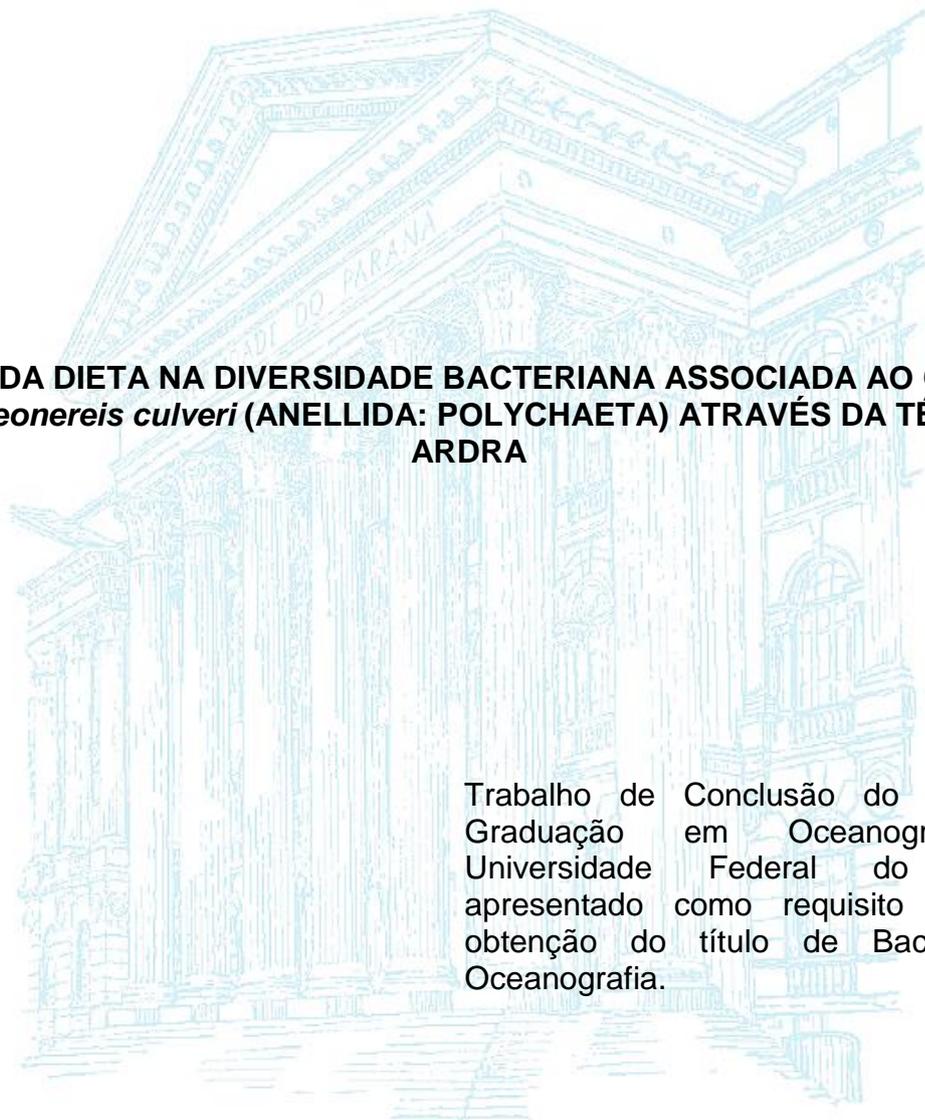


TAIS SERPA AFONSO



**EFEITO DA DIETA NA DIVERSIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AO CULTIVO
DE *Laeonereis culveri* (ANNELIDA: POLYCHAETA) ATRAVÉS DA TÉCNICA
ARDRA**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Oceanografia da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Oceanografia.

PONTAL DO PARANÁ

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CURSO DE OCEANOGRAFIA

TAIS SERPA AFONSO

**EFEITO DA DIETA NA DIVERSIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AO CULTIVO
DE *Laeonereis culveri* (ANELLIDA: POLYCHAETA) ATRAVÉS DA TÉCNICA
ARDRA**

PONTAL DO PARANÁ

2016



Aprovado pelo Orientador

TERMO DE APROVAÇÃO

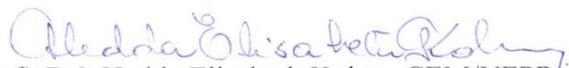
Taís Serpa Afonso

“Efeito da dieta na diversidade bacteriana associada ao cultivo de *Laeonereis culveri* Webster, 1879 (Anellida: Polychaeta) através da técnica ARDRA.”

Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



MSc. Daniele Priscila Conceição Hammer



Prof^a. Dr^a. Hedda Elisabeth Kolm - CEM/UFPR



Prof^a. Dr^a. Luciene Correa Lima - CEM/UFPR



Prof. Dr. Rodolfo Luis Petersen
Presidente

Pontal do Paraná, 15 de dezembro de 2016



Área de acuicultura/Area of aquaculture.

