

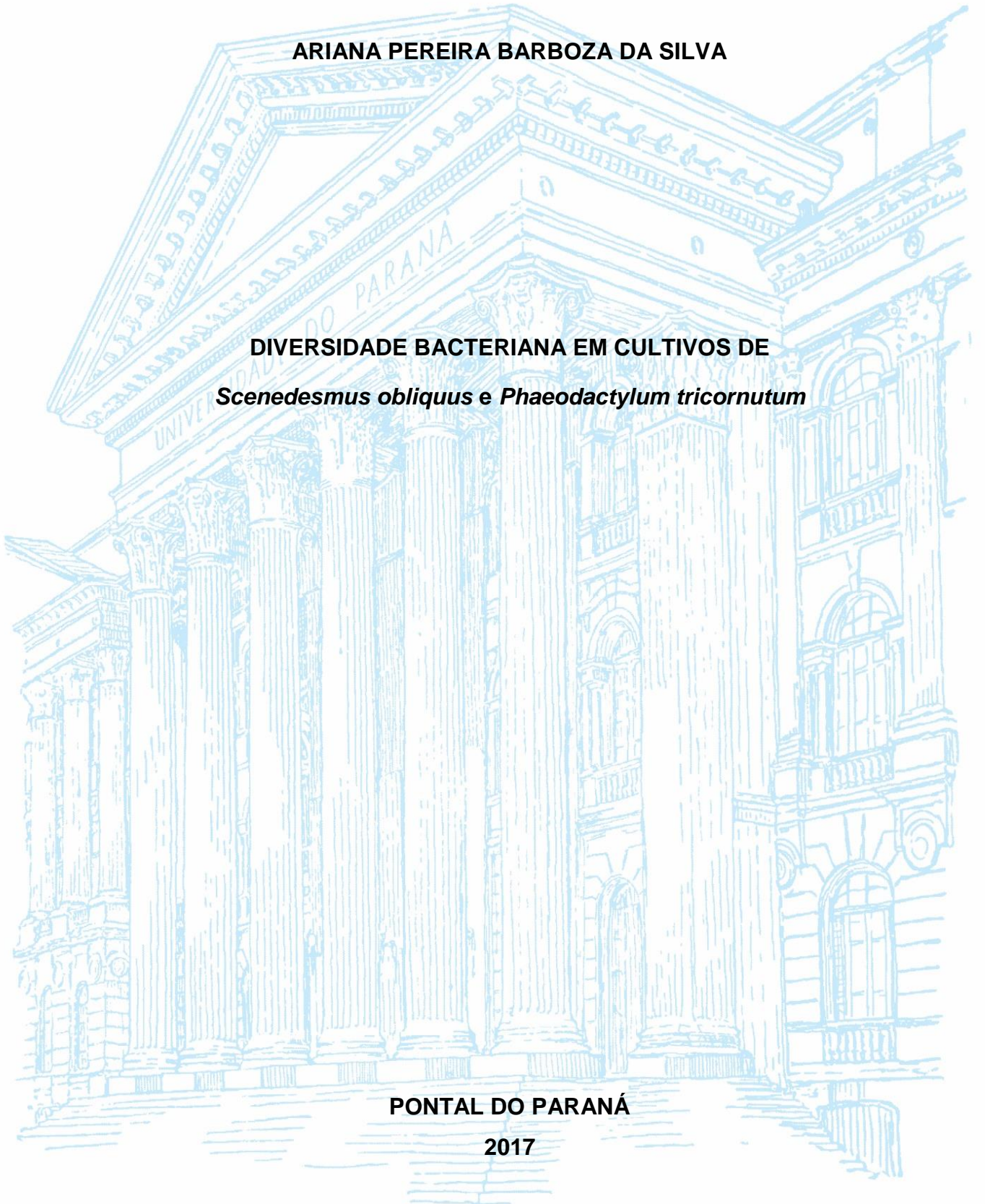
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CENTRO DE ESTUDOS DO MAR

ARIANA PEREIRA BARBOZA DA SILVA

DIVERSIDADE BACTERIANA EM CULTIVOS DE
Scenedesmus obliquus* e *Phaeodactylum tricornutum

PONTAL DO PARANÁ

2017



ARIANA PEREIRA BARBOZA DA SILVA

DIVERSIDADE BACTERIANA EM CULTIVOS DE
Scenedesmus obliquus* e *Phaeodactylum tricornutum

Trabalho apresentado como requisito parcial à Conclusão de Curso, do Curso de Graduação em Oceanografia, do Centro de Estudos do Mar, do Setor de Ciências da Terra, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Rodolfo Luis Petersen

PONTAL DO PARANÁ
2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE:
UFPR / SiBi - Biblioteca do Centro de Estudos do Mar
Fernanda Pigozzi – CRB 9/1151

Silva, Ariana Pereira Barboza da
S586d Diversidade bacteriana em cultivos de *Scenedesmus obliquus* e *Phaeodactylum tricornum*. / Ariana Pereira Barboza da Silva. – Pontal do Paraná, 2017.
69 f.: il., 29 cm.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Luis Petersen.

Monografia (Graduação) – Curso de Oceanografia, Centro de Estudos do Mar, Setor Reitoria, Universidade Federal do Paraná.

1. Microalgas - cultivo. 2. Microalgas - doença. I. Título. II. Petersen, Rodolfo Luis. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 579.82

TERMO DE APROVAÇÃO

Ariana Pereira Barboza da Silva

**“DIVERSIDADE BACTERIANA EM CULTIVOS INTENSIVOS
*SCENEDESMUS OBLIQUUS E PHAEODACTYLUM
TRICORNUTUM.*”**

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


Prof. Dr. Francisco José Lagreze Squella - CEM/UFPR


Prof. Dr. Luis Laureno Mafrá Júnior - CEM/UFPR


Prof. Dr. Rodolfo Luis Petersen
Presidente

Pontal do Paraná, 05/12/2017

In Memoriam ao meu tio Pedro e a luz dos meus olhos Elen.

AGRADECIMENTOS

À Deus e ao meu guia espiritual por me proporcionarem estar aqui hoje, por todo equilíbrio de amor, força, sabedoria fornecido ao meu corpo e a minha alma. Por todo trajeto programado a minha vida, por toda saúde, por tudo que sou e serei sempre.

Aos meus pais Francisco e Rita pela boa educação que me proporcionaram.

À minha sobrinha Elen por todo brilho que trouxe e trás à minha vida, pela luz que me concede todos os dias.

Ao meu tio Pedro pela companhia e por todas as lindas palavras que sempre me encorajaram.

Aos meus sobrinhos Leonardo e Rafaela por toda cumplicidade, amor e responsabilidade que trouxeram a minha vida.

Aos demais sobrinhos que me fornecem toda maturidade e criatividade de um amor simples e puro.

As minhas irmãs pelos conselhos, pela paciência, pelo apoio financeiro e espiritual.

As minhas amigas Bruna, Janaina e Gabriela por fazerem parte de toda minha trajetória, suportando-me.

Ao André Macedo por toda experiência e simplicidade que trouxe a minha vida.

Aos meus amigos de Pontal que me ajudaram na caminhada da vida nesses anos fora de casa: Gisele, Silvio, Marina, Yasmim, Iully, Taís, Cássia, Bruna e Luiza. Desculpe se esqueci alguém. Obrigado por fazerem parte desta etapa da minha vida e por terem dedicado um tempo de vocês para me ouvirem e me conhecerem um pouco melhor, obrigada mesmo!

Ao meu dog Zeus pela companhia nos momentos da minha vida pontalense.

Aos demais familiares e amigos que de algum modo, ensinaram-me ou por uma palavra puderam transmitir a mim, pensamentos positivos.

Ao meu orientador Dr. Rodolfo Petersen pelo apoio e confiança na execução do trabalho.

À minha linda Doutoranda Daniele por todo apoio e ensinamento na introdução a genética e na execução deste trabalho.

Ao Centro de Estudos do Mar e a Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade.

“Nada nesta vida faz sentido se não tivermos cercados das pessoas que amamos”.

Ariana Barboza

RESUMO

Os estudos sobre cultivos de microalgas ganharam grande avanço nos últimos tempos, devido a diversidade de seus potenciais biotecnológicos ativos. Juntamente com os cultivos intensivos das microalgas, surgiram as contaminações por diversos organismos, inclusive as bactérias, as quais estão presentes em praticamente todos os ambientes. Associadas aos cultivos de microalgas as bactérias podem ser benéficas ou prejudiciais. O presente trabalho visa a caracterização da diversidade bacteriana associada aos cultivos das microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Phaeodactylum tricornutum* utilizando a técnica ARDRA, através das enzimas de restrição HaeII, HaeIII, MspI, RsaI e Hsp92II. Os cultivos de *S. obliquus* e *P. tricornutum* foram realizados em triplicatas durante 15 e 17 dias, respectivamente, onde as amostras foram coletadas no momento do inóculo e nas três fases da curva de crescimento (24h após a inoculação; exponencial; estacionária). Os cultivos foram mantidos com iluminação constante e a temperatura de $24\text{ C}^\circ \pm 1,0\text{ C}^\circ$. Paralelamente ao cultivo foram mensurados a densidade celular microalgal e o pH do cultivo. Os cultivos das duas espécies obtiveram elevada densidade celular. O pH de *P. tricornutum* ficou mais ácido conforme as fases de crescimento, já *S. obliquus* era neutro no início e permaneceu alcalino até o fim do cultivo. Foram encontrados para *P. tricornutum* 9, 11, 7, 8, e 7 e para *S. Obliquus* 0, 5, 9, 10 e 6 padrões ARDRA diferentes, entre os três cultivos para as enzimas HaeII, HaeIII, MspI, RsaI e Hsp92II, respectivamente. A maior diversidade bacteriana encontrada foi na fase exponencial para ambas as espécies e fase estacionária foi responsável pela diminuição da diversidade bacteriana. Algumas bactérias permaneceram ao longo de todas as fases de crescimento das microalgas. A competição por nutrientes e pelo espaço dentro do cultivo pode ter sido o principal responsável pela diminuição da diversidade na fase estacionária. A técnica ARDRA foi eficiente para identificar os diferentes grupos bacterianos ao longo dos cultivos, conseqüentemente, foi possível mensurar a diversidade bacteriana presente nos cultivos.

Palavras-chave: *Phaeodactylum tricornutum*. *Scenedesmus obliquus*.

Diversidade Bacteriana. ARDRA.

