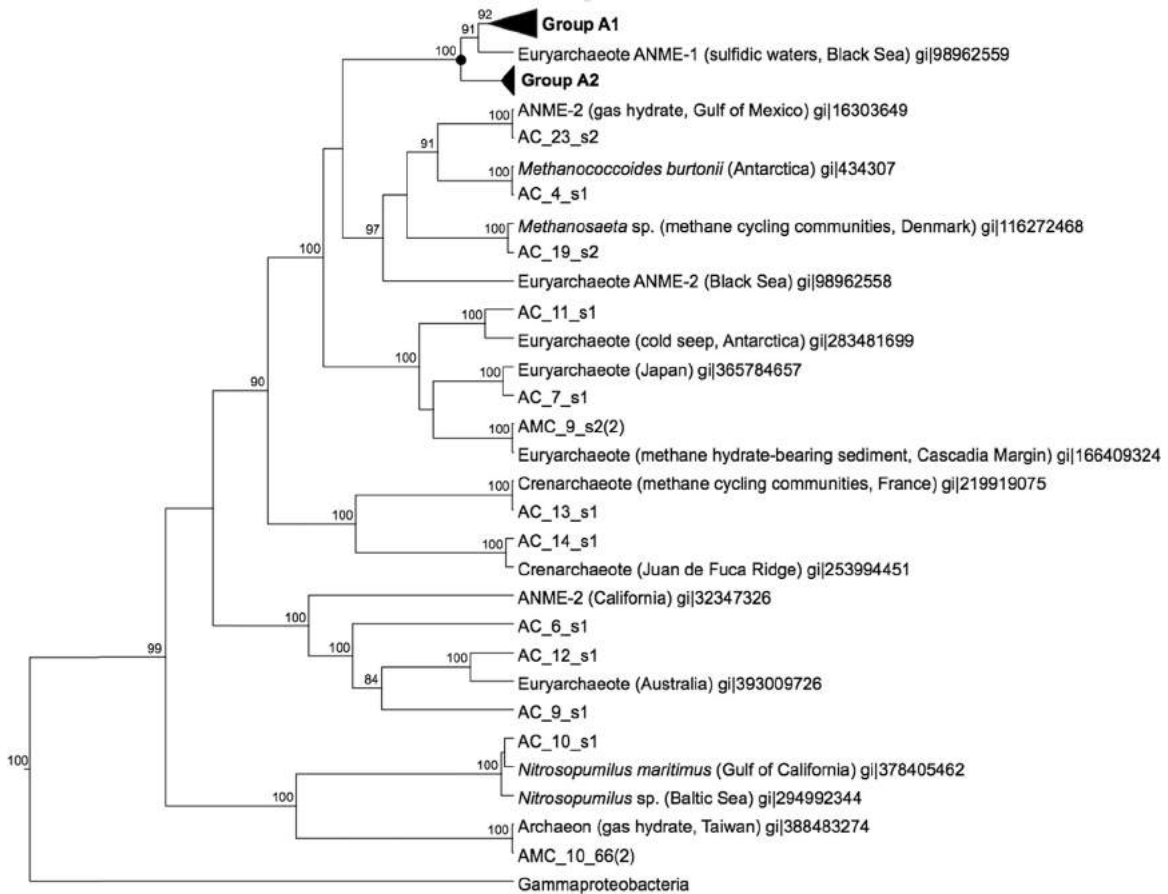
The 16S rRNA phylogenies of archaeal and bacterial clones obtained at our study site supported the conclusion that the microbial community present in this pockmark exhibits very high-diversity, and comprises many distinct evolutionary lineages (Figs. 3 and 4). A prevalent pattern that emerged from our data set

**Table 1**  
Sets of primers used in this study and the respective number of clones generated.

	Archaea reads	Bacteria reads	Total
Archaeal primer set	112	11	123
Universal primer set	76	101	177
Total	188	112	300



**Fig. 2.** Phylum-level identification of Archaea and Bacteria in sediment samples collected with PC49 within the analyzed pockmark. Each graph depicts the microbial community sampled at a different depth: (A) sample s1 (0 cm, i.e. sample at the seafloor); (B) sample s2 (100 cm below the seafloor). Phyla are listed in order of abundance.



**Fig. 3.** Phylogenetic relationships among the 179 archaeal clones found in the present study and 20 additional sequences retrieved from GenBank, based on 282 bp of 16S ribosomal RNA. Clones were designated 'x\_y\_z(n)' where 'x' indicates whether the sequence is a single clone (AC) or a multi-clone (AMC) (*i.e.* multiple identical sequences collapsed under the same entry); 'y' is the clone's identification number; and 'z' identifies the sediment sample ('s1' or 's2') in which it was found; the number in parentheses (*n*), when present, indicates the number of included identical clones. Values above branches indicate bootstrap support. Groups A1 and A2 represent sets of closely related sequences that were consistently reconstructed as monophyletic groups (see text for details).

was the strong placement (supported by high clade posterior probabilities) of microbial lineages from our study site as sister-groups (or at least close relatives) of prokaryotes sampled at distant locations in the world's oceans, in many cases consisting of deep-sea sediments associated with cold seeps and/or gas hydrates.