Efeito da dieta na diversidade bacteriana associada ao cultivo de *Laeonereis culveri* através da técnica ARDRA

Effect of diet on bacterial diversity associated with *Laeonereis culveri* cultivation through ARDRA

Afonso, T.S.¹; Conceição, D.P.¹ e Petersen, R.L.¹

¹Centro de Biologia Marinha. Universidade Federal do Paraná. Pontal do Paraná. Brasil.

rodolfopetersen@ufpr.br

Resumo

Os poliquetas são organismos bentônicos com hábito alimentar detritívoro pouco seletivo que se aloca nos sedimentos formando galerias. As bactérias bentônicas fazem parte do regime alimentar destes organismos. Com isso, o objetivo deste trabalho foi comparar a diversidade bacteriana entre três tratamentos alimentares durante um cultivo de *Laeonereis culveri*. As amostras de sedimento foram coletadas em um cultivo intensivo em sistemas de recirculação com um manejo alimentar composto de macroalgas, peixe e ração. As amostras foram retiradas aos dois, trinta e sessenta dias após o início do experimento. A extração de DNA foi realizada utilizando o Kit PowerSoil DNA isolation e à amplificação do gene 16S RNAr utilizando dois primers universais (V3 e V4) de acordo com o fabricante. Para a análise da diversidade bacteriana, o DNA amplificado foi digerido por três enzimas de restrição (Rsal, MspI e HaeIII). Os resultados mostraram a maior diversidade bacteriana, ao longo dos 60 dias de cultivo, na presença de matéria orgânica oriunda da decomposição do alimento fornecido como peixe fresco em relação aos outros dois tratamentos, possivelmente devido ao seu conteúdo de proteína bruta.

Palavras chave: Enzima de restrição, gene 16S, poliqueta, sedimento

Summary

Polychaetes are benthic organisms with little selective detritus feeding habit that are allocated in the sediments forming galleries. Benthic bacteria are part of the diet of these organisms. With this, the objective of this work was to observe and compare the bacterial diversity among three food treatments during a cultivation of *Laeonereis culveri*. The sediment samples were collected in an intensive culture in recirculation systems with a regimen of fattening of three foods: macroalga, fish and feed. The samples were taken at two days, 30 days and 60 days after the start of the experiment. DNA extraction was performed using the PowerSoil DNA isolation kit and the amplification administered using two universal primers (V3 and V4) according to the manufacturer. For analysis of bacterial diversity, the amplified DNA was digested by three restriction enzymes (Rsal, MspI and HaeIII) according to the ARDRA technique. The results showed the highest bacterial diversity, during the 60 days of cultivation, in the presence of organic matter derived from the decomposition of the food supplied as fresh fish in relation to the other two treatments, possibly due to its crude protein content.

Key words: Restriction enzyme, gene 16S, polychaeta, sediment

1 Introdução

A classe Polychaeta do filo Annelida é um dos grupos de invertebrados mais abundantes e diversificados do ambiente atingindo notavelmente grandes densidades nas regiões costeiras (Levington, 2001; Paiva, 2006). Dentro desta classe está o poliqueta *Laeonereis culveri*, uma espécie bentônica de grande abundância e ampla distribuição geográfica sendo encontrado na zona costeira do Brasil (Rossi, 2013). Possui hábito alimentar detritívoro podendo reconhecer partículas de sedimento nos seus conteúdos e se aloca no sedimento formando galerias (Bemvenuti e Colling, 2010). Vem sendo utilizado intensamente ao redor do mundo como isca viva e como um alimento nutricional na aquicultura comercial (Olive, 1999).

Uma das ferramentas biotecnológicas que mais vem evoluindo nos cultivos de organismos aquáticos é o uso de bactérias benéficas visando a biorremediação de solos e água (Oliveira et al. 2006). A dinâmica das interações das bactérias com a fauna bentônica nos sedimentos é regulada pelos nutrientes essenciais presentes nos detritos orgânicos (Alongi, 1985). De acordo com Danovaro e Fabiano (1995), a qualidade da matéria orgânica presente no sedimento e a quantidade de proteínas afeta a estrutura e crescimento da comunidade bacteriana. As bactérias presentes no sedimento são fontes de alimento para os poliquetas e são as responsáveis pela decomposição da matéria orgânica e reciclagem dos nutrientes (Thomaz, 1999). Sendo assim, o estudo da diversidade bacteriana pode gerar conhecimentos para a seleção da dieta a utilizar nos cultivos de poliqueta.