ABSTRACT

Studies on microalga cultivation have gained great progress in recent times due to the diversity of their active biotechnological potentials. Alongside the intensive cultivation of microalgae, contamination has arisen from various organisms, including bacteria, which are present in virtually every environment. Associated with microalgae cultivation bacteria can be beneficial or harmful. The present work aims to characterize the bacterial diversity associated with the microalgae cultivation *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* using the ARDRA technique through the restriction enzymes HaeII, HaeIII, MspI, RsaI and Hsp92II. Cultivations of *S. obliquus* and *P. tricornutum* were performed in triplicates for 15 and 17 days, respectively, where samples were collected at the time of inoculum and in the three phases of the growth curve (24h after inoculation; exponential; stationary). The crops were kept under constant illumination and the temperature of 24 ± 1.0 ° C. Parallel to the cultivation, the microalgal cell density and the pH of the culture were measured. The crops of both species obtained high cell density. The pH of *P. tricornutum* became more acidic according to the growth stages, whereas *S. obliquus* was neutral at the beginning and remained alkaline until the end of cultivation. For *P. tricornutum* 9, 11, 7, 8, and 7 and *S. Obliquus* 0, 5, 9, 10 and 6 different ARDRA patterns were found among the three cultures for the enzymes HaeII, HaeIII, MspI, RsaI and Hsp92II. respectively. The highest bacterial diversity found was in the exponential phase for both species and the stationary phase was responsible for the decrease in bacterial diversity. Some bacteria remained throughout the microalgae growth stages. Competition for nutrients and space within the crop may have been primarily responsible for decreasing stationary phase diversity. The ARDRA technique was efficient to identify the different bacterial groups throughout the cultures, therefore, it was possible to measure the bacterial diversity present in the cultures.

Keywords: *Phaeodactylum tricornutum*. *Scenedesmus obliquus*.

Bacterial Diversity. ARDRA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DIAGRAMA DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA PARA UMA SEQUÊNCIA REPRESENTATIVA DE 16S BACTERIANO DE <i>Escherichia coli</i>	21
FIGURA 2 – CICLOS DE REAGENTES PARA REALIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO.....	30
FIGURA 3 – DENSIDADE CELULAR E Ph DE <i>P. tricornutum</i> PARA OS TRÊS CULTIVOS.....	36
FIGURA 4 – DENSIDADE CELULAR E Ph DE <i>S. obliquus</i> PARA OS TRÊS CULTIVOS.....	37
FIGURA 5 - PCR REALIZADA PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA BACTERIANO APARTIR DO CULTIVO DE <i>Phaeodactylum tricornutum</i> EM GEL DE AGAROSE 1%.....	38
FIGURA 6 - PCR REALIZADA PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA BACTERIANO APARTIR DO CULTIVO DE <i>Scenedesmus obliquus</i> EM GEL DE AGAROSE 1%.....	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – QUADRO DA LINHAGEM DAS MICROALGAS.....	18
TABELA 2- CICLOS DE REAGENTES PARA REALIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO.....	30
TABELA 3 – SOLUÇÕES PARA PREPARAÇÃO DO MIX DE REAGENTES PARA REALIZAÇÃO DA TÉCNICA PCR.....	31
TABELA 4 – CICLOS DE TEMPERATURA PARA REALIZAÇÃO DA TÉCNICA PCR.....	32
TABELA 5 - ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E SEUS RESPECTIVOS SÍTIOS DE CORTE ESPECIFICO.....	32
TABELA 6 - SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA PREPARAÇÃO DO MIX PARA REALIZAÇÃO DA TÉCNICA ARDRA.....	33
TABELA 7 – SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA PREPARAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA.....	33

TABELA 8 – QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO DOS CULTIVOS.....	38
TABELA 9 – QUANTIDADE DE BANDAS ENCONTRADAS AO LONGO DAS FASES DE CRESCIMENTO DOS TRÊS CULTIVOS PARA TODAS AS ENZIMAS.....	41
TABELA 10 – RESULTADOS DAS MÉDIAS E MEDIANAS DO ÍNDICE DE SIMILARIDADE BACTERIANA EM PORCENTAGEM ENTRE OS TRÊS CULTIVOS DE <i>P. tricornutum</i> PARA AS DIFERENTES FASES DA CURVA DE CRESCIMENTO UTILIZANDO 5 ENZIMAS.....	42
TABELA 11 - RESULTADOS DAS MÉDIAS E MEDIANAS DO ÍNDICE DE SIMILARIDADE BACTERIANA EM PORCENTAGEM ENTRE OS TRÊS CULTIVOS DE <i>S. obliquus</i> PARA AS DIFERENTES FASES DA CURVA DE CRESCIMENTO UTILIZANDO 5 ENZIMAS.....	42

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	IMPORTÂNCIA BIOTÉCNOLÓGICA DA MICROALGAS.....	13
2.2	OBJETIVOS.....	15
2.	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	HISTÓRICO SOBRE CULTIVOS DE MICROALGAS.....	16
2.2	DIVERSIDADE BACTERIANA.....	18
2.3	TÉCNICAS MOLECULARES PARA O ESTUDO DA MICROBIOLOGIA.....	22
2.4	ASSOCIAÇÃO BACTÉRIAS-MICROALGA.....	23
3.	METODOLOGIA	27
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL	27
3.2	IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES.....	28
3.3	DIVERSIDADE BACTERIANA.....	28
3.3.1	Coleta das Amostras.....	29
3.3.2	Extração do DNA.....	29
3.3.3	Reação em Cadeia da polimerase –PCR.....	31
3.3.4	Análise de restrição do DNA Ribossomal Amplificado - ARDRA	31
3.3.5	Visualização em Gel de Poliacrilamida e Gel de Agarose.....	33
3.3.5.1	Visualização em Gel de Poliacrilamida.....	33
3.3.5.2	Visualização em Gel de Agarose.....	34
3.3.5.3	Eletroforese.....	34
3.3.6	Parâmetros Analisados.....	35
4.	RESULTADOS	35
4.1	PARÂMETROS DOS CULTIVOS DAS MICROALGAS.....	35
4.2	RESULTADOS DA ANÁLISE BACTERIANA NOS CULTIVOS DAS MICROALGAS.....	40

5.	DISCUSSÃO	43
6.	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXO 1 – MEIO DE CULTIVO	55
	ANEXO 2 – PERFIS ELETROFORÉTICOS <i>P. tricornutum</i>	57
	ANEXO 3 - PERFIS ELETROFORÉTICOS <i>P. tricornutum</i>	58
	ANEXO 4 - PERFIS ELETROFORÉTICOS <i>P. tricornutum</i>	59
	ANEXO 5 - PERFIS ELETROFORÉTICOS <i>P. tricornutum</i>	60
	ANEXO 6 - PERFIS ELETROFORÉTICOS <i>P. tricornutum</i>	61
	ANEXO 7 - PERFIS ELETROFORÉTICOS <i>P. tricornutum</i>	62
	ANEXO 8 - PERFIS ELETROFORÉTICOS <i>S. obliquus</i>	63
	ANEXO 9 - PERFIS ELETROFORÉTICOS <i>S. obliquus</i>	64
	ANEXO 10 - PERFIS ELETROFORÉTICOS <i>S. obliquus</i>	65
	ANEXO 11 - PERFIS ELETROFORÉTICOS <i>S. obliquus</i>	66
	ANEXO 12 - PERFIS ELETROFORÉTICOS <i>S. obliquus</i>	67
	ANEXO 13 - ÍNDICE DE SIMILARIDADE DE <i>P. tricornutum</i>	68
	ANEXO 14 – ÍNDICE DE SIMILARIDADE DE <i>S. obliquus</i>	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DA MICROALGAS

O estudo sobre as microalgas tem sido bastante retratado nos últimos tempos, devido a vasta variedade que esse grupo compreende, tanto pela alta diversidade e abundância de espécies, quanto pelos seus potenciais biotecnológicos. A capacidade metabólica das microalgas é muito abrangente, em função disso, suas diferentes propriedades podem ser utilizadas de diversas formas e em diversas áreas, tais como na indústria farmacêutica, cosmética, de alimentos, nutracêutica e mais recentemente na produção de energia (LOURENÇO, 2006, p.27-49). A composição da biomassa microalgal compreende em maiores quantidade os pigmentos fotossintéticos, carboidratos, proteínas e lipídeos. As quantidades desses componentes variam de acordo com cada espécie e com o meio externo que está disposto, como a intensidade luminosa, a temperatura e a disponibilidade de nutrientes.

A pesquisa que envolve o potencial das microalgas na atualidade, compreende a exploração da sua concentração lipídica e de sua biomassa para a produção de energia renovável. Com base nisso, as investigações de cultivos em massa e mais eficientes ganharam muita força proveniente das demandas industriais. No entanto, com o avanço dos cultivos, naturalmente surgiu uma série de desafios relacionados com fatores dependentes para o desenvolvimento do cultivo, tais como a luz, a temperatura, a salinidade, os nutrientes e o controle das contaminações, devido a maioria dos cultivos em massa serem desenvolvidos em ambientes abertos, utilizando a luz solar.

As contaminações podem ser por diversos microorganismos, tais como fungos, leveduras, bactérias e outros. O principal problema hoje dentro dos cultivos de microalgas são as contaminações por bactérias, pois já sabemos que a diversidade bacteriana é muito grande. No entanto, a associação bactéria-microalga também pode ser uma relação muito benéfica ao cultivo e muitas vezes essencial para o seu crescimento. Com base nisso, uma das ferramentas biotecnológicas que mais vem evoluindo nos cultivos de organismos aquáticos é o uso de bactérias benéficas visando a biorremediação dos solos e da água (AVNIMELEC, 2009, p.).

Os nutrientes não assimilados pelas microalgas dispersos no ambiente tendem a se acumular favorecendo a proliferação de bactérias. Com o manejo adequado da bacteriologia associada ao cultivo, permitirá proporcionar as microalgas um ambiente propício para seu crescimento (OLIVEIRA; SETTE, GARBOGGINI, 2006).

As bactérias associadas às microalgas desempenham um papel fundamental não apenas no crescimento, mas também na composição da biomassa microalgal. A composição química da biomassa de microalgas é certamente um fator chave na aquicultura; portanto, as interações microalgas-bactérias merecem grande importância em atividades de aquicultura. Na piscicultura, por exemplo, a composição dos alimentos fornecidos na fase larval, especialmente a composição em termos de ácidos graxos e outros componentes lipídicos, determinará a qualidade nutricional final dos peixes produzidos (SILVA, 1999, p. 269). As culturas simbióticas de microalgas e bactérias muitas vezes resultam em eliminação completa de bactérias contaminantes em sistemas de aquicultura.