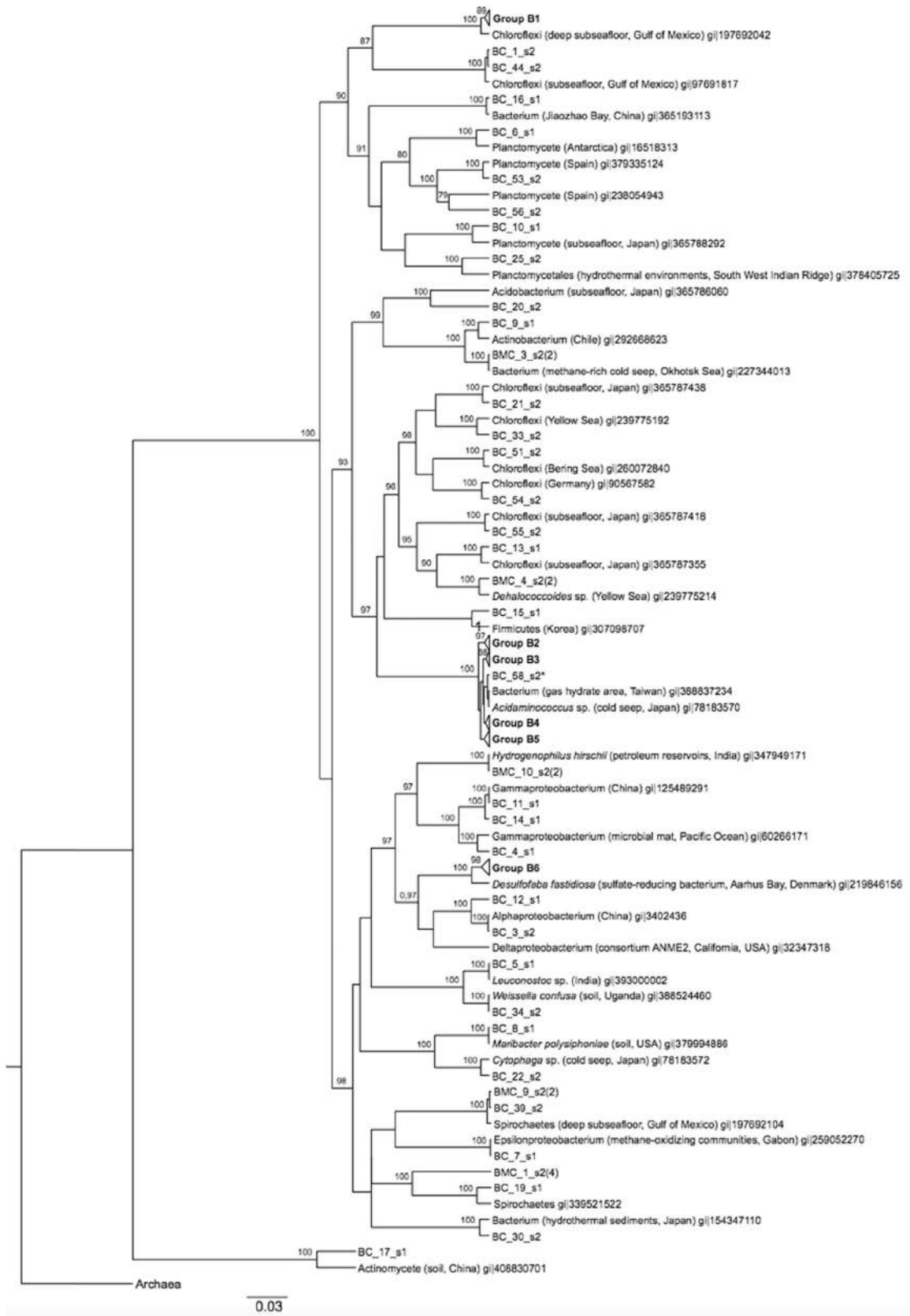
When the relationships among Archaea clones were assessed (Fig. 3), a predominance of lineages related to ANME sequences was very clear. A strongly supported group (termed 'Group A1') contained 147 of our clones, along with two sequences retrieved from GenBank, which had been classified as ANME-1 (sampled in the Gulf of Mexico) and ANME-X5 (sampled in the Gulf of Cadiz), respectively (see Supplementary information for details). The sister-lineage of Group A1 was another ANME-1 sequence, sampled in the Black Sea (see Fig. 3). Their joint ancestor was in turn the sister-lineage of another clade (named 'Group A2' here), which contained 17 of our clones along with two GenBank entries, both of which had been classified as ANME-1 (one from the Black Sea and the other from the Gabon continental margin; see Supplementary information). Given these strong relationships, we conclude that this whole clade represents ANME-1, which is therefore supported as a monophyletic lineage (Fig. 3), in agreement with the trees previously reported by Lanoil et al. (2005) and Knittel and Boetius (2009).

In addition to the abundant ANME-1 sequences, our phylogeny also revealed the presence of clones related to ANME-2 and ANME-3 at our study site. One of our clones (AC\_23\_s2) was very closely related to an ANME-2 sequence from a gas-hydrate bearing

area in the Gulf of Mexico, and several others were also related (albeit more distantly) to different ANME-2 entries (Fig. 3). In contrast to the monophyly of ANME-1, or results strongly supported the interpretation that ANME-2 is not monophyletic, suggesting that a revision of this nomenclature system may be needed. Finally, one of our clones (AC\_4\_s1) was a very close relative of *Methanococcoides*, a genus that has been reported as related to ANME-3 (Knittel and Boetius, 2009). Overall, these results indicate that most of our Archaea clones bear evolutionary relationships with ANME sequences sampled at various locations in different oceans, in some cases being very close (implying a very recent common ancestor) and others more distant (implying older divergences). As a whole, the observed pattern supports the view that ANME-related clones dominate the Archaea community at our study site.

In the case of clones belonging to other groups of Archaea (Crenarchaeota and Thaumarchaeota), we also observed a similar pattern, with our sequences being closely related to GenBank entries sampled at distant locations. For example, this was the case of the clone AC\_10\_s1, whose closest relatives were *Nitrosopumilus* sequences sampled in the Baltic Sea and in the Gulf of California (see Fig. 3).

The phylogeny of clones classified as Bacteria revealed a very similar pattern. The sequences sampled at our study site represented at least 30 different lineages, each of which was strongly related to GenBank sequences sampled at distant locations (Fig. 4). Most of these GenBank entries derived from microbes sampled in marine sediments, many of which were



**Fig. 4.** Phylogenetic relationships among the 109 bacterial clones identified in this study, along with 31 additional sequences retrieved from GenBank, based on 303 bp of 16S ribosomal RNA. Clones were designated 'x<sub>y</sub>z(n)' where 'x' indicates whether the sequence is a single clone (BC) or a multi-clone (BMC) (i.e. multiple identical sequences collapsed under the same entry); 'y' is the clone's identification number; and 'z' identifies the sediment sample ('s1' or 's2') in which it was found; the number in parentheses (n), when present, indicates the number of included identical clones. Values above branches indicate the posterior probability of the adjacent node. Groups B1–B5 represent sets of sequences with high internal similarity, high-support, and clear relationships towards known bacterial taxa; these groups were collapsed for simpler visualization.

ecologically similar to our study site (e.g. cold seeps or hydrothermal communities). An interesting example was a strongly supported clade named 'Group B6' (see Fig. 4), which contained 23 of our clones along with two GenBank entries classified as Deltaproteobacteria sampled in cold seeps from the Gulf of Mexico (see Supplementary information). This clade was, in turn, strongly related with *Desulfofaba fastidiosa*, a sulfate reducer sampled in Aarhus Bay, Denmark. Such a relationship suggests that the whole lineage comprises sulfate-reducing Deltaproteobacteria, an interesting finding given the relevance of microbes with this type of metabolism as the bacterial partner in the AOM consortium.