Em função da possibilidade de apenas 1% da população bacteriana de solo ser cultivada em práticas laboratoriais (Kirk et al., 2004), técnicas que apontem ao estudo da diversidade por métodos moleculares são importantes para o entendimento da dinâmica e variabilidade bacteriana. Nas últimas décadas, a taxonomia bacteriana alcançou grande progresso com o uso de técnicas de biologia molecular podendo diferenciar organismos previamente classificados em um grupo comum (LEWINSOHN, 2005). Oliveira et al. (2006) utilizando técnicas moleculares conseguiu distinguir cinquenta e três divisões para o grupo das bactérias das quais 50% não são cultiváveis.

As técnicas de análise de restrição do DNA amplificado (ARDRA), gel de eletroforese com gradiente de desnaturação (DGGE) e gel de eletroforese com gradiente de temperatura (TGGE) constituem as técnicas moleculares mais utilizadas para descrever a comunidade bacteriana presente no solo (Macrae, 2000). A técnica ARDRA consiste em digestão do DNA amplificado com o uso de enzimas de restrição para formar sítios conservados de acordo com os padrões filogenéticos (Santos et al., 2016).

As estratégias para o cultivo de poliquetas estão evoluindo aliando o conhecimento da espécie com suas características ecológicas, principalmente com seus hábitos alimentares. Por consumir bactérias na sua dieta, o estudo da comunidade bacteriana presente no sedimento do cultivo de um poliqueta é importante para entender o seu benefício e tentar correlacionar com o crescimento do animal. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de três dietas na diversidade bacteriana presente no sedimento em um cultivo de *Laeonereis culveri* através da amplificação e clivagem do gene 16S DNAr por meio da técnica ARDRA.

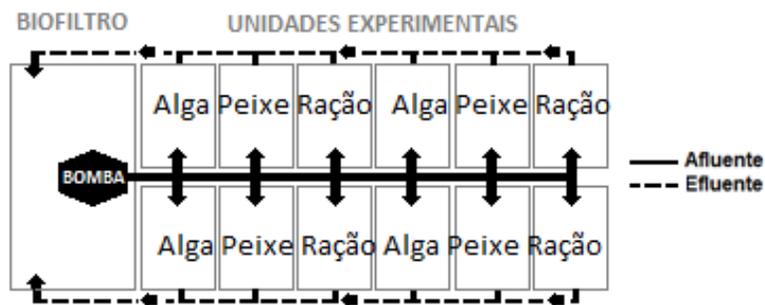
2 Material e Métodos

2.1 Desenho experimental

A diversidade bacteriana foi estudada a partir da amplificação do DNA das bactérias presentes nos sedimentos de um cultivo intensivo de *Laeonereis culveri* assim como amostras de DNA do sedimento onde os indivíduos foram capturados no ambiente natural.

Durante o cultivo, os poliquetas foram alimentados com três dietas: a) macroalgas do gênero *Enteromorpha*, b) peixe moído *Stellifer rastrifer* proveniente do bycatch de pescadores locais; c) ração comercial extrusada Potimar Active 40 PL Guabi usualmente empregada no cultivo de camarões marinhos. O desenho experimental consistiu em três tratamentos com quatro repetições totalizando doze tanques interligados por um biofiltro (FIGURA 1).

FIGURA 1: Sistema de recirculação do cultivo *Laeonereis culveri*



FONTE: Adaptado de Rodolfo Rocha (2016).

Amostras de sedimento foram coletadas com dois dias após o povoamento dos animais (A0, P0 e R0), na metade do período experimental, ou seja, 30 dias de cultivo (A1, P1 e R1) e no final do experimento, aos 60 dias de cultivo (A2, P2 e R2). Três amostras de 8g de sedimento de cada tratamento (2g por unidade experimental) foram coletadas para os três períodos amostrais totalizando nove amostras (3 períodos x 3 tratamentos x 3 amostras) e mais três amostras do interior da Baía de Paranaguá. Após a coleta foram armazenadas em álcool 90% e colocadas em um refrigerador para posterior análise.

Para a extração foi utilizado o kit PowerSoil DNA isolation de extração de DNA de amostras de solo do laboratório MoBio (EUA) seguindo as informações do fabricante onde foi utilizado 0,25g de sedimento para obter 50 µL de DNA extraído. A quantificação do DNA foi realizada com 10 µL de DNA e 60 µL de água MiliQ em um espectrofotômetro Eppendorf observando sua concentração e possível contaminação.

2.2 Análise da diversidade bacteriana (ARDRA)

Para amplificação do DNA foi utilizada a técnica PCR em um volume final de 25 µl contendo os reagentes de PCR do laboratório PROMEGA, os primers V3 (CCT ACG GGN GGC WGC AG) e V4 (GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC) e o DNA extraído seguindo as instruções do fabricante. A reação de amplificação foi realizada em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto, e extensão da fita a 72°C por 30 segundos, seguida de extensão final a 72°C por 4 minutos. Após, a reação foi avaliada em gel de agarose 1% corado com Syber green e visualizados em um transluminador (condições de corrida: 90V por 50 min.)