A identificação bacteriana tradicional está sustentada pela técnica de cultivo em meios nutritivos, para então uma posterior identificação bioquímica. O meio de cultura artificial não possibilita o crescimento de todas as bactérias existentes em determinado ambiente (ACINAS; ANTÍN; RODRIGS-VARRA, 1999, p. 515), sendo que 50 % das seqüências do gene 16S rDNA depositadas no NCBI-Data Base pertencem a espécies de microorganismos desconhecidos. Esta disparidade tem ocasionado um aumento da importância dos métodos independentes de cultivo, para o estudo da diversidade microbiana (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995, p. 144; HEAD; SAUNDERS, PICKUP, 1998, p. 2), principalmente com a análise das seqüências de ácidos nucléicos (SZEWZYK; BĀZ; BARTOCHA, 2000, p.). A técnica ARDRA (Análise de Restrição do rDNA Ribossomal Amplificado) permite avaliar a diversidade bacteriana existente em um determinado meio, pois consiste na digestão do DNA amplificado com o uso de enzimas de restrição para formar sítios conservadores de acordo com os padrões filogenéticos (SANTOS *et al.*, 2016, p.). Através da amplificação do rRNA ribossomal 16S, que é tradicionalmente aplicado a bacteriologia, ou melhor, em organismos procariotos, é possível mensurar a diversidade bacteriana de uma forma mais eficiente.

Potencializar os meios de cultivo das microalgas com o manejo adequado da bacteriologia, pode-se obter cultivos teoricamente limpos, para que sejam preservadas suas propriedades e obter um cultivo com densidades elevadas. A

interação entre bactérias e microalgas envolvem diferentes mecanismos, incluindo o crescimento estimulante ou inibitório da produção composta. Nesse sentido, as bactérias podem estimular o crescimento das microalgas, potencializando os cultivos e também um melhoramento na dieta de outros organismos, tendo em vista seu uso frequente na aquicultura. A falta atual de conhecimento leva a vários desafios importantes. Neste contexto, é importante obter uma visão mais profunda das espécies bacterianas existentes, que estão associadas ao desenvolvimento dentro dos cultivos das microalgas. Isso envolve, a diversidade da interação bactérias-microalgas, a compreensão dos processos envolvidos e principalmente ao uso das técnicas moleculares, já que estas são comprovadamente mais eficientes que as técnicas rotineiramente utilizadas.

1.2 OBJETIVOS

- Objetivo Geral

O presente trabalho visa a caracterização da diversidade bacteriana associada aos cultivos das microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Phaeodactylum tricornutum* ao longo das fases de crescimento, utilizando a técnica molecular ARDRA.

- Objetivos Específicos

- Verificar a similaridade bacteriana entre os cultivos nas fases da curva de crescimento, para obter a diversidade bacteriana;

- Mensurar a diversidade bacteriana existente no meio de cultivo de *P. tricornutum* e *S. obliquus* a partir da técnica molecular ARDRA, através das enzimas de restrição HaeII, HaeIII, MspI, RsaI e Hsp92II.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO SOBRE CULTIVOS DE MICROALGAS

Os estudos sobre cultivos de microalgas iniciaram a aproximadamente 150 anos e o seu desenvolvimento seguiu com princípios baseados em estudos bacteriológicos (LOURENÇO, 2006, p. 1-25). Em 1886, Jackson e Elms relataram a produção de H₂ a partir de microalgas, o que tornou uma pesquisa científica em 1940 (BENEMANN, 2000, p.292). No entanto, foi a partir de 1960 as primeiras pesquisas relacionadas com a produção em larga escala da biomassa das microalgas. Somente em meados de 1990 até os dias de hoje os estudos obtiveram intenso avanço (LOURENÇO, 2006, p. 1-26).

No Brasil, os estudos são mais recentes, porém desde a década de 1970 erificar iniciaram-se estudos sobre microalgas, com ênfase na diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* no famoso trabalho de Teixeira e Vieira (1976, p.29). Os estudos no Brasil eram baseados na extração de proteínas e mais tarde no uso na aquicultura e extração de óleo para a produção de biocombustível (LOURENÇO, 2006, p.29-32). No Paraná, o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) conduz um projeto no desenvolvimento de tecnologias para a produção de biocombustível e derivados da biomassa a partir das microalgas (BARBOZA *et al.*, 2014, p. 23-327).

As algas são organismos eucariontes considerados mais antigos do planeta, os quais podem ter sido responsáveis pelo acúmulo de O₂ na atmosfera da Terra, o que possibilitou vida dos demais organismos existentes (RAVEN *et al.*, 2001, p. 11). Segundo Kurano *et al.* (1995, p.689), as microalgas possuem eficiência fotossintética superior a das plantas, pois possuem alta e rápida taxa de proliferação, e muitas espécies possuem alta tolerância a ambientes extremos. As microalgas também possuem fácil adaptabilidade a cultivos intensivos, tornando-as organismos importantes, pois podem ser cultivados em massa. As microalgas são muito eficazes na redução de CO₂ atmosférico, pois elas através do sistema que é conhecido por “Bomba Biológica”, leva o CO₂ para o fundo oceânico onde é aprisionado e utilizado pelos organismos, diferentemente quando esse CO₂ é absorvido pelo solo terrestre, que quando utilizado, liberará muito CO₂ para

atmosfera. Esse gás é muito importante para o planeta, porém o excesso dele pode gerar vários problemas, como a intensificação do “efeito estufa”. No caso, o potencial fixador de CO₂ também é bem maior que o das plantas (BROWN, ZEILER, 1993, p. 9).

As microalgas estudadas nesse trabalho compreendem uma microalga de água doce e uma microalga de água salgada. A microalga de água doce *Scenedesmus obliquus*, está integrada em um grupo característico por centenas de flagelos que ajudam na locomoção e possuem pelo menos um plasto fotossintetizante, onde se encontram a clorofila *a*, a clorofila *b*, o beta-caroteno, e vários outros pigmentos fotossintetizantes (LOURENÇO, 2006, p. 121). Este grupo possui, em sua maioria, algas dulciquícolas e apenas algumas são marinhas (HOEK *et al.*, 1988, citado por REVIERS (2006, p. 125)). Algumas podem até suportar pH muito ácidos, como por exemplo próximos à 1 (MELKONIAN 1990, citado por REVIERS (2006, p.125)). *S. obliquus* é uma espécie comum que já foi identificada com diversos nomes, mas atualmente é aceita como *Tetradesmus obliquus*, descrita por Kutzing Turpin em 1833 (MARINE SPECIES, 2017). Já *Phaeodactylum tricorutum* é uma microalga marinha, que pertence ao grupo das diatomáceas e foi descrita por Bohlin em 1897, onde descreveu um novo gênero de algas unicelulares, *Phaeodactylum*, com espécie única como *P. tricorutum*, uma diatomácea unicelular, geralmente possui um cromatóforo marrom parietal na região central. Podem possuir formas diferentes, com 3 ou 2 braços (LEWIN, 1958, p. 419). As formas celulares diferentes podem ser variadas de acordo com variações nas condições ambientes. *P. tricorutum* pode se desenvolver na ausência de silício, mas impossibilita o desenvolvimento da sua frústula silicificada (DEVI; SUBHASH; MOHAN, 2012, p. 278). Elas se reproduzem assexuadamente, e estudos ainda são falhos na questão da sua reprodução sexuadamente. Vetores de interferência do RNA dessa espécie são descritos e livres nos bancos de dados, o que facilita todo estudo molecular dessa espécie. Possui seu genoma seqüenciado, o que representa 10% de genes procariotas. No NCI Data base foram descritos cerca de 30.000 marcadores da seqüência expressa desta espécie (NCI DATA BASE, 2017). A espécie é rica em lipídios, o que representa 20-30% do seu peso celular seco. (ALGA E BASE, 2017). A limitação de nitrogênio nesta espécie afeta diretamente a quantidade de lipídios (LOURENÇO, 2006, p.177).

Tanto *S. obliquus*, quanto *P. tricornutum* são microalgas fáceis de serem cultivadas *in vitro* e em massa para cultivos industriais. Possibilitando o seu uso frequente no mercado atual e também por suas propriedades bioativas de alto valor.

TABELA 1 - QUADRO DA LINHAGEM DAS MICROALGAS.

Classe	<i>Chlorophyceae</i>	<i>Bacillariophyta</i>
Ordem	<i>Sphaeropleales</i>	<i>Naviculales</i>
Família	<i>Scenedesmaceae</i>	<i>Phaeodactylaceae</i>
Gênero	<i>Scenedesmus</i>	<i>Scenedesmus</i>
Espécie	<i>Scenedesmus obliquus</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>

FONTE: O autor (2017).

2.2 DIVERSIDADE BACTERIANA

As células procariontes são os organismos mais antigos do planeta (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2015, p. 293). O mundo microbiano foi descoberto por Antony Van Leeuwenhoek, no século 17 (PELCZAR et al., 2005, p. 23). Os estudos com microorganismos iniciaram em 1673 com Van Leeuwenhoek, no entanto somente em 1857 ganharam maior ênfase nos estudos de Louis Pasteur. A maior dificuldade daquela época era o tamanho dos organismos (citado por TORTORA, FUNKE, CASE, 2017, p.36). Esses organismos eram estudados somente através de meios de cultura (TORSVIK; OVREAS, 2002, p.240). Todavia os meios de cultura possuem suas limitações, devido ao grau de seletividade de cada microorganismo, e também pela capacidade desses microorganismos serem cultiváveis ou não no ambiente (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004, p.15).

Os microorganismos estão em constante evolução e durante bilhões de anos eram a única forma de vida existente no planeta (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004, p.30; ALTERTHUM, 2008, p. 7). Devido esta constante evolução, esses organismos desenvolveram diversas adaptações a diversos tipos de ambientes, como consequência, a diversidade genética que abrange esses organismos é maior do que qualquer outro grupo de organismo existente. A rica diversidade química e

molecular dos microorganismos representam uma peça chave nos processos ecológicos, como nos ciclos biogeoquímicos na cadeia trófica, além das associações vitais com outros organismos (HUNTER-CEVERA, 1998, p. 278).

Os microorganismos compreendem um grupo muito numeroso, porém o conhecimento sobre esse grupo ainda é pequeno. São descritos aproximadamente 47.000 fungos, 30.000 protozoários, 26.000 algas, 5.000 bactérias e 1.000 vírus. O que representa em pelo menos 10% das espécies microbianas existentes (WILSON, 1988, p. 4; ROSSELLÓ-MORA; AMMAN, 2001, p.40).