### 3.6. Characterization of the pockmark fauna

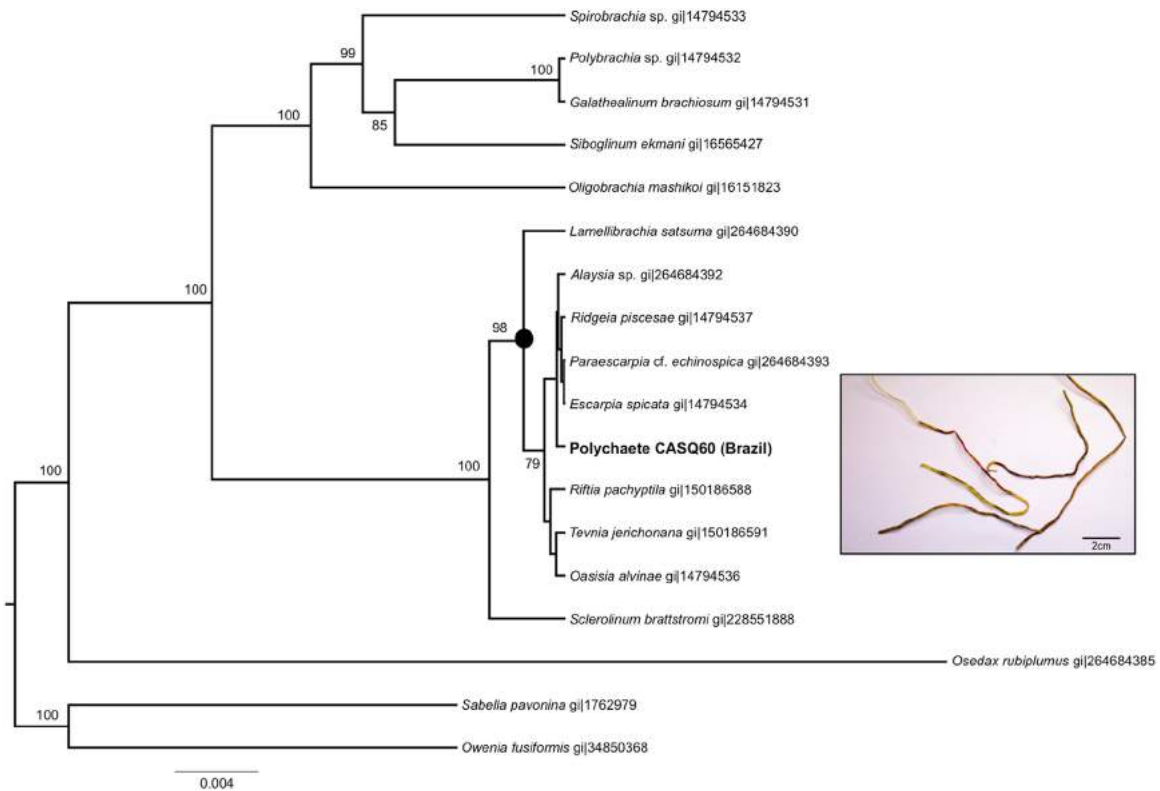
Images of the seafloor within the pockmark, obtained with the AUV, revealed the presence of various benthic animals occurring at this location. In particular, there were multiple sites within the pockmark where substantial clusters of tubeworms (polychaete annelids) could be observed (Fig. 1). A fragment of mineralized tube from this polychaete species was found in the sediment collected with PC44, but no diagnostic structure or living tissue could be retrieved, precluding its more detailed identification.

However, the sediment samples collected with PC44 and with CASQ60 also contained a distinct form of polychaete worm (Fig. 5), which was much more slender and flexible than the one identified in the images. From one of these specimens, collected with CASQ60, we could retrieve a reddish fluid from within the tube, which was used to extract DNA and to perform molecular identification of the worm. Phylogenetic analyses based on a 804-bp segment of the 18S rRNA gene demonstrated that it was a polychaete from the family Siboglinidae, and strongly placed within the 'Vestimentifera' clade, which contains genera such as *Riftia* and

*Escarpia* (Fig. 5). The DNA segment we analyzed did not allow resolution among the genera contained in this clade, but clearly supported the distinctiveness of the four main siboglinid lineages, each of which is adapted to a different type of habitat (Hilário et al., 2011a). The vestimentiferan clade comprises genera that are vent and seep specialists and contain endosymbiotic chemoautotrophic bacteria (Tunnicliffe et al. 2003; Hilário et al., 2011a). The strong phylogenetic placement of our sample in this clade suggests that this species is also adapted to the same lifestyle, and supports the inference that chemosynthesis is an important component of this community.