A diversidade bacteriana foi avaliada através do método ARDRA com amplificação parcial do gene 16S pela técnica da PCR. Para análise de restrição foram utilizadas as enzimas RsaI, MspI e HaeIII (TABELA 1) nos produtos da PCR de acordo com instrução do fabricante (Promega) e incubação a 37 °C. Para análise dos padrões dos fragmentos de restrição foi utilizado gel de agarose a 3% corados com Syber green (condições de corrida: 90V por 70 min). O tamanho molecular dos produtos de digestão foi determinado através da utilização do marcador Syber green.

O perfil eletroforético das amostras foi analisado através de um transluminador. Os padrões de migração gerados foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo coeficiente de Jaccard ($JJ = 100 * (c/a+b-c)$) analisando os diferentes momentos de amostragem dentro e entre os tratamentos.

TABELA 1: Sítios de corte das enzimas RsaI, MspI, HaeIII.

Enzimas	Sítios de corte
RsaI	GTAC
MspI	CCGG
HaeIII	GGCC

FONTE: O autor (2016).

3 Resultados e Discussão

Para avaliar a eficiência da extração de DNA, Rosa (2006) sugere a leitura no espectrofotômetro das relações A260/A230 e A260/A280. A relação A260/A280 permite a análise de contaminação por proteínas no DNA extraído onde os valores entre 1,8 a 2,0 estão em razão ótima e valores inferiores indicam a presença de proteínas. A pureza do DNA pode ser analisada também através da relação de absorbância A260/A230 onde valores menores que 1,8 a 2,2 indicam contaminação por fenóis ou outros resíduos (SILVA, 2015). Apesar do resultado da média da relação de pureza A260/A230 ter demonstrado a presença de contaminantes (Tabela 2), não foi suficiente para inibir a amplificação do DNA. O sucesso nas amplificações pode ser devido ao fato de que as amostras de solo analisadas foram obtidas a partir de um experimento controlado, onde o sedimento inicial coletado prévio ao início do experimento foi higienizado e esterilizado.

TABELA 2: Média das concentrações de dna e relação de contaminantes A260/A280 e A260/A230

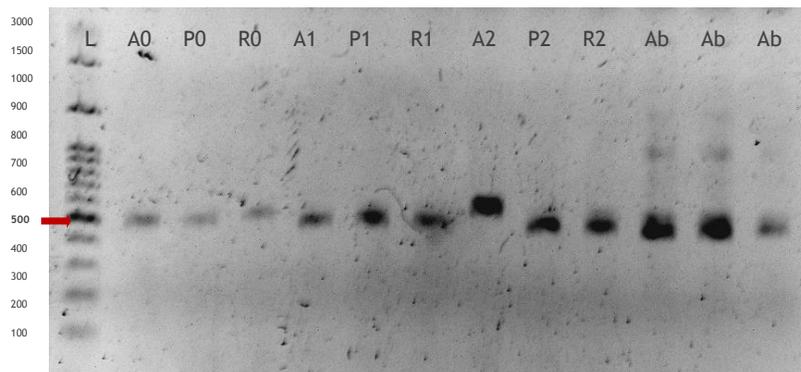
Variável	Nº de amostras	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
Conc. ng/µL	12	2,41	1,6	3,9	0,59
A260/A280	12	2,26	1,58	3,22	0,52
A260/A230	12	0,88	0,68	1,31	0,18

Este método de extração de DNA foi aplicado em diversos trabalhos com o intuito de avaliar a diversidade microbológica. A extração utilizando o kit PowerSoil isolation foi empregado também em estudos de resíduos sólidos orgânicos (DANTAS *et.al.*, 2016), sedimentos de manguezais (NUNES, 2016; RIBEIRO, 2010) e avaliação da comunidade bacteriana em solo agrícola (QUADROS, 2013).

As ampliações de gene foram bem-sucedidas em todas as amostras analisadas (Figura 2). A região variável do gene 16S ribossomal de espécies bacterianas possui nove regiões (V1 a V9) (SILVA, 2014) que correspondem a aproximadamente 1500pb ao todo (WOESE et al., 1987). Silva (2014) reconheceu um fragmento de 300pb amplificando a região V1 a V2 com o intuito de analisar duas comunidades bacterianas presentes em sedimentos de viveiros de aquicultura.

Com a análise de restrição do segmento amplificado utilizando os primers universais para o gene 16S P027F e 1378R, Dias (2008) conseguiu amplificar 1320pb e distinguir 10 ribotipos e 14 gêneros de bactérias em solo manguezal da Ilha do Cardoso situada no estado de São Paulo utilizando os primers universais. Ribeiro (2010) estudando a comunidade bacteriana da Baía das Laranjeiras e Paranaguá no estado do Paraná utilizando os primers 27F e 1492R (1500 pb), pode observar a biodiversidade bacteriana em resposta a ação antrópica. A amplificação de 500pb das regiões V3 e V4 dos DNAs extraídos deste trabalho (Figura 2), apesar de ser um segmento menor comparado ao tamanho total do gene 16S, foi suficiente para trabalhar com as enzimas de restrição.