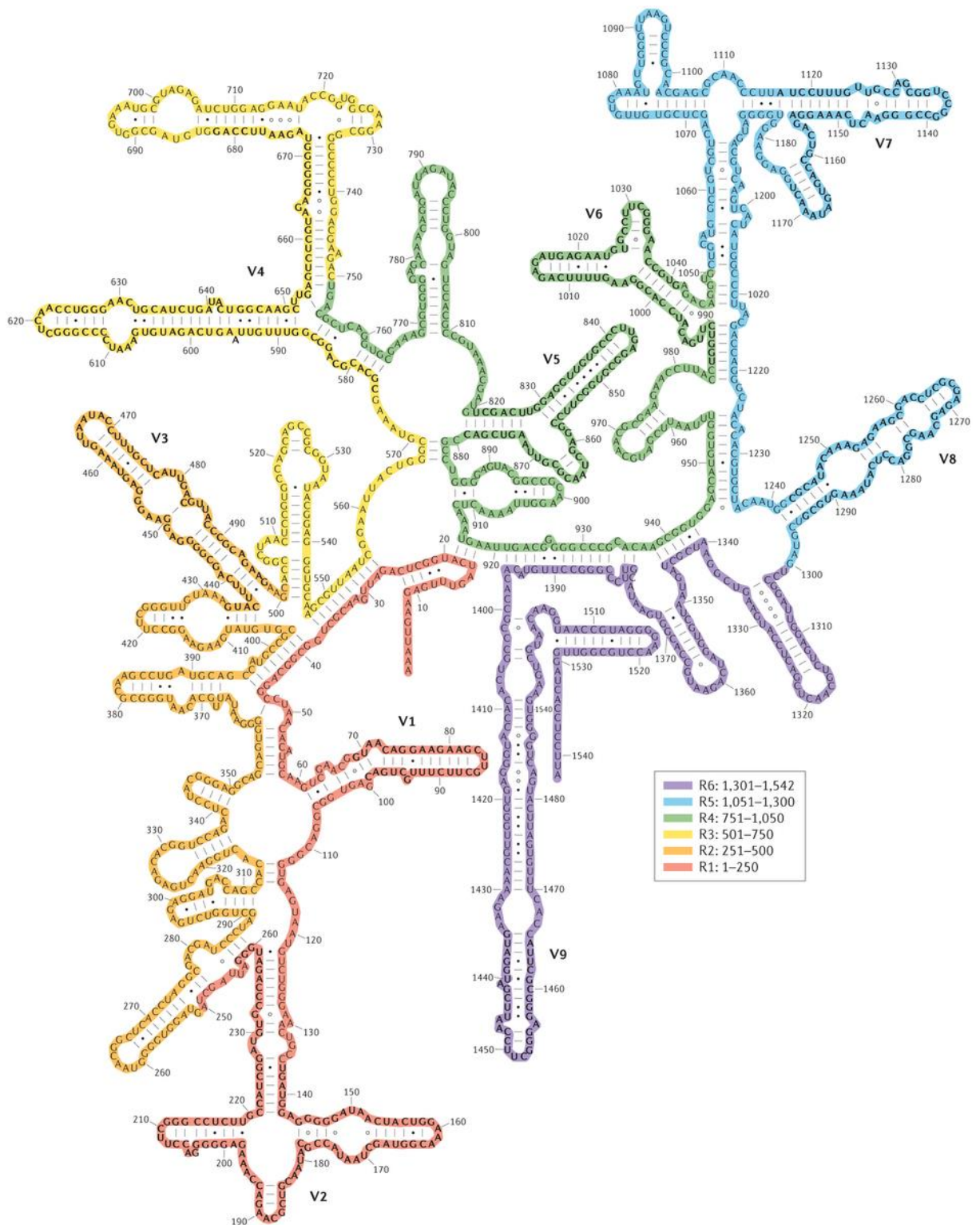
As bactérias são capazes de utilizar variados nutrientes como fonte de carbono e de energia e apresentam resistência a temperaturas muito variadas. Isso explica a possibilidade de sua existência em diversos ambientes ou até em ambientes muito extremos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2015, p. 297).

Os estudos da biologia molecular dos microorganismos trouxeram grande avanço no estudo da diversidade microbiana, no entanto esses estudos só ganharam maior importância a partir da década de 80, nos estudos de Stackebrandt e colaboradores (1985), que demonstraram o uso do rDNA ribossômico 16S como base para os grupos bacterianos (ZILLI *et al.*, 2003, p.392). O DNA na genética bacteriana foi estudada por Oswald Avery, Colin MacLeod e Maclyn McCarty, com pesquisas desenvolvidas no Instituto Rockefeller, em estudos com a bactéria responsável pela pneumonia, a pneumococos (citado por PELCZAR *et al.*, 2005, p.24). As bactérias estão presentes em todas as formas de vida, elas possuem esporos que as tornam resistentes a variados ambientes, e sua divisão é por fissão e não por mitose, o que possibilita seu vasto número celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2015, p.291). As células procariontas também possuem os plasmídios, o que possibilita a transferência para os cromossomos de uma forma facilitada, o que aumenta a sobrevivência das bactérias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2015, p.292). Dentro do grupo das bactérias destacam-se as Cianobactérias “algas azuis” que possuem capacidade fotossintética e são capazes de fixar o nitrogênio (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004, p.399-402).

O DNA nos procariontes é uma macromolécula em forma de dupla fita circular, com seu comprimento em aproximadamente 1,1 milímetros (DE ROBERTIS; HIB, 2006, p. 246; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2015, p.298). O RNA dos procariontes possui três propriedades que distingue o DNA, assim como nos eucariontes: são unifilamentares, com a presença de ribose e contem a uracila no lugar da timina. As

ribossomas ficam no protoplasma da célula, e possuem 25 milímetros de diâmetro, compostas por ácidos ribonucléicos (RNA) e proteínas, e são responsáveis pela síntese proteica. Estão presentes também no citosol, nas mitocôndrias e nos cloroplastos das células procariotas (BROWN, 1999, p.130). Os RNA mensageiros e transportadores se diferem também daquelas características dos organismos eucariontes, geralmente realizando processos mais simples que nas células eucariotas (DE ROBERTIS; HIB, 2006, p. 251). Os ribossomos catalisam a síntese das proteínas usando seqüências de nucleotídeos das moléculas de RNA mensageiro para especificar a seqüência de aminoácidos (POLLARD; EARNSHAW, 2006, p.135). O RNA ribossômico forma parte da estrutura do ribossomo e é muito estável quando comparados com outras moléculas. O gene selecionado para estudos bacteriológicos é o gene do RNA ribossômico 16S (PACE; OLSEN; WOESE, 1986, p.325). O fragmento 16S possui 1.541 nucleotídeos e foi descrito a partir de *E. Coli*. (FIGURA 1). Porém o RNA ribossômico dos procariontes possui 2 subunidades: a menor com apenas uma molécula de rRNA (16S + 21 políptideos) e a molécula maior com duas moléculas de rRNA (23S e 5S + 34 políptideos) (BROWN, 1999, p. 130; ALBERTS *et al.*, 2011, p.124).

FIGURA 1 – DIAGRAMA DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA PARA UMA SEQUÊNCIA REPRESENTATIVA DA MOLÉCULA 16S BACTERIANA DE *Escherichia coli*.



2.3 TÉCNICAS MOLECULARES PARA O ESTUDO DA MICROBIOLOGIA

As técnicas moleculares utilizadas hoje para obtenção da diversidade microbiana se baseiam na investigação da parte da sequência do DNA, através do gene 16S rDNA para bactérias, onde por PCR é possível amplificar o DNA bacteriano do produto extraído. A partir da amplificação é possível obter um perfil da comunidade bacteriana existente por meio das técnicas ARDRA, (Amplified Ribosomal DNA restriction Analysis), T-RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), RISA (ribosomal intergenic spacer analysis)), DGGE-TGGE (Electrophoretic separation using a denaturing gradient) e a técnica de hibridização FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000, p. 168; KOZDRÓJ; VAN ELSAS, 2001, p. 199; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2015, p.286). Uma das técnicas mais utilizadas nos estudos de diversidade microbiana é a técnica ARDRA, que se caracteriza pela digestão por enzimas de restrição dDNA amplificado por PCR, seguida de uma separação eletroforética dos fragmentos, em gel de agarose ou poliacrilamida (LAGUERRE, *et al.*, 1994, p.56; ALBERTS *et al.*, 2011, p.36). Na técnica ARDRA, o uso de diversas enzimas é necessário, pois o sítio de corte específico da enzima pode não ser suficiente para a discriminação de diferentes espécies. Essas enzimas também são chamadas de endonucleases de restrição, elas podem reconhecer entre 4 e 6 nucleotídeos (DE ROBERTIS; HIB, 2006, p. 375).

A técnica T-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism) está associada a técnica ARDRA, ela é bastante promissora para análise de comunidades microbianas, tendo uma alta resolução e habilidade para incluir um grande valor padrão em cada amostra. A capacidade do T-RFLP de analisar variações entre rRNA 16S amplificado de diferentes bactérias e obter informações sobre a estrutura da comunidade foi demonstrada por Liu *et al.* (1997, p.417) e Clement *et al.* (1998, p.135). Bruce (1997, p.4914) explorou o método para analisar diversos genes resistentes ao mercúrio em solos poluídos. Mais recentemente, o T-RFLP tem sido usado para estudar bactérias (LIU *et al.*, 1998, p.417), o grupo arquea (VAN DER MAAREL *et al.*, 1998, p.899) e eucaria (MARSH *et al.*, 1998, p.455) em habitats naturais.

2.4 ASSOCIAÇÃO BACTÉRIA-MICROALGA

Segundo Riqueme e Avedaño-Herrera (2003, p.725) uma das principais aplicações das interações entre as bactérias e as microalgas é no controle dos blooms fitoplantônicos, onde as bactérias interagem no controle das microalgas, principalmente nas diatomáceas. Outra importância é na aquicultura, que em estudos realizados por Brown e colaboradores (1996, p.341) um bivalve alimentado com microalga e bactéria associada, cresceu muito mais do que quando alimentado somente com microalgas. Sendo assim, as microalgas também podem utilizar o produto das bactérias que estão em suspensão no meio de cultivo, assim potencializando seu crescimento. Segundo Fuentes e colaboradores (2016, p.3) as principais associações entre as microalgas e as bactérias são o mutualismo, o comensalismo, o parasitismo. No mutualismo, por exemplo, as bactérias suprem a vitamina B₁₂ para microalgas, que fixam o carbono que é essencial às bactérias. Kazamia e colaboradores (2012, p.1466) reproduziram culturas da microalga *Lobomonas rostrata* e da bactéria *Rhizobium loti* dependentes de vitamina B₁₂. Eles foram cultivados juntos em um meio de cultura que inicialmente não tinha vitamina B₁₂ e nem uma fonte de carbono orgânico, impossibilitando o crescimento dos organismos, mesmo assim conseguiram se desenvolver normalmente. Cho e colaboradores (2015, p.481) demonstraram que, quando algumas algas são cultivadas em associação com bactérias mutualistas, elas fornecem carbono orgânico e as bactérias conseqüentemente fornecem compostos orgânicos que podem ser metabolizados pelas algas. Segundo Amin e colaboradores (2009, p.17071), algumas microalgas, tal como a *Scrippsiella trochoidea* usa os sideróforos bacterianos, que são produzidos por algumas bactérias, que transformam o Fe (III), tornando-o disponível para as microalgas e bactérias. Posteriormente, as microalgas usam esse ferro nos processos de fixação de carbono inorgânico, o que em parte volta para o ambiente e será usado pelas bactérias. Segundo Santos e Reis (2014, p.5839) a bactéria *Azotobacter vinelandii* produz os sideróforos para o gênero de microalgas *Scenedesmus sp.*

Em estudos realizados por Leyva e colaboradores (2014, p.819) *Chlorella vulgaris*, em condições heterotróficas, mostrou um aumento na acumulação de

ácidos graxos e lipídios totais quando associada com a bactéria *Azospirillum brasilense*, que é uma bactéria promotora de crescimento em plantas superiores.