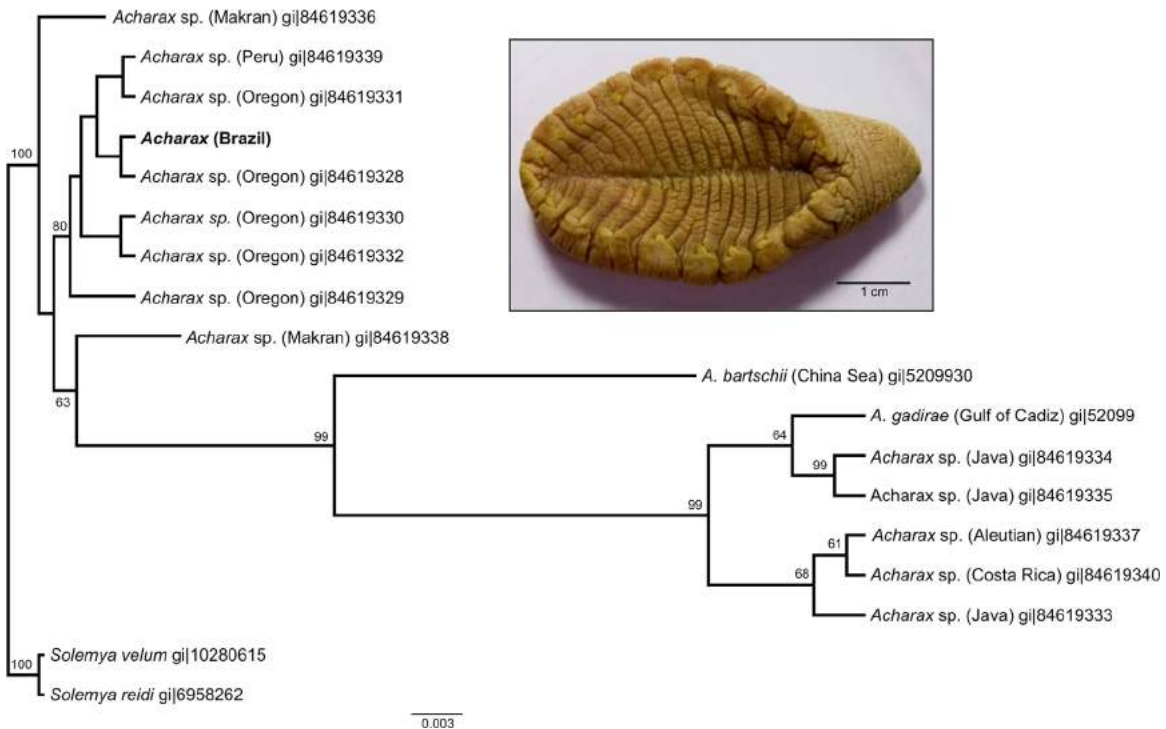
In addition to the tubeworms, a tissue fragment (subsequently identified as the foot) from a large bivalve mollusk was also collected at the study site (Fig. 6). This fragment was retrieved from the bottom portion of PC44 and very fresh, indicating that it had been severed from the animal upon the penetration of the piston core. A 1213-bp segment of the 18S gene was sequenced from this specimen and used in phylogenetic analyses (see Fig. 6), revealing that it belonged to the genus *Acharax* (family Solemyidae), another typical component of faunas present in cold seep and hydrothermal vent areas (Sahling et al., 2002). Representatives of this genus generally inhabit minimum depths of 400 m in regions rich in methane gas, and have a symbiotic relationship with chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria (Neulinger et al., 2006), as well as complex interactions with other animals (e.g. Ravara et al., 2007).

To further investigate the evolutionary relationships of our *Acharax* specimen, we assessed its phylogenetic position relative to all 18S sequences available for this genus (see Fig. 6). This included the sequences reported by Neulinger et al. (2006) and by Sharma et al. (2013), which derive from specimens collected at multiple sites in the Indo-Pacific region and one site in the northeastern



**Fig. 5.** Molecular identification of a tubeworm collected with CASQ60 (see Fig. 1) within the pockmark analyzed in this study. The inset shows an image of the specimen from which DNA was obtained. The phylogenetic tree depicting the relationships of this specimen (*Polychaete\_CASQ60\_Brazil*, shown in bold) to other polychaetes was inferred with the Bayesian approach implemented in BEAST, with clade posterior probabilities shown next to the respective nodes. The black circle indicates the node defining the 'vestimentiferan' clade of siboglinid polychaetes, which comprises specialists in vent and seep environments.





**Fig. 6.** Molecular identification of the bivalve tissue sample collected with PC44 (see Fig. 1) within the pockmark analyzed in this study. The inset shows an image of the specimen (terminal fragment of the specimen's foot) from which DNA was obtained.

Atlantic Ocean. Neulinger et al. (2006), in a phylogenetic study of solemyid bivalves from different regions of the Pacific and Indian oceans, identified the existence of two distinct groups of *Acharax*, which they named MOP (Makran, Oregon, and Peru) and JAC (Java, Aleutian Trench, and Costa Rica). Sharma et al. (2013), in the context of a broad phylogenetic analysis of protobranch bivalves, reported two additional 18S sequences, corresponding to *Acharax bartschii*, collected in the Philippines (South China sea), and the recently described *Acharax gadirae* (Oliver et al., 2011), collected in the Gulf of Cadiz, NE Atlantic.

Our results (Fig. 6) supported the distinction of the two main *Acharax* groups reported by Neulinger et al. (2006), and suggested (albeit with inconclusive posterior probability) that the MOP cluster is paraphyletic with respect to the nested (and monophyletic) JAC group. The very long branch leading to JAC is quite remarkable, indicating an accelerated rate of evolution of the 18S gene in this clade. Both the paraphyly of MOP and the long branch leading to JAC were already discernible in the tree reported by Neulinger et al. (2006), which is consistent with our reconstruction. Our analysis demonstrates that the specimen collected at our study site in Brazil is closely related to sequences belonging to the MOP group, while the other sample collected in the Atlantic (Gulf of Cadiz) is strongly placed in the JAC clade. Furthermore, we observed that the sample from the Philippines (*A. bartschii*) is more closely related to the JAC group than to MOP (as pointed out by Sharma et al. (2013)), but presents considerable divergence from the former, suggesting that it could represent a third major lineage in this genus. Overall, the results obtained here indicate an absence of clear-cut geographic structure in the phylogeny of *Acharax*, with both the MOP and JAC clusters being present in the Indo-Pacific as well as the Atlantic Ocean. This lack of geographic pattern, along with the inferred difference in evolutionary rate between the two groups, suggest that they are likely divergent in their physiology and/or life history, possibly comprising distinct evolutionary lineages that independently reach and colonize distant locations across the world's oceans. Testing this hypothesis

with the use of additional genes, combined with expanded data on their morphology, physiology and symbiont microbes, should open up interesting avenues to better understand the history of their adaptation to these unique habitats.