FIGURA 2: Amplificação do DNA de bactérias extraído do sedimento (500pb)



As enzimas de restrição são utilizadas na técnica ARDRA para a digestão do DNA amplificado formando ou não sítios de corte específicos ao longo do gene, onde o número de clivagens provê a riqueza de fragmentos que uma comunidade bacteriana possui (WANG *et al.*, 2008). Os resultados deste trabalho com três enzimas de restrição mostraram que os insumos alimentares fornecidos aos poliquetas ao longo de sessenta dias de cultivo afetaram a comunidade bacteriana presente no solo.

Na tabela 2 observa-se o coeficiente de similaridade da comunidade bacteriana no início e no final do período experimental em relação às dietas fornecidas aos poliquetas. Nos tratamentos macroalga e peixe houve diminuição do coeficiente de similaridade indicando um aumento de diversidade bacteriana. No tratamento de ração houve 100% de similaridade no início até o fim do experimento, indicando que a presença da ração industrializada no sedimento não foi indutora de diversidade como no caso das dietas naturais.

TABELA 2: Coeficiente de Jaccard da diversidade bacteriana nas três dietas testadas

	Dieta Macroalga	Dieta Peixe	Dieta Ração
Início	100	100	100
Final	61,77	54,22	100

FONTE: O autor (2016).

Uma quantidade elevada de detritos e matéria orgânica no sedimento leva a um crescimento superior da comunidade bacteriana e que a composição bioquímica da matéria orgânica no sedimento provê de lipídios, ácidos e proteínas sendo estas macromoléculas as responsáveis do crescimento bacteriano (Alongi, 1990). Graf *et al.* (1983) ressalta que a qualidade da matéria orgânica em sedimentos superficiais é de vital importância para a dinâmica bacteriana. Thomaz (2010) e Moraes (2007) reforçam que a matéria orgânica fornece a energia utilizadas pelas bactérias bentônicas na reciclagem dos nutrientes assim como na estruturação da cadeia trófica bentônica.

Outros autores analisaram a composição e a dinâmica da degradação da matéria orgânica. Fabiano *et al.* (1993) observou que no processo de degradação, a concentração que cada composto bioquímico era processado diferencialmente resultou onde 35% dos produtos da decomposição eram dos lipídeos, 25,6% de carboidratos e 39,6% de proteínas. Fichez (1991) analisando a decomposição da matéria orgânica no sedimento, obteve resultados mostrando que os lipídeos são compostos altamente degradáveis na camada superior do sedimento e que, apesar da resistência à degradação, houve uma grande degradação de proteínas e carboidratos. Isto demonstra a importância das bactérias na decomposição da matéria orgânica e sugere que a variabilidade na composição pode influenciar na diversidade da comunidade no sedimento.

Resultados de análises de restrição por meio da técnica ARDRA com as enzimas Rsal, MspI e HaeIII estão nas Figuras 2, 3 e 4. Foi possível observar a similaridade nos sítios de restrição das amostras obtidas no ambiente de captura dos poliquetas em comparação com as amostras do período

inicial do cultivo, a pesar do sedimento utilizado nas condições de laboratório ter sido lavado e esterilizado. Estes resultados poderiam estar sugerindo que a fauna bacteriana acompanhante no epitélio das poliquetas foi a responsável pelo estabelecimento do biofilme inicial no sedimento.

FIGURA 3: Análise de restrição com a enzima rsai: 1) ladder a0) macroalgas tempo inicial p0) peixes tempo inicial r0) ração tempo inicial a1) macroalgas 30 dias p1) peixes 30 dias r1) ração 30 dias a2) macroalgas 60 dias p2) peixe 60 dias r2) ração 60 dias Ab) Amostra do ambiente

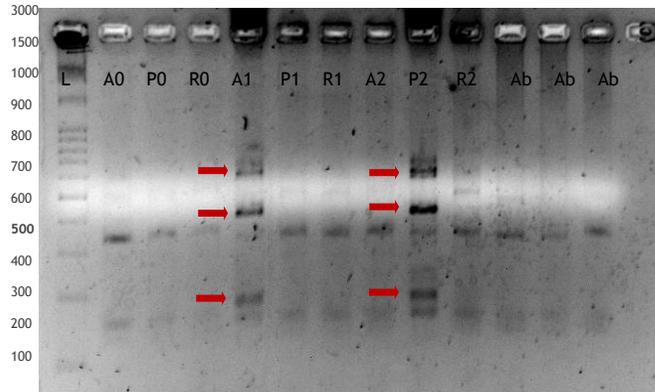


FIGURA 4: Análise de restrição com a enzima mspi: 1) ladder A0) macroalgas tempo inicial P0) peixes tempo inicial R0) ração tempo inicial A1) macroalgas 30 dias P1) peixes 30 dias R1) ração 30 dias A2) macroalgas 60 dias P2) peixe 60 dias R2) ração 60 dias Ab) Amostra do ambiente