Segundo Forján e colaboradores (2015, p.1705), os efeitos prejudiciais das bactérias sobre o crescimento da biomassa microalgal, principalmente com baixo ou mesmo nenhum controle microbiano pode resultar em menor densidade de células de algas, em comparação com cultivos teoricamente puros. Em culturas de alta densidade celular, pode-se esperar que a presença de bactérias reduza a disponibilidade de luz, o que também diminuirá a quantidade de carotenóides e ácidos gordurosos, que exigem o fornecimento de maior irradiação de luz. Devido a isso deve-se obter o controle microbiano do cultivo para controlar sua abundância.

Segundo Liu e colaboradores (1997, p. 4516) a técnica ARDRA fornece adjuntos poderosos às técnicas dependentes de cultura. Uma abordagem em particular que os pares PCR e a filogenia baseada em rRNA tem sido eficaz na exploração de ambientes microbianos e na identificação de organismos não cultivados. Pois isolar o DNA da comunidade total e usar esse DNA como um modelo para amplificação por PCR de genes 16S rRNA com *primers* específicos, possibilita demonstrar a riqueza e a uniformidade de uma análise qualitativa da comunidade, sendo estimado com base no número de clivagens únicas e nas frequências relativas dos vários "ribotipos" detectados. Porém ARDRA é de uso limitado para demonstrar a presença de grupos filogenéticos específicos ou para estimar a diversidade e uniformidade das espécies. O autor combinou várias enzimas, tais como HhaI plus HaeIII, HhaI plus MspI ou HhaI plus RsaI, para obter o padrão filogenético, porém com as combinações as sequências produziram um número muito menor, do que se realizadas com as enzimas isoladas, porém a combinação de enzimas é importante para taxonomia, como no trabalho de Heyndrickx e colaboradores (1996, p.247) a técnica ARDRA também pode ser utilizada para se obter a filogenia e taxonomia de bactérias. Ele demonstrou que a técnica baseada na combinação de 5 enzimas restritivas com dois grupos distintos de enzimas (A= Hae III+Hha I+ALU I+ Taq I + BstU I e B= hae III + Dpn II +Rsa I + Bfa I + Tru 9 I) foram confiáveis e valiosas para estudos filogenéticos e taxonômicos de grandes grupos taxonômicos. Uma vantagem importante do ARDRA sobre o sequenciamento de rDNA ou rRNA 16S é o resultado ser rápido comparado a outras técnicas.

Em estudos sobre a diversidade genética e a caracterização de bactérias ligadas a duas espécies de plantas tolerantes ao cobre, Sun e colaboradores (2009, p.501) conseguiram identificar 20 padrões ARDRA de restrição diferentes, após a digestão do rDNA 16S amplificado com enzimas restritivas MspI e HaeIII, o que permitiu uma identificação, de que os isolados resistentes ao cobre pertenciam a três grandes grupos: Actinobacteria (15.6%), Firmicutes (37.5%) e Proteobacteria (46.9%). A ARDRA também pode diferenciar espécies, como no trabalho de Oliveira e Costa (2002, p.631), no qual utilizou ARDRA para caracterizar espécies de *Fusarium spp.* patogênicas e não patogênicas. Onde foi analisada a região ITS1 – 5,8S rDNA – ITS2, que foi amplificada com os primers ITS5 e ITS4. Os produtos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição HaeIII e MspI. O melhor resultado foi para a enzima Hae III permitiu diferenciar três grupos com 100% de similaridade entre os 11 isolados estudados.

A técnica ARDRA é uma técnica que permite avaliar a diversidade de organismos, como no estudo de Liu e colaboradores (1997, p.4516) em seu trabalho sobre caracterização da diversidade microbiana em vários ambientes, através da técnica T-RFLP (Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms), que compreende outra titulação dada a técnica ARDRA. A T-RFLP apresentou 72, 61, 45 e 61 padrões únicos para as enzimas Hha I, Msp I, Rsa I e Hha I+Msp I, respectivamente. Essa técnica além de estimar a riqueza de espécies ou a biodiversidade, o padrão de comunidade do T-RFLP pode ser visto como impressão digital de uma comunidade utilizado para identificar diferenças e igualdades. Liu e colaboradores (1997, p.4516) e Bruce (1997, p.4914) trataram também da possibilidade do T-RFLP de proporcionar uma análise semi-quantitativa da proporção relativa de genótipos dominantes dentro de uma comunidade microbiana, porém deve-se supor as falhas e as tendências ligados ao processo da PCR.

Quanto maior o número de enzimas na ARDRA, melhores serão os resultados, porém as enzimas possuem um custo alto e na maioria dos trabalhos são escolhidas de acordo com seu valor no mercado. Como por exemplo, no trabalho de Roy e Sirois (2000, p.17), que precisavam de um perfil de restrição para ter uma diferenciação entre algumas espécies próximas. Eles mostraram a diferenciação entre *Bifidobacterium. animalis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium adolescentis* após uma amplificação da região de 914pb do gene

16S rRNA, utilizando a restrição com Bam HI, Sau 3AI e Taq I. Só com a enzima Sau3A1 conseguiram a diferenciação, pois as demais forneceram estirpes idênticas das espécies. A enzima Nci I, por exemplo, é utilizada para distinguir entre *B. animalis* e *B. lactis*. Existem muitos métodos moleculares para identificação, caracterização e detecção de *Bifidobacterium* e muitas dessas técnicas baseiam-se no gene ribossomal 16S. PCR e ARDRA são dois métodos fáceis e sensíveis para a detecção e identificação de diversos gêneros e espécies.

Os trabalhos sobre diversidade bacteriana associada aos cultivos de microalgas, em sua maioria, são trabalhos bem recentes, como o trabalho de Biondi e colaboradores (2016, p.1), foram isoladas colônias de bactérias do cultivo da microalga *Tetraselmis suecica* durante as estações do ano. O T-RFLP também foi feita com *T. suecica*, com a enzima F&M-M33 para avaliar a possível interferência da amplificação de genes rRNA 16S da microalga. O resultado identificou que as bactérias associadas ao cultivo, que foram cultivadas no meio externo (ambiente livre) foram menores que as bactérias associadas aos cultivos, que foram realizados em laboratório. No cultivo externo, a maior abundância de bactérias ocorreu no inverno, quando a diluição do cultivo era menos frequente devido ao menor crescimento. Analisando 152 amostras isoladas de CfoI e HaeIII, identificou-se 16 tipologias de colônias, resultando em 36 grupos ARDRA distintos. O maior número de grupos ARDRA foi identificado no outono, enquanto que o menor foi no inverno e verão. A cultura laboratorial apresentou 9 grupos. O número total de ribotipos encontrados com 3 enzimas (HaeIII, CfoI e MspI) foi maior no laboratório do que no cultivo externo. Verão e primavera foram as estações mais ricas em ribotipos. Neste trabalho foi utilizado o coeficiente de similaridade de Sorensen, que identificou que as comunidades associadas ao cultivo externo tinham maior similaridade do que as de laboratório. Entre as estações, a maior similaridade ficou entre primavera e verão. Nesse trabalho, foi encontrada uma comunidade bacteriana rica e complexa taxonomicamente, associada com *T.suecica*. *Tetraselmis* spp. (TULLI *et al.*, 2012, p.190).

Outros trabalhos com técnicas diferentes já foram realizados no estudo de *Scenedesmus* spp., como no trabalho de Greses e colaboradores (2017, p.121), que caracterizaram a comunidade microbiana durante a digestão anaeróbia de *Scenedesmus* spp. através de um biorreator de membrana anaeróbica mesófila (AnMBR) e um reator de tanque de agitação contínua termofílica (CSTR). A análise

de seqüenciamento de 16S rRNA foi realizada quando o AnMBR obteve 70% de biodegradação de algas e revelou alta diversidade microbiana, provavelmente devido à alta retenção de sólidos. No estudo de Schwenk, Nohynek e Rischer (2014, p.356), que também trabalharam com *Scenedesmus obliquus* e outras espécies de microalgas, quarenta cepas bacterianas cultiváveis visualmente distintas foram isoladas de quatro países do Báltico culturas de microalgas, e foram mantidos por vários anos em o laboratório. Os isolados bacterianos foram caracterizados em relação à morfologia, susceptibilidade a antibióticos e seqüência de DNA ribossomal 16S. Foram encontradas 17 cepas únicas dos isolados.

Poucos trabalhos com *P. tricornutum* e *Scenedesmus obliquus* foram realizados para mensurar a diversidade bacteriana através de técnicas moleculares, pois o avanço vem sendo trabalhado atualmente. No entanto, o estudo da diversidade bacteriana associada aos cultivos de microalgas vem se demonstrando muito eficiente.

3. METODOLOGIA

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Os cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* (PTR) e *Scenedesmus obliquus* (SAC) foram desenvolvidos a partir do meio Conway, sendo LCA-AM e LCA-AD rotineiramente utilizados no Laboratório de Cultivos de Algas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O meio o LCA-AM é próprio para microalgas marinhas com uma solução de nitrato, de fosfato (vitaminas) e uma solução de silicato e o meio LCA-AD é próprio para microalgas dulcícolas com uma solução de nitrato, de cloreto de cálcio, de hidróxido de potássio, de sulfato de ferro, de ácido bórico e de sulfato de zinco (ANEXO 1). A água empregada nos cultivos foi previamente tratada num sistema contendo filtros de discos e de cartuchos com porosidade decrescente (5,0 até 0,5µm) e aplicação de luz ultravioleta. A água e os meios de cultura foram esterilizados em autoclave á 125°C numa pressão de 1,3 Kgf cm⁻² por 30 minutos, em seguida foram mantidas em ambiente asséptico, no escuro

numa temperatura de 22°C durante 2 dias. As culturas microalgais foram desenvolvidas em frascos cilíndricos de vidro borossilicato contendo 1,8 L de meio de cultivo, com agitação constante por borbulhamento com ar atmosférico enriquecido com 0,5% de CO₂. A iluminação foi mantida em 250 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em fotoperíodo integral (24:0) com uma luminária de 40 W, a temperatura ambiente foi controlada em 24 \pm 1°C. Com o auxílio de microscópio óptico e Câmara de Neubauer, o crescimento das culturas de microalgas foi determinado pelo incremento diário da densidade celular por meio da elaboração das curvas de crescimento. As amostras foram retiradas em três momentos da curva de crescimento como, T1: 24 horas após a inoculação, T2: na fase exponencial e T3: na fase estacionária. Adicionalmente foram amostrados os T0: inóculos dos cultivos. Para as análises foram coletados 50 mL de e posteriormente congelados. Os cultivos foram realizados em triplicatas, durante 15 dias.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

As espécies de microalgas foram identificadas por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) pela amplificação parcial RNA Ribossômico 18S e posterior sequenciamento. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis na base mundial de dados genéticos GENBANK e identificadas como *Scenedesmus obliquus* e *Phaeodactylum tricornutum* (GENBANK, 2017).