#### 4. Conclusions

We employed multiple approaches and complementary lines of evidence to demonstrate the occurrence of a chemosynthesis-based community within a deep-sea pockmark off the coast of southern Brazil. The physical aspect of the pockmark and the geochemical evidence we report here demonstrate that gas seepage occurs at this site, strongly affecting its structure and compositional dynamics. The biotic community we identified at the site contains several elements that are typical of cold-seeps, such as an abundance of Archaea related to ANME groups, and the presence of multiple bacterial lineages that are closely related to microbes found elsewhere in the world in similar geochemical settings. Furthermore, our molecular data also demonstrate the presence in this community of two metazoan lineages (a vestimentiferan siboglinid and the bivalve *Acharax*) that are typical of deep-sea chemosynthetic communities, and specialists in this type of habitat. As a whole, the presence of these organisms strongly indicates that chemosynthesis occurs at the site, and forms the basis for its local biotic community. In addition, our phylogenetic analyses revealed that, for both the microbial and animal lineages analyzed here, local representatives were related to specimens previously sampled at geographically distant chemosynthetic sites. This pattern supports the view that global circulation allows the colonization of this type of habitat by lineages that are already adapted to exploit its resources, leading to the assembly of a diverse and complex community of microbes, associated with highly specialized metazoans. The understanding of this colonization process, as well as of the functional dynamics of these communities, are still in their infancy, and will benefit from in-depth

comparative studies targeting multiple sites across the world's oceans.

## Acknowledgments

The authors thank PETROBRAS for sponsoring this research and for the permission to publish this paper. João M.M. Ketzer and Eduardo Eizirik acknowledge support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). We also thank two anonymous reviewers for their helpful and constructive comments on an earlier version of this manuscript.