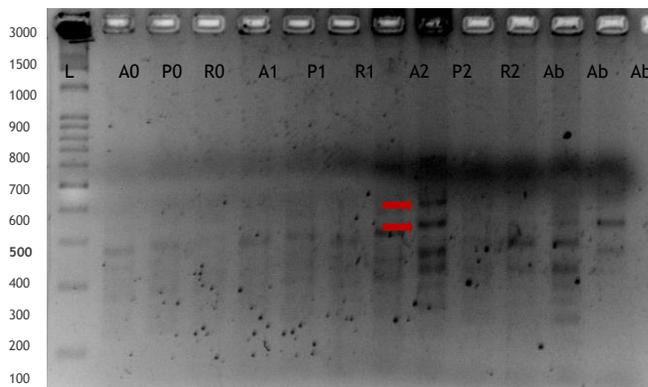
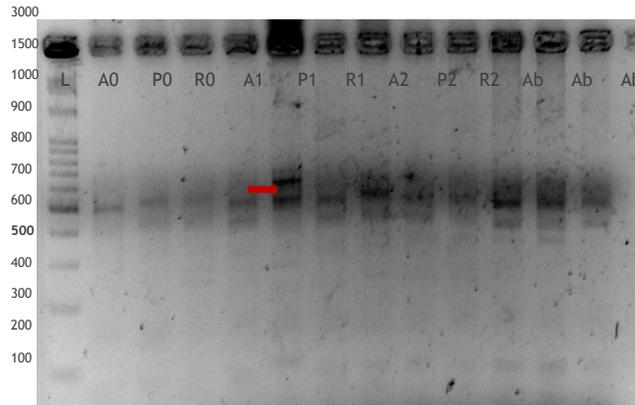


FIGURA 5: Análise de restrição com a enzima haelli: l) ladder A0) macroalgas tempo inicial P0) peixes tempo inicial R0) ração tempo inicial A1) macroalgas 30 dias P1) peixes 30 dias R1) ração 30 dias A2) macroalgas 60 dias P2) peixe 60 dias R2) ração 60 dias Ab) Amostra do ambiente



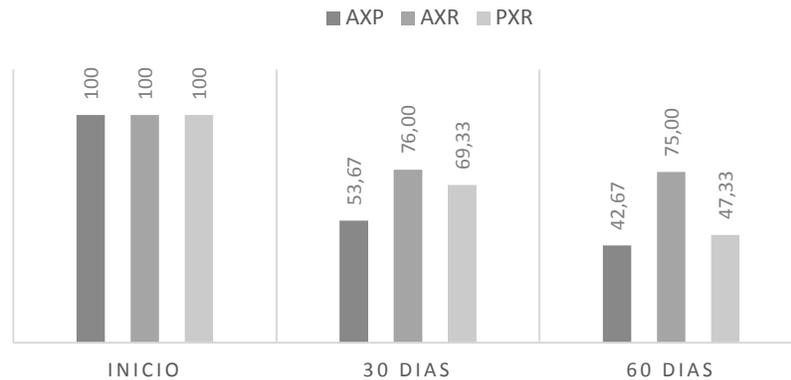
As clivagens obtidas com as amostras do início do cultivo (A0, P0 e R0) não deram diferenças entre os tratamentos com as enzimas utilizadas. Pode-se confirmar uma semelhança de 100% entre as amostras do primeiro período do experimento sugerindo a mesma diversidade (Figuras 3, 4 e 5). Esta similaridade inicial entre os tratamentos é esperada em função do tempo limitado para que cada insumo reflita um crescimento bacteriano diferencial.

Os resultados aos trinta dias de engorda (A1, P1 e R1) mostram o aumento da diversidade bacteriana em relação entre os tratamentos. Observa-se na amostra de solo onde foram fornecidas a dieta de macroalga, com a enzima RsaI, a presença de três bandas únicas (Figura 3) e a dieta de peixe, com a enzima HaeIII, uma banda única (Figura 5). Estas bandas únicas mostram o efeito específico da dieta sobre a comunidade bacteriana do sedimento. Com a enzima MspI a relação do padrão de diversidade dos tratamentos foi o mesmo (Figura 3).

No final do cultivo, com sessenta dias de alimentação fornecida ao poliquetas (A2, P2 e R2), a diversidade aumenta em relação aos outros momentos de amostragem. Com a enzima RsaI observa-se três bandas únicas para a amostra da dieta de peixes (Figura 3) e com MspI duas bandas únicas (Figura 4). Com a enzima HaeIII nota-se uma clivagem semelhante em relação as três dietas (Figura 5).