3.3 DIVERSIDADE BACTERIANA

A diversidade microbiana foi caracterizada através do método ARDRA (Análise de Restrição do DNA Ribossomal), através da amplificação do gene **16S** (regiões 27F e 1492R para amplificação de 1500 pb). O gene amplificado foi submetido a cinco enzimas de restrição: HaeII, HaeIII, MspI, RsaI e Hsp92II.

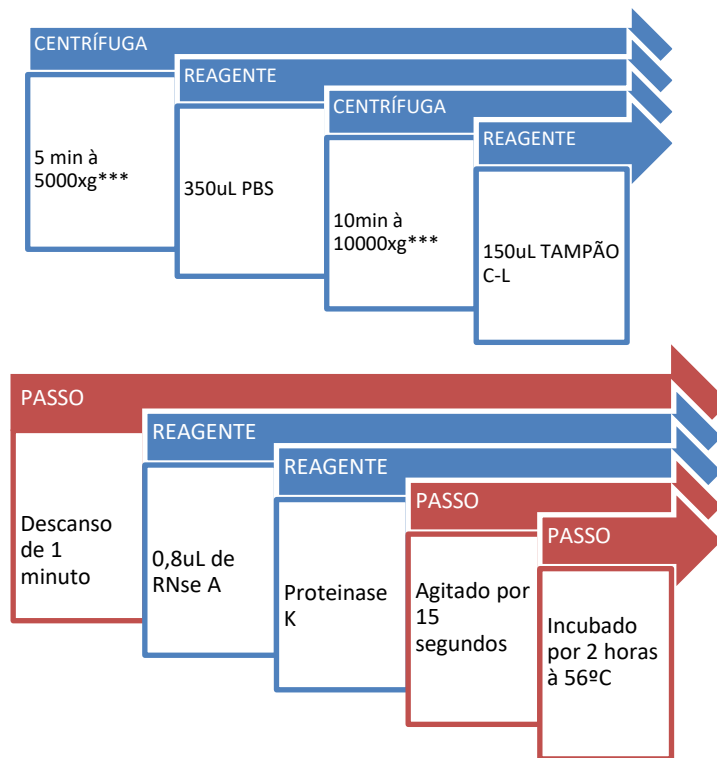
3.3.1 Coleta das Amostras

Para cada espécie foram retiradas três amostras de 50 ml do meio de cultivo em três períodos das fases da curva de crescimento. Foram três réplicas biológicas para cada um dos três momentos da curva de crescimento fase inicial (T0 – 24 horas após a inoculação), fase exponencial (T1) e fase estacionária final (T2) para as duas espécies, mais uma amostra do inóculo para cada espécie, totalizando 10 amostras para cada espécie. As amostras foram centrifugadas a 4800xg. durante 5 min. A biomassa foi ressuspensa em 5 mL de álcool etílico e as amostras foram transportadas congeladas do Laboratório de Algas (UFSC) para o Laboratório de Genética (UFPR).

3.3.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada conforme o protocolo AxyPrep descrito pelo fabricante AxygenBiosciences “*III. Purificação de DNA Genômico a partir de Cultura Celular de Animais, Linfócitos, Medula e Ossos (protocolo por centrifugação)*”. Para extração do DNA foi utilizado 2 mL de cada amostras de acordo com protocolo AxyPrep, para purificação de DNA genômico a partir de cultura celular utilizando o protocolo de centrifugação. Após, foi realizado a quantificação do DNA pelo espectrofotômetro para DNA Eppendorf para confirmação da extração do DNA. As amostras foram levadas à centrífuga e adicionado os reagentes conforme figura abaixo:

FIGURA 2. CICLOS DE REAGENTES PARA REALIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO. (**xg é a força da centrifugação equivalente a vezes(x) a força gravitacional da terra).



FONTE: O autor (2017).

O sobrenadante foi sempre despejado e após adicionado o próximo reagente, que sempre foi passado no vórtex para melhor homogeneização. A incubação no final dos processos é realizada para ocorrer lise nas células. Após o período de incubação foram adicionados os reagentes segundo tabela 2.

TABELA 2. CICLOS DE REAGENTES PARA REALIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO. (**xg representa em vezes a força gravitacional da Terra; **O sobrenadante que resulta do processo de centrifugação deve sempre ser retirado para a adição do próximo reagente, somente no uso da coluna Spin/Vac deve ser usado o sobrenadante, pois nesse passo troca-se de recipiente. A coluna serve como filtro para retirar vários resíduos que estão presentes no processo da extração).

Passo dos Reagentes	Centrifugação
350ul de tampão P-D	centrifugado por 10min à 12000xg***.
Depois foi utilizado o filtro Spin/Vac** (neste filtro foi colocado o sobrenadante que resultou da etapa anterior)	centrifugado por 1 min. à 12000xg***.
Adicionado 500µl de W1 e	centrifugado por 1 min. à 12000xg***.
Adicionado de 700µl de W2 e	centrifugado por 1 min à 12000xg***. (processo repetido 1 vez para melhor lavagem).
50 µl de Eluente, que foi previamente aquecido à aproximadamente 65°C	após foi colocado em repouso por 1 minuto e centrifugado por 1 min à 12000xg***.

FONTE: O autor (2017).

3.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Para amplificação do DNA foi utilizado um volume de reação de 25 µl, contendo 23µl da solução tampão Master Mix (5X), 0,2 µl de Taq Polimerase 5U.µl-1, 0,25µl dNTP 10mM, 0,1µl de cada primer Forwardoverhang e Reverse overhang, 0,3 µl MgCl₂-25mM e 19,15 µl de água miliQ estéril, conforme a tabela 3.

Os primers escolhidos para a amplificação do DNA bacteriano (TABELA 3), foram as regiões do RNA ribossômico 16S (1492R e 27F), onde podem amplificar praticamente o seguimento 16S todo com aproximadamente 1500pb.

TABELA 3. SOLUÇÕES PARA PREPARAÇÃO DO MIX DE REAGENTES PARA REALIZAÇÃO DA TÉCNICA PCR.

Volume	Produto
5µl	Solução tampão Master Mix (5X)
0,2 µl	Taq Polimerase 5U.µl-1
0,25µl	dNTP 10mM
0,1µl	Primer 16S 27F
0,1µl	Primer 16S 1492R
0,3 µl	MgCl ₂ 25mM

18,05 µl	Água miliQ estéril
2µl	Amostra de DNA

FONTE: O autor (2017).

Para a amplificação do DNA, foi utilizado o termociclador na seguinte programação:

TABELA 4. CICLOS DE TEMPERATURA PARA REALIZAÇÃO DA TÉCNICA PCR.

Sequência da dupla fita de DNA	Temperatura	Duração
Desnaturação inicial	94°C	5 min.
30 ciclos de desnaturação	94°C	30 seg.
Anelamento dos primers	58°C	1 min.
Extensão da fita de DNA	72°C	2 min.
Extensão final	72°C	7 min.

FONTE: O autor (2017).

3.3.4 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado - ARDRA

Para análise de restrição foi utilizado o método da Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), em um volume de 30 µl contendo 3 µl de tampão de incubação (MultiCore 10X Promega), 0,5 µl de cada enzima de restrição 5U.µl-1, 15 µl do produto do PCR não purificado e 11 µl de água miliQ estéril, após a mistura será incubado a 37°C por 4 horas, conforme tabela 4. As enzimas de restrição possuem sítios de cortes específicos conforme tabela 5.

TABELA 5. ENZIMAS DE RESTRIÇÃO COM SEUS RESPECTIVOS SÍTIOS DE CORTES ESPECÍFICOS

Enzima	Sítio de Corte	Temperatura de Incubação	Tampão de Incubação
HAEII	5'GCGC3'	37°C	B
HAEIII	5'GCCC3'	37°C	C
MSPI	5'CCGG3'	37°C	B
RSAI	5'GTAC3	37°C	C
HSP92II	5'CATG3'	37°C	K

FONTE: O autor (2017).

As enzimas com cortes específicos foram utilizadas de acordo com os padrões solicitados do fabricante (Promega). Para análise dos padrões dos fragmentos de restrição foi utilizado mix de reagentes (TABELA 6) e os resultados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3% e em gel de poliacrilamida em condições de corrida de 100V durante 90 minutos.

O tamanho molecular dos produtos de digestão foi determinado através da utilização do marcador GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use.

TABELA 6. SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA PREPARAÇÃO DO MIX PARA REALIZAÇÃO DA TÉCNICA ARDRA.

Volume	Produto
3 µl	Tampão de incubação (MultiCore 10X Promega)
5 µl	Cada enzima de restrição (HaeII, Hae III, MspI, RsaI, Hsp92II)5U.µl-1
15 µl	Produto da PCR não purificado
11 µl	Água miliQ estéril

FONTE: O autor (2017).

3.3.5 Visualização em Gel de Poliacrilamida e Gel de Agarose

3.3.5.1 Visualização em Gel de Poliacrilamida

A visualização dos resultados obtido pelo gel de poliacrilamida (TABELA 7), foi preparado conforme tabela 5, onde a coloração e revelação foi a partir do protocolo padrão, onde o gel foi retirado e lavado com água destilada, após lavado com ácido nítrico (HNO₃) à 1% para fixação das bandas por 1 minuto, após colocado na solução de Nitrato de Prata (AgNO₃) por 10 minutos. Após colocado na solução de Carbonato de Cálcio (Na₂CO₃) com formol e agitado até aparecer as bandas. Logo após a solução de glicerol 5% por 10 minutos para hidratação e clarear o gel.

TABELA 7. SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA PREPARAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA.

Volume	Produto
3,85 ml	Solução de Acrylamida
1,6 ml	Solução de TRIS
4,6 ml	H ₂ O Mili-Q
70 µl	Persulfato de Amônia
7,35 µl	TEMED

FONTE: O autor (2017).