## References

- Arakawa, S., Sato, T., Sato, R., Zhang, J., Gamo, T., Tsunogai, U., Hirota, A., Yoshida, Y., Usami, R., Inagaki, F., Kato, C., 2006. Molecular phylogenetic and chemical analyses of the microbial mats in deep-sea cold seep sediments at the north-eastern Japan Sea. *Extremophiles* 10, 311–319.
- Arvidson, R.S., Morse, J.W., Joye, S.B., 2004. The sulfur biogeochemistry of chemosynthetic cold seep communities, Gulf of Mexico, USA. *Mar. Chem.* 87, 97–119.
- Baco, A.R., Rowden, A.A., Levin, L.A., Smith, C.R., Bowden, D.A., 2010. Initial characterization of cold seep faunal communities on the New Zealand Hikurangi margin. *Mar. Geol.* 272, 251–259.
- Barry, J.P., Buck, K.R., Goffredi, S.K., Hashimoto, J., 2000. Ultrastructure studies of two chemosynthetic invertebrate-bacterial symbiosis (*Lamellibrachia* sp. and *Acharax* sp.) from Hatsushima cold seeps in Sagami Bay, Japan. *Deep-Sea Res. PT II* 16, 91–99.
- Bates, S.T., Berg-Lyons, D., Caporaso, J.G., Walters, W.A., Knights, R., Fierer, N., 2010. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J.* 1–10.
- Bayon, G., Dupré, S., Ponzevera, E., Etoubleau, J., Chéron, S., Pierre, C., Mascle, J., Boetius, A., de Lange, G.J., 2013. Formation of carbonate chimneys in the Mediterranean Sea linked to deep-water oxygen depletion. *Nat. Geosci.* 6, 755–760.
- Bedard, D.L., Ritalahti, K.M., Löffler, F.E., 2007. The *Dehalococcoides* population in sediment-free mixed cultures metabolically dechlorinates the commercial polychlorinated biphenol mixture Aroclor 1260. *Appl. Environ. Microb.* 73, 2513–2521.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Giesecke, A., Amann, R., Jørgensen, B., Witte, U., Pfannkuche, O., 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* 407, 623–626.
- Breland, J.A., Byrne, R.H., 1993. Spectrophotometric procedures for determination of seawater alkalinity using bromocresol green. *Deep-Sea Res. PT I* 40, 629–641.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., Forterre, P., 2008. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 245–252.
- Burgin, A.J., Yang, W.H., Hamilton, S.K., Silver, W.L., 2011. Beyond carbon and nitrogen: how the microbial energy economy couples elemental cycles in diverse ecosystems. *Front. Ecol. Environ.* 9, 44–52.
- Cambon-Bonavita, M.A., Nadalig, T., Roussel, E., Delage, E., Duperron, S., Caprais, J., Boetius, A., Sibuet, M., 2009. Diversity and distribution of methane-oxidizing microbial communities associated with different faunal assemblages in a giant pockmark of the Gabon continental margin. *Deep-Sea Res. PT II* 56, 2248–2258.
- Clenell, M.B., 2000. Hidrato de gás submarino: natureza, ocorrência e perspectivas para exploração na margem continental brasileira. *Braz. J. Geophys.* 18, 397–409.
- Cordes, E.E., Cunha, M.R., Galeron, J., Mora, C., Olu-Le Roy, K., Sibuet, M., Van Gaever, S., Vanreusel, A., Levin, L.A., 2010. The influence of geological, geochemical, and biogenic habitat heterogeneity on seep biodiversity. *Mar. Ecol.* 31, 51–65.
- Das, A., Sujith, P.P., Mourya, B.S., Biche, S.U., LokaBharathi, P.A., 2011. Chemosynthetic activity prevails in deep-sea sediments of the Central India Basin. *Extremophiles* 15, 177–189.
- D'Hondt, S.L., Jørgensen, B.B., Miller, D.J. et al., 2003. In: *Proceedings of the Ocean Drilling Program. Initial Reports. Volume 201*. doi:10.2973/odp.proc.ir.201.2003.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969–1973.
- Evans, W.H., Partridge, B.F., 1974. Determination of ammonia levels in water and wastewater with an ammonia probe. *Analyst* 99, 367–375.
- Fontana, R.L., Mussumeci, A., 1994. Hydrates offshore Brazil. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 715, 106–113.
- Franzmann, P.D., Springer, N., Ludwig, W., de Macario, E., Conway, R., 1992. A methanogenic archaeon from Ace Lake, Antarctica: *Methanococcoides burtonii* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 573–581.
- Genio, L., Johnson, S.B., Vrijenhoek, R.C., Cunha, M.R., Tyler, P., et al., 2008. New record of *Bathymodiolus mauritanicus* Cosel 2002 from the Gulf of Cadiz (NE Atlantic) mud volcanoes. *J. Shellfish Res.* 27, 53–61.
- German, C.R., Ramirez-Llodra, E., Baker, M.C., Tyler, P.A., ChEss Scientific Steering Committee, 2011. Deep-water chemosynthetic ecosystem research during the census of marine life decade and beyond: a proposed deep-ocean road map. *PLoS One* 6, e23259.
- Gilbert, T.R., Clay, A.M., 1973. Determination of ammonia in aquaria and in sea water using the ammonia electrode. *Anal. Chem.* 45, 1757–1759.
- Giongo, A., Crabb, D.B., Davis-Richardson, A.G., Chauillac, D., Moberley, J.M., Gano, K.A., Mukherjee, N., Roesch, L.F.W., Walts, B., Riva, A., King, G., Casella, G., Triplett, E.W., 2010a. PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons. *ISME J.* 4, 852–861.