Analisando o coeficiente de Jaccard (Figura 6) podemos visualizar que quando os tratamentos foram comparados par a par, a distância de similaridade envolvendo a dieta com peixe foi a que apresentou maior diversidade bacteriana. Isto pode ser explicado pelo alto teor de proteína encontrado na dieta de peixe em relação a um menor teor de proteína na dieta das macroalgas.

FIGURA 6: Média do coeficiente de jaccard entre os tratamentos alimentares onde: AxP) relação dietas alga e peixe; AxR) relação dietas alga e ração e PxR) relação dietas peixe e ração.



De acordo com Williams & Carlucci (1976) a fonte de alimento mais utilizada pelas bactérias são as proteínas presentes no ambiente. Outro estudo analisando a matéria orgânica e a sua relação com a comunidade bacteriana apresentaram resultados semelhantes mostrando que o teor de proteína indicou o substrato mais apropriado para o desenvolvimento bacteriano (DONAVARO & FABIANO, 1995). De acordo com Rush et al. (2005) em locais onde a concentração de nutrientes é mais escassa pode se encontrar atividade bacteriana elevada pois, estes microrganismos aceleram o processo para obter quantidade suficiente de nutrientes para seu metabolismo.

Além da alimentação fornecida nos cultivos de organismos aquáticos, a distribuição e composição da comunidade bacteriana presente no sedimento pode ser influenciada pela fauna bentônica. De acordo com Kristensen (2000) as perturbações no sedimento realizada pelos organismos bentônicos podem gerar ambientes químicos e acúmulo de matéria orgânica favoráveis para o crescimento da comunidade bacteriana bentônica. O poliqueta *Laonereis culveri* é uma espécie bentônica com hábito alimentar detritívoro que se aloja no sedimento formando galerias desde a superfície até 30 cm de profundidade no sedimento (ESSELINK & ZWARTS, 1989). Apesar das diferenças observadas na diversidade bacteriana ao longo do tempo com o fornecimento de diferentes dietas, Rocha (2016) não observou diferenças significativas no peso médio final dos poliquetas cultivados.

Nossos resultados mostram diferenças na diversidade bacteriana entre as dietas e entre os diferentes momentos do cultivo do poliqueta *Laonereis culveri*, indicando que o aumento da quantidade de matéria orgânica residual provenientes dos alimentos pode ter sido a causa do aumento da diversidade bacteriana nos sedimentos.

Conclusão

Com a análise da diversidade bacteriana em sedimentos do cultivo do poliqueta *Laonereis culveri* pode-se concluir que:

- A alimentação à base de peixe moído aumenta a diversidade bacteriana em relação à alimentação com macroalgas e alimentação com ração comercial peletizada.
- Quando ração peletizada foi administrada não houve variação na diversidade durante os 60 dias de cultivo.

Bibliografia

ALONGI, O. M. Effect of physical disturbance on population dynamics and trophic interactions among microbes and meiofauna. **Journal of Marine Research**, 43, 351- 364, 1985.

ALONGI, O. M. Bacterial growth rates, production and estimates of detrital carbon utilization in deep-sea sediments of the Solomon and Coral Seas. **Deep-Sea Research**, 37,731-746, 1990.

AMANN, R., LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **FEMS Microbiology Reviews**. ELSEVIER, Vol. 24, pg. 555-565, 2000.

BEMVENUTI, C. E., COLLING, L.A. Relações tróficas na comunidade bentônica da região estuarina da Lagoa dos Patos,RS, Brasil. **Cadernos de Ecologia Aquática**. Vol 5, n° 1, pg 1 – 8, 2010.

DANOVARO, R., FABIANO, M., CROCE, N. D. Labile organic matter and microbial biomasses in deep-sea sediments (Eastern Mediterranean Sea). **Deep-Sea Research I**, Vol 40, n° 5, pg. 953-965, 1993.

DANOVARO, R., FABIANO, M. Seasonal and inter-annual variation of bacteria in a seagrass bed of the Mediterranean Sea: relationship with labile organic compounds and other environmental factors. **Aquatic Microbial Ecology**. Vol. 19, 17 – 26, 1995.

DANTAS, G. R., LEITE, V. D., COSTA, E. M. Estudo da Diversidade Microbiana em Processo de Digestão Anaeróbia de Resíduos Sólidos Orgânicos. **Ciência & Tecnologia: FATEC – JB**, Jaboticabal (SP), v. 8, número especial, 2016.

DIAS, A. C. F. Diversidade de bactérias do sedimento de manguezal da Ilha do Cardoso Cananéia – São Paulo. 2008. Pg 59. **Dissertação** - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ESSELINK, P., LEO, Z. Seasonal trend in burrow depth and tidal variation in feeding activity of *Nereis diversicolor*. **Marine ecology progress series**. Oldendorf, pg 243-254, 1989.