3.3.5.2 Visualização em Gel de Agarose

Para a análise dos produtos de PCR em géis de agarose, a concentração do gel deve ser escolhida de acordo com o tamanho do produto amplificado. Como por exemplo para o produto da PCR pode ser o gel de agarose a 1%: 0,3 g de agarose para 30 mL de gel, que deve ser preparado com tampão tris–borato–EDTA 1. Para isso, aplicar 5 µL de produto de amplificação + 1 µL de loading buffer (tampão de corrida). Já para os resultados das digestões com enzimas de restrição da técnica ARDRA foi utilizado o gel de agarose a 3%: 0,9 g de agarose de baixo ponto de fusão para 30 mL de gel, que deve ser preparado com tampão tris–borato–EDTA 1. Neste último caso, foi aplicado todo o produto da digestão (13 µL) + 3 µL de loading buffer.

3.3.5.3 Eletroforese

Os produtos da PCR foram obtidos utilizando o método de separação eletroforese horizontal, para o gel de agarose 1% as condições de corrida foram de 60V por 50 minutos, e para o gel de agarose 3% foram de 60V por 1 hora e 30 minutos, e após visualizados utilizando Syber Green em Transluminador com auxílio da ultravioleta. Já o gel de poliacrilamida foi submetido as condições de corrida vertical em 60v por 1 hora e 30 minutos.

3.3.6 Parâmetros Analisados

Os padrões de migração das bandas geradas resultantes da restrição enzimática foram comparados e as semelhanças estimadas pelo Índice de Similaridade de Jaccard ($IJ = 100 * (c/a+b-c)$), onde “a e b” representam o número de bandas de cada amostra sendo o “c” o número comum de bandas entre elas. O índice de Similaridade de Jaccard mensura a similaridade pela distância entre as amostras tomando elas par a par. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação da similaridade entre as fases do cultivo. Havendo diferenças significativas o teste de Mann-Whitney foi usado para testar entre as amostras a significâncias par a par.

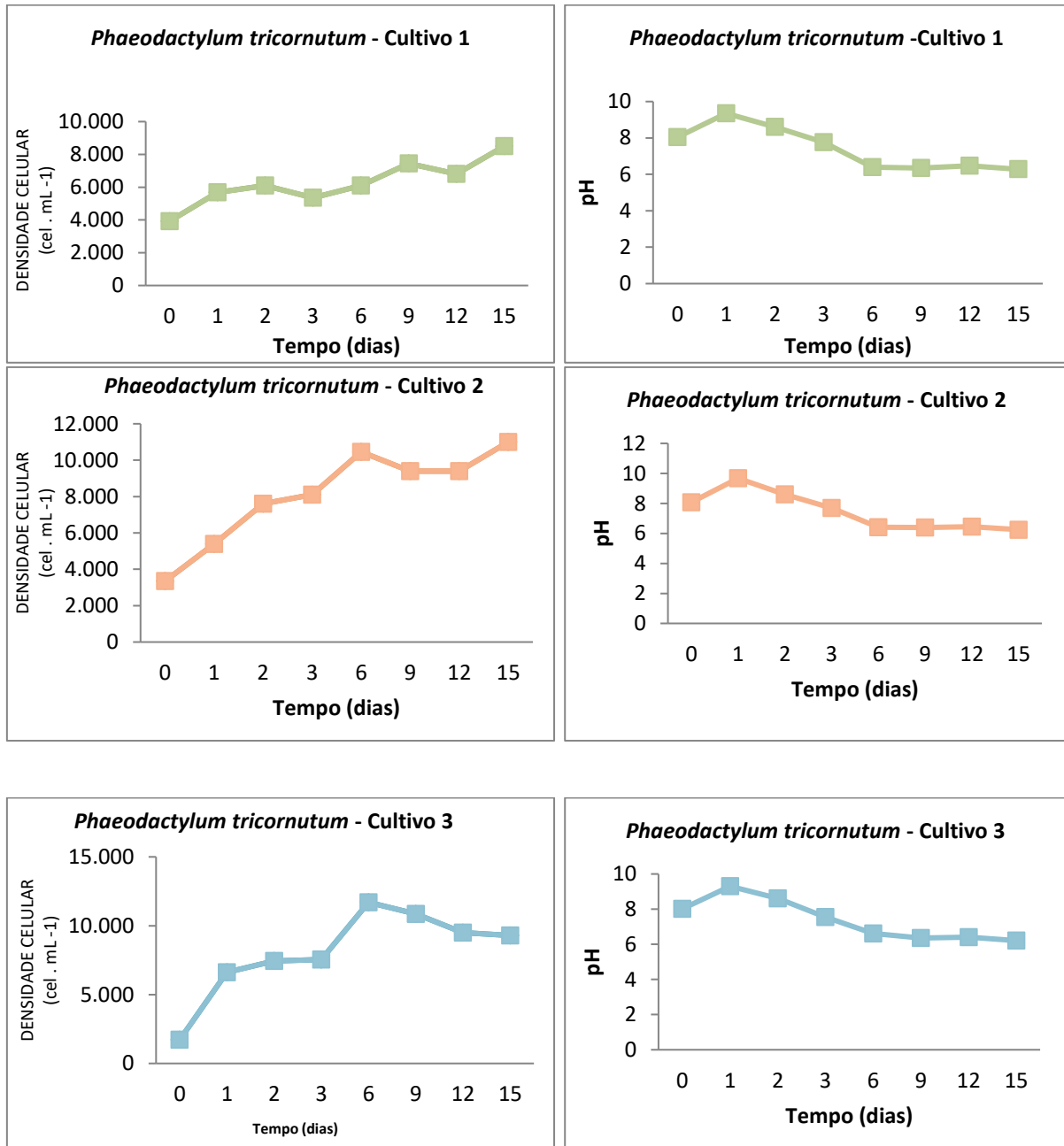
A diversidade bacteriana foi analisada através do número de bandas representado pelos possíveis padrões ARDRAS diferentes.

4. RESULTADOS

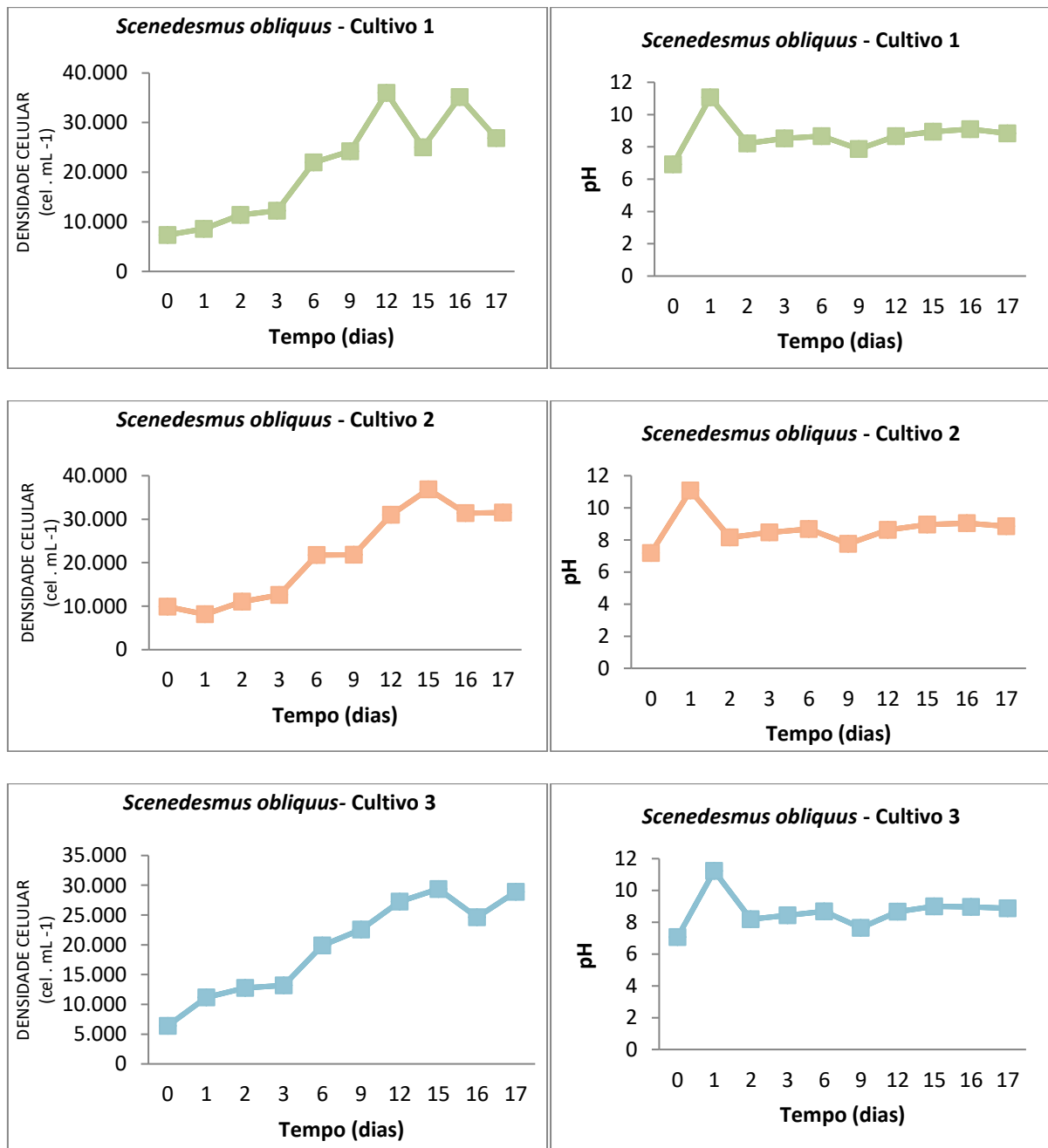
4.1 PARÂMETROS DOS CULTIVOS DAS MICROALGAS

Os cultivos de *P. tricornutum* e *S. obliquus* alcançaram os resultados esperados, que evidenciaram um ritmo de crescimento com o padrão clássico da curva de crescimento para esses organismos encontrados na literatura, como podem ser observados na figura 3 e 4.

O pH nos três cultivos quanto para *P. tricornutum* tanto para *S. obliquus*, mantiveram-se semelhantes (FIGURA 3 e 4). O pH no cultivo de *P. tricornutum*, iniciou básico (8), depois diminuiu até o sexto dia, tornou-se ácido (6) e se manteve assim até o fim do cultivo. Já o pH no cultivo de *S. obliquus*, iniciou neutro (7), logo nas primeiras 24 horas teve uma elevação significativa, tornando-se básico (11), após o segundo dia permaneceu básico (em média 8) até o fim do cultivo.

FIGURA 3 DENSIDADE CELULAR E pH DE *P. tricorutum* PARA OS TRÊS CULTIVOS.

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 4. DENSIDADE CELULAR E pH DE *S. obliquus* PARA OS TRÊS CULTIVOS.

FONTE: O autor (2017).