- Giongo, A., Davis-Richardson, A.G., Crabb, D.B., Triplett, E.W., 2010b. Tax collector: tools to modify existing 16S rRNA databases for the rapid classification at six taxonomic levels. *Diversity* 2, 1015–1025.
- Hilário, A., Capa, M., Dahlgren, T.G., Halanych, K.M., Little, C.T.S., Thornhill, D.J., Verna, C., Glover, A.G., 2011a. New perspectives on the ecology and evolution of siboglinid tubeworms. *PLoS One* 6, e16309.
- Hilário, A., Comas, M.C., Azevedo, L., Pinheiro, L., Ivanov, M.K., Cunha, M.R., 2011b. First record of a Vestimentifera (Polychaeta: Siboglinidae) from chemosynthetic habitats in the western Mediterranean Sea – biogeographical implications and future exploration. *Deep-Sea Res. PT I* 58, 200–207.
- Hong, S.H., Bunge, J., Jeon, S.O., Epstein, S.S., 2006. Predicting microbial species richness. *PNAS* 103, 117–122.
- Hornbach, M.J., Ruppel, C., Van Dover, C.L., 2007. Three-dimensional structure of fluid conduits sustaining an active deep marine cold seep. *Geophys. Res. Lett.* 34, L05601.
- Hovland, M., Gardner, J.V., Judd, A.G., 2002. The significance of pockmarks to understanding fluid flow processes and geohazards. *Geofluids* 2, 127–136.
- Imachi, H., Aoi, K., Tasumi, E., Saito, Y., Yamanaka, Y., Saito, Y., Yamaguchi, T., Tomaru, H., Takeuchi, R., Morono, Y., Inagaki, F., Takai, K., 2011. Cultivation of methanogenic community from subsurface sediments using a continuous-flow bioreactor. *ISME J.* 5, 1913–1925.
- Imhoff, J.F., Sahling, H., Suling, J., Kath, T., 2003. 16S rDNA-based phylogeny of sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts in marine bivalves from cold-seeps environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249, 39–51.
- Jørgensen, B.B., Boetius, A., 2007. Feast and famine – microbial life in the deep-sea bed. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 770–781.
- Kalanetra, K.M., Joye, S.B., Sunseri, N.R., Nelson, D.C., 2005. Novel vacuolate sulfur bacteria from the Gulf of Mexico reproduce by reductive division in three dimensions. *Environ. Microbiol.* 7, 1451–1460.
- Kaster, A.K., Mayer-Blackwell, K., Pasarelli, B., Spormann, A.M., 2014. Single cell genomic study of Dehalococcoides species from deep-sea sediments of the Peruvian Margin. *ISME J.* 8, 1831–1842.
- Knittel, K., Boetius, A., Lemke, A., Eilers, H., Locht, K., Pfannkuche, O., Linke, P., Amann, R., 2003. Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia Margin, Oregon). *Geomicrobiol. J.* 20, 269–294.
- Knittel, K., Losekann, T., Boetius, A., Kort, R., Amann, R., 2005. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 467–479.
- Knittel, K., Boetius, A., 2009. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Ann. Rev. Microbiol.* 63, 311–334.
- Koretsky, C.M., Haveman, M., Cuellar, A., Beuving, L., Shattuck, T., Wagner, M., 2008. Influence of *Spartina* and *Juncus* on saltmarsh sediments. I. Pore water geochemistry. *Chem. Geol.* 255, 87–99.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5, 150–163.
- Lanoil, B.D., LaDuc, M.T., Wright, M., Kastner, M., Nealson, K.H., Bartlett, D., 2005. Archaeal diversity in ODP legacy borehole892b and associated seawater and sediments of the cascadia margin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 167–177.
- Levin, L.A., 2005. Ecology of cold seep sediments: interactions of fauna with flow, chemistry and microbes. *Oceanogr. Mar. Biol.* 43, 1–46.
- Losekann, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., Amann, R., 2007. Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3348–3382.
- May, W.E., Chesler, S.N., Cram, S.P., Gump, B.H., Hertz, H.S., Enagonio, D.P., Dyszel, S.M., 1975. Chromatographic analysis of hydrocarbons in marine sediments and sea water. *J. Chromatogr. Sci.* 13, 535–540.
- Maymo-Gatell, X., Chien, Y., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* 276, 1568–1571.
- Metcalfe, W.W., Griffin, B.M., Chicchillo, R.M., Gao, J., Janga, S.C., Cooke, H.A., Circello, B.T., Evans, B.S., Martens-Habbena, W., Stahl, D.A., van der Donk, W.A., 2012. Synthesis of methylphosphonic acid by marine microbes: a source for methane in the aerobic. *Ocean Sci.* 337, 1104–1107.
- Miller, D.J., Ketzer, J.M., Viana, A.R., Kowsmann, R.O., Freire, A.F., Oreiro, S.G., Augustin, A.H., Lourega, R.V., Rodrigues, L.F., Heemann, R., Preissler, A.G., Machado, C.X., Sbrissa, G.F., 2015. Natural gas hydrates in the Rio Grande Cone (Brazil): a new province in the western South Atlantic. *Mar. Pet. Geol.* 67, 187–196.
- Milucka, J., Ferdelman, T.G., Polerecky, L., Franzke, D., Wegener, G., Schmid, M., Lieberwirth, I., Wagner, M., Widdel, F., Kuyper, M.M.M., 2012. Zero-valent sulphur is a key intermediate in marine methane oxidation. *Nature* 491, 541–546.
- Mochizuki, K., Takabe, S., Goda, T., 2008. Changes on histone H3 modifications on the GLUT5 gene and its expression in Caco-2 cells co-treated with a p44/42 MAPK inhibitor and glucocorticoid hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 324–327.