FICHEZ, R. Composition and fate of organic matter in submarine cave sediments; implications for the biogeochemical cycle of organic carbon. **Oceanologia ACTA**, Vol 14, n° 4, 369 – 377, 1991.

GRAF, G., SHULTZ, T., PEINERT, R., MEYER-REIL, L. A., Benthos response to sedimentation during autumn to spring at shallow water station in the western kiel bight. I. Analysis of processes on the community level. **Mar. Biol.** 77: 235 – 246, 1983.

KRISTENSEN, E. Organic matter diagenesis at the oxic/anoxic interface in coastal marine sediments, with emphasis on the role of burrowing animals. **Hydrobiologia**, Vol. 426, pg 1–24, 2000.

LEVINGTON, J. S. 2001. Marine biology: function, biodiversity, ecology. **Marine Biology**. Oxford: Oxford University Press, vol. 4, p. 576. 15 July, 2013.

LEWINSOHN, T.M. Avaliação do Estado do Conhecimento da Diversidade Biológica Brasileira. **Série Biodiversidade, MMA**. Vol. II, pg. 520, Brasília, 2005.

MACRAE, A. The use of 16s rDNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology**. Vol. 31, pg. 77-82, 2000.

NUNES, F. R. S. Elementos genéticos móveis no microbioma dos sedimentos de manguezais. 2016. Pg. 52. **Dissertação** – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016

OLIVE, P. J. W. Polychaete aquaculture and polychaete science: a mutual synergism. **Hydrobiologia. Journal Hydrobiologia**. Vol. 402, pg 175-183, 1999.

OLIVEIRA, V.M., SETTE, L.D., GARBOGGINI, F.F., Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. Construindo a História dos Produtos Naturais. **Revista Multiciência**. Universidade Estadual de Campinas. Outubro, 2006.

PAIVA, P. C. 2006. Filo Annelida. Classe Polychaeta. In: Helena Passeri Lavrado; Barbara Lage Ignacio. Biodiversidade bentônica da região central da Zona Econômica Exclusiva Brasileira. 1 ed. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 1: 261-298.

QUADROS, P. D. Diversidade e composição de comunidades microbianas de solos construídos e de solos sob diferentes manejos agrícolas. 2013. Pg. 113. **Tese** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

RIBEIRO, C. G. Diversidade procariótica em sedimentos de dois manguezais, com distintos níveis de poluição, no Complexo Estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil. 2010. Pg. 92. **Dissertação** – Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, 2010.

ROCHA, R. A. D. Efeitos da intensidade luminosa, densidade e dieta na reprodução de *Laeonereis culveri* (Polychaeta: Nereididae) em sistema fechado de recirculação. 2016. Pg. 19. **Dissertação** – Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, 2016.

ROSSI, D. F. Efeito do biorrevolvimento por *Eleobia australis* (D'orbigny, 1835) (Gastropoda) e *Laeonereis culveri* (Webster, 1880) (Polychaeta) sobre os fluxos de carbono inorgânico nas interfaces

sedimento-água-atmosfera. 2013. Pg. 59. **Dissertação** – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2013.

RUSH, T. S., GRANT, A. J., MOSYAK, L., NICHOLLS, A. A Shape-Based 3-D Scaffold Hopping Method and Its Application to a Bacterial Protein-Protein Interaction. **Journal Medicinal Chemistry**. Vol. 48 (5), pg 1489 – 1495, 2005.

SANTOS, I.B., PEREIRA, A. P. A., OLIVEIRA, J. T. C., OLIVEIRA, D. R. M., FREIRE, F. S., SOBRAL, J. K. Variabilidade genética de bactérias solubilizadoras de fosfatos associados a cana-de-açúcar. **Ciência & Tecnologia**. Vol. 8, n° especial. Jaboticabal, 2016.

SILVA, D. B. Comunidade bacteriana em viveiros de aquicultura. 2014. Pg. 59. **Dissertação** – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

SILVA, L. P. Análise Molecular do Gene TP53 em Tumores de Cabeça e Pescoço. 2015. Pg. 23. **Monografia** – Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2015.

TOMAZ, S. M., O papel ecológico das bactérias e teias alimentares microbianas em ecossistemas aquáticos. **Perspectivas na Limnologia do Brasil** - Capítulo 10, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia, Maringá - PR, 2007.

WANG, M. C., LIU, Y. H., WANG, Q., GONG, M., HUA, X. M., PANG, Y. J., HU, S., YANG, Y. H. Impacts of methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**. ELSEVIER, pg. 778-788, v. 40, 2008.

WILLIAMS, P. M., CARLUCCI, A. F. Bacterial utilisation of organic matter in the deep sea. **Nature**, 262, pg 810 – 811, 1976.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, Vol. 51, n°2, pg 221 – 271, 1987.