- Neulinger, S.C., Sahling, H., Süling, J., Imhoff, J.F., 2006. Presence of two phylogenetically distinct groups in the deep-sea mussel *Acharax* (Mollusca: Bivalvia: Solemyidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 312, 161–168.
- Nunoura, T., Inagaki, F., Delwiche, M.E., Colwell, F.S., Takai, K., 2008. Subseafloor microbial communities in methane hydrate-bearing sediment at two distinct locations (ODL Leg204) in the Cascadia Margin. *Microbes Environ.* 23, 317–325.
- Nunoura, T., Hirai, M., Miyazaki, M., Kazama, H., Makita, H., Hirayama, H., Furushima, Y., Yamamoto, H., Imachi, H., Takai, K., 2013. Isolation and characterization of a thermophilic, obligately anaerobic and heterotrophic marine Chloroflexi bacterium from a Chloroflexi-dominated microbial community associated with a Japanese shallow hydrothermal system, and proposal for *Thermomarinilinea lacunofontalis* gen. nov., sp. nov. *Microbes Environ.* 28, 228–235.
- Oliveira, S., Vilhena, O., da Costa, E., 2010. Time–frequency spectral signature of Pelotas Basin deep water gas hydrates system. *Mar. Geophys. Res.* 31, 89–97.
- Oliver, G., Rodrigues, C.F., Cunha, M.R., 2011. Chemosymbiotic bivalves from the mud volcanoes of the Gulf of Cadiz, NE Atlantic, with descriptions of new species of Solemyidae, Lucinidae Vesicomidae. *ZooKeys* 113, 1–38.
- Olu, K., Duperré, A., Sibuet, M., Foucher, J.P., Fiala-Medioni, A., 1996a. Structure and distribution of cold seep communities along the Peruvian active margin: relationship to geological and fluid patterns. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 132, 109–125.
- Olu, K., Sibuet, M., Harmegnies, F., Foucher, J.P., Fiala-Medione, A., 1996b. Spatial distribution of diverse cold seep communities living on various diapiric structures of the southern Barbados prism. *Prog. Oceanogr.* 38, 347–376.
- Olu, K., Lance, S., Sibuet, M., Henry, P., Fiala-Medioni, A., et al., 1997. Cold seep communities as indicators of fluid expulsion patterns through mud volcanoes seaward of the Barbados accretionary prism. *Deep-Sea Res. PT I* 44, 811–841.
- Olu, K., Cordes, E.E., Fisher, C.R., Brooks, J.M., Sibuet, M., Desbruyères, D., 2010. Biogeography and potential exchanges among the Atlantic Equatorial belt cold-seep faunas. *PLoS One* 5, e11967.
- Ondreas, H., Olu, K., Fouquet, Y., Charlou, J.L., Gay, A., Dennielou, B., Donval, J.P., Fifis, A., Nadalig, T., Cochon, P., Cauquil, E., Bourillet, J.F., Le Moigne, M., Sibuet, M., 2005. ROV study of a giant pockmark on the Gabon continental margin. *Geo-Mar. Lett.* 25, 281–292.
- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.U., McKeegan, K.D., DeLong, E.F., 2001. Methane-consuming Archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science* 293, 484–487.
- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.U., McKeegan, K.D., DeLong, E.F., 2002. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *PNAS* 99, 7663–7668.
- Paull, C.K., Hecker, B., Commeau, R., Freeman-Lynde, R.P., Neumann, C., Corso, W.P., Golubic, S., Hook, J.E., Sikes, E., Curran, J., 1984. Biological communities at the Florida escarpment resemble hydrothermal vent taxa. *Science* 226, 965–967.
- Pimmel, A., Claypool, G., 2001. Introduction to shipboard organic geochemistry on the JOIDES Resolution. ODP Technical Note, 30. Available at: <http://www-odp.tamu.edu/publications/tnotes/tn30/INDEX.HTM>.
- Pohlman, J.W., Ruppel, C., Hutchinson, D.R., Downer, R., Coffin, R.B., 2008. Assessing sulfate reduction and methane cycling in a high salinity pore water system in the northern Gulf of Mexico. *Mar. Pet. Geol.* 25, 942–951.
- Portnova, D., Mokievsky, V., Soltwedel, T., 2011. Nematode species distribution patterns at the Hakon Mosby Mud Volcano (Norwegian Sea). *Mar. Ecol.* 32, 24–41.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256.
- Ravara, A., Cunha, M.R., Rodrigues, C.F., 2007. The occurrence of *Natsushima bifurcata* (Polychaeta: Nautiliiniellidae) in *Acharax* hosts from mud volcanoes in the Gulf of Cadiz (south Iberian and north Moroccan margins). *Sci. Mar.* 71, 95–100.
- Radionov, D.A., Dubchak, I., Arkin, A., Alm, R., Gelfand, M.S., 2004. Reconstruction of regulatory and metabolic pathways in metal-reducing  $\delta$ -proteobacteria. *Genome Biol.* 5, R90.
- Raiswell, R., 1988. Chemical model for the origin of minor limestone–shale cycles by anaerobic methane oxidation. *Geology* 16, 641–644.
- Reed, A.J., Lutz, R.A., Vetriani, C., 2006. Vertical distribution and diversity of bacteria and archaea in sulfide and methane-rich cold seep sediments located at the base of the Florida Escarpment. *Extremophiles* 10, 199–211.
- Rodrigues, C.F., Webster, G., Cunha, M.R., Duperré, S., Weightman, A.J., 2010. Chemosynthetic bacteria found in bivalve species from mud volcanoes of the Gulf of Cadiz. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 486–499.
- Sad, A.R.E., Silveira, D.P., Machado, D.A.P., Silva, S.R.P., Maciel, R.R., 1998. Marine gas hydrates evidence along the Brazilian coast. In: *Proceedings of AAPG International Conference and Exhibition. Rio de Janeiro, Brazil. November 8–11, CD-Rom.*
- Sahling, H., Rickert, D., Lee, R.W., Linke, P., Suess, E., 2002. Macrofaunal structure and sulfide flux at gas hydrate deposits from the Cascadia convergent margin, NE Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 231, 121–138.
- Sassen, R., Roberts, H.H., Carney, R., Milkov, A.V., DeFreitas, D.A., Lanoil, B., Zhang, C., 2004. Free hydrocarbon gas, gas hydrate, and authigenic minerals in chemosynthetic communities of the northern Gulf of Mexico continental slope: relations to microbial processes. *Chem. Geol.* 205, 195–217.
- Schubert, C.J., Coolen, M.J.L., Neretin, L.N., Schippers, A., Abbas, B., Durisch-Kaiser, E., Wehrli, B., Hopmans, E.C., Damste, J.S.S., Wakeham, S., Kuypers, M.M.M., 2006. Aerobic and anaerobic methanotrophs in the Black Sea water column. *Environ. Microbiol.* 8, 1844–1856.
- Sellanes, J., Quiroga, E., Gallardo, V.A., 2004. First direct evidence of methane seepage and associated chemosynthetic communities in the bathyal zone off Chile. *J. Mar. Biol. Assoc.* 84, 1065–1066, U.K.
- Sharma, P.P., Zardus, J.D., Boyle, E.E., Gonzalez, V.L., Jennings, R.M., McIntyre, E., Wheeler, W.C., Etter, R.J., Giribet, G., 2013. Into the deep: a phylogenetic approach to the bivalve subclass Protobranchia. *Mol. Phylogenet. Evol.* 69, 188–204.
- Sibuet, M., Olu, K., 1998. Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins. *Deep-Sea Res. PT II* 45, 517–567.
- Sibuet, M., Vangriesheim, A., 2009. Deep-sea environment and biodiversity of the West African Equatorial margin. *Deep-Sea Res. PT II* 56, 2156–2168.
- Snow, N.H., 2002. Head-space analysis in modern gas chromatography. *Trends Anal. Chem.* 21, 608–617.
- Snyder, G.T., Hiruta, A., Matsumot, R., Dickens, G.R., Tomaru, H., Takeuchi, R., Komatsubara, J., Ishida, Y., Yu, H., 2007. Pore water profiles and authigenic mineralization in shallow marine sediments above the methane-charged system on Umitaka Spur, Japan Sea. *Deep-Sea Res. II* 54, 1216–1239.
- Sumida, P.Y.G., Yoshinaga, M.Y., Madureira, L.A.S.P., Hovland, M., 2004. Seabed pockmarks associated with deep water corals off SE Brazilian continental slope Santos Basin. *Mar. Geol.* 207, 159–167.
- Takai, K., Horikoshi, K., 2000. Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5066–5072.
- Tomasini, J., SantaAna, H., Conti, B., Ferro, S., Gristo, P., Marmisolle, J., Morales, E., Rodriguez, P., Soto, M., Veroslavsky, G., 2011. Assessment of marine gas hydrates and associated free gas distribution offshore Uruguay. *J. Geol. Res.* 2011, 1–7.
- Treude, T., Boetius, A., Knittel, K., Wallmann, K., Jørgensen, B.B., 2003. Anaerobic oxidation of methane above gas hydrates at Hydrate Ridge, NE Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 264, 1–14.
- Tunncliffe, V., Juniper, S.K., Sibuet, M., 2003. Reducing environments of the deep-sea floor. In: Tyler, P.A. (Ed.), *Ecosystems of the World: The Deep Sea*. Elsevier Press, Amsterdam, pp. 81–110.
- Urich, T., Lanzén, A., Stokke, R., Pedersen, R.B., Bayer, C., Thorseth, I.H., Schleper, C., Steen, I.H., Ovreas, L., 2014. Microbial community structure and functioning in marine sediments associated with diffuse hydrothermal venting assessed by integrated meta-omics. *Environ. Microbiol.* 16, 2699–2710.
- Van Gaever, S., Olu, K., Derycke, S., Vanreusel, A., 2009a. Metazoan meiofaunal communities at cold seeps along the Norwegian margin: influence of habitat heterogeneity and evidence for connection with shallow-water habitats. *Deep-Sea Res. PT I* 56, 772–785.
- Van Gaever, S., Galéron, J., Sibuet, M., Vanreusel, A., 2009b. Deep-Sea habitat heterogeneity influence on meiofaunal communities in the Gulf of Guinea. *Deep-Sea Res. II* 56, 2259–2269.
- Valentine, D.L., 2002. Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 271–282.
- Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J.C., Cambon-Bonavita, M.A., Godfroy, A., Toffin, L., 2013a. Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). *ISME J.* 7, 1595–1608.
- Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J.C., Gayet, N., Cambon-Bonavita, M.A., Godfroy, A., Toffin, L., 2013b. Bacterial communities and syntrophic associations involved in anaerobic oxidation of methane process of the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin. *Environ. Microbiol.* 16, 2777–2790.
- Xinping, H., Cai, W.J., Wang, Y., Luo, S., Guo, X., 2010. Pore-water geochemistry of two contrasting brine-charged seep sites in the northern Gulf of Mexico continental slope. *Mar. Chem.* 118, 99–107.
- Zhang, Y., Maignien, L., Zhao, X., Wang, F., Boon, N., 2011. Enrichment of a microbial community performing anaerobic oxidation of methane in a continuous high-pressure bioreactor. *BMC Microbiol.* 11, 137.