A quantificação do DNA é utilizada para avaliar a qualidade do DNA extraído. Segundo Rosa (2006) a leitura pelo espectrofotômetro das razões entre 260/280 e 260/230, pode identificar a contaminação das amostras por proteínas, fenóis e outros contaminantes. A razão 260/280 indica a contaminação por proteínas, onde se o DNA extraído estiver entre os valores 1,8 e 2,0 não há contaminação por proteínas. A razão 260/230 é a relação de absorvância que entre os valores 1,8 e

2,2 indica que não há contaminação por fenóis ou por algum outro tipo de contaminante (SILVA, 2015). No entanto, mesmo com contaminação de todas as amostras (TABELA 8), a contaminação não foi capaz de inibir a amplificação do DNA bacteriano (FIGURAS 5 e 6).

Na amplificação do DNA bacteriano através dos primers 27F e 1492R foram amplificados os 1500pb (pares de base) para os cultivos de *P. tricornutum* (FIGURA 2) e *S. obliquus* (FIGURA 3), o que praticamente representa todo o comprimento do gene, que é de 1542pb (pode ser verificado na figura 1) resultando numa maior confiabilidade nos resultados da restrição.

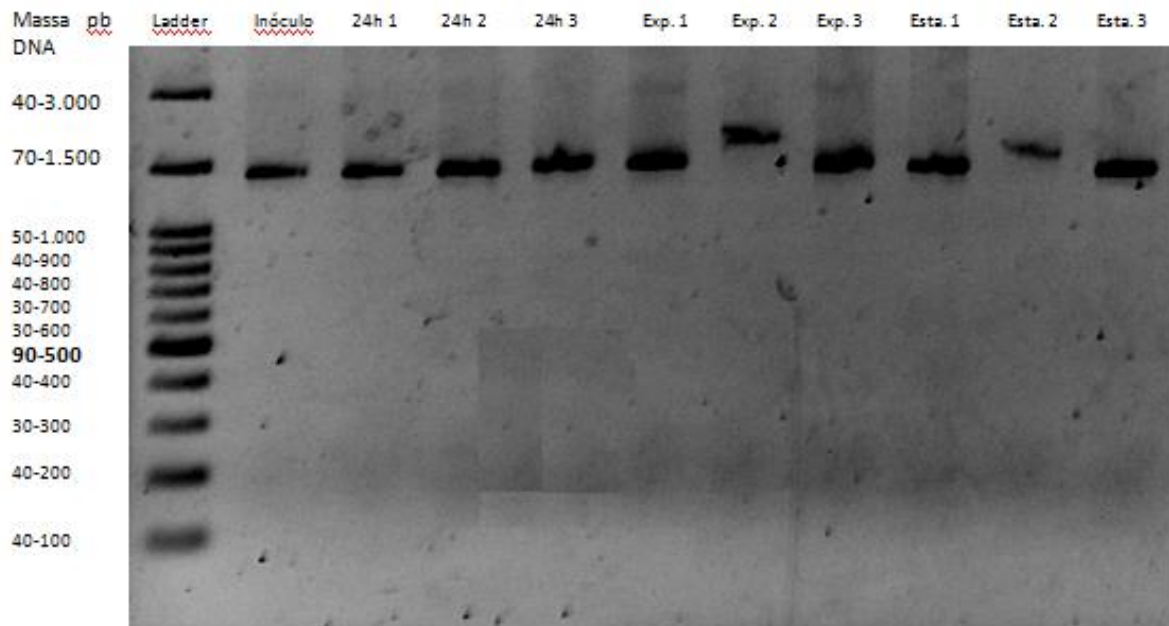
TABELA 8. QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO DOS CULTIVOS. P (*Phaeodactylum tricornutum*); S (*Scenedesmus Obliquus*); 24h (24h após o inoculo); Exp (Fase exponencial); Esta (Fase estacionária); [] µg/ ml (concentração de microgramas por mililitro); 260/280 (razão da contaminação por proteínas, onde 1,8 a 2,0 representa sem contaminantes); 260/230 (razão da contaminação por fenol ou outros resíduos, onde 1,8 a 2,2 representa sem contaminantes);*** (não foi possível fazer a razão).

Espécie/ Fase/Cultivo	[] µg/ ml	260/280	260/230
P. Inóculo	18,1	1,72	0,77
P. 24h – 1	15,6	1,63	0,76
P. 24h – 2	19	1,5	0,67
P. 24h – 3	12,1	1,7	0,4
P. Exp. - 1	22,2	1,44	0,82
P. Exp. - 2	40,1	1,27	0,64
P. Exp. - 3	22,2	1,73	0,85
P. Esta – 1	38,6	1,43	0,66
P. Esta – 2	56,3	1,32	***
P. Esta – 3	25,6	1,44	0,33
S. Inóculo	88,6	1,21	0,95
S. 24h – 1	62,1	1,07	1,02
S. 24h – 2	58,4	1,29	0,83
S. 24h – 3	110,7	1,29	0,87
S. Exp. - 1	56,2	1,69	0,91
S. Exp. - 2	73,4	1,07	0,97
S. Exp. - 3	101,2	1,6	1,06
S. Esta – 1	72,5	1,27	0,78
S. Esta – 2	55,6	1,31	0,78
S. Esta – 3	81,1	1,16	0,82

FONTE: O autor (2017).

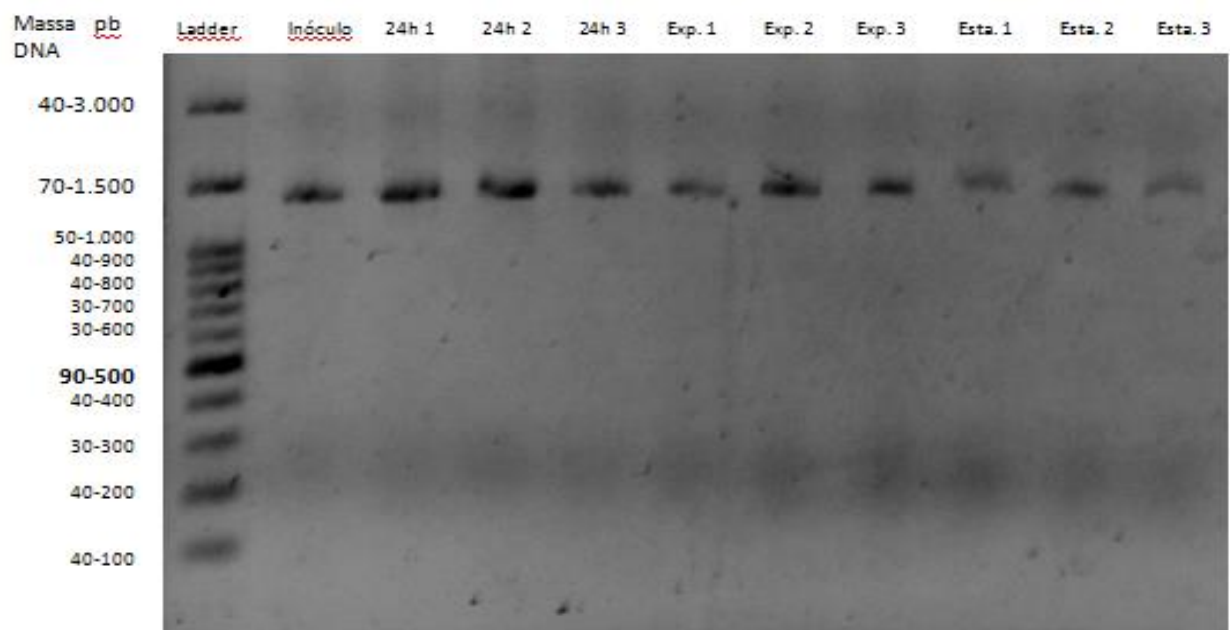
FIGURA 5. PCR REALIZADA PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA BACTERIANO APARTIR DO CULTIVO DE *Phaeodactylum tricornutum* EM GEL DE AGAROSE 1%. Massa DNA (concentração do DNA); pb (pares de bases); Ladder (marcador); Fases de Crescimento do cultivo: Inóculo (momento

da inoculação da microalga - controle), 24h (24 horas após a inoculação da microalga), Exp. (fase exponencial) e Esta. (fase estacionária); 1 (cultivo 1); 2 (cultivo 2); 3 (cultivo 3).



FONTE: O autor (2017).

FIGURA 6. PCR REALIZADA PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA BACTERIANO APARTIR DO CULTIVO DE *Scenedesmus obliquus* EM GEL DE AGAROSE 1%. Massa DNA (concentração do DNA); pb (pares de bases); Ladder (marcador); Fases de Crescimento do cultivo: Inóculo (momento da inoculação da microalga - controle), 24h (24 horas após a inoculação da microalga), Exp. (fase exponencial) e Esta. (fase estacionária); 1 (cultivo 1); 2 (cultivo 2); 3 (cultivo 3).



FONTE: O autor (2017).

4.2 RESULTADOS DA ANÁLISE BACTERIANA NOS CULTIVOS DAS MICROALGAS

Conforme os perfis eletroforéticos (ANEXO 2-12) foram encontrados para *P. Tricornutum* 9, 11, 7, 8, e 7 padrões ARDRA e para *S. Obliquus* 0, 5, 9, 10 e 6 padrões ARDRA (TABELA 9) diferentes nas três réplicas, considerando as três fases de cultivo para as enzimas HaeII, HaeIII, MspI, RsaI e Hsp92II, respectivamente.

Analisando as enzimas individualmente, a maior diversidade bacteriana observada para *P. tricornutum* foi com a enzima HaeIII (ANEXOS 3 e 4) com 11 padrões ARDRA diferentes. Com as enzimas MspI, Rsa I e Hsp92II (ANEXOS 7, 8 e 9, respectivamente) o padrão de clivagem foi semelhante ao longo das fases de crescimento. Apenas a enzima HaeII (ANEXO 2) não demonstrou nenhuma contaminação no inóculo, ou seja, esta enzima não identificou nenhum corte ou padrão ARDRA no momento de sua inoculação.

Para *S. obliquus*, a maior diversidade bacteriana observada foi com as enzimas MspI e RsaI que demonstraram 9 e 10 padrões ARDRA diferentes. Com o uso da enzima HaeII (ANEXO 8), não se observaram cortes devido a ausência de bactérias que apresentassem o sítio de restrição de corte da enzima. As enzimas HaeIII, MspI, RsaI e Hsp92II (ANEXOS 9, 10, 11 e 12, respectivamente) demonstraram um padrão de clivagem semelhante ao longo das fases dos cultivos, sendo que na fase estacionária ocorreu o menor número de cortes comparado com as outras fases.

TABELA 9. QUANTIDADE DE BANDAS ENCONTRADAS AO LONGO DAS FASES DE CRESCIMENTO NOS TRÊS CULTIVOS; PARA TODAS AS ENZIMAS; P (*Phaeodactylum tricornutum*) e S (*Scenedesmus Obliquus*); Ino (Inóculo); 24h (24h após o inoculo); Exp (Fase exponencial); Esta (Fase estacionária); * O número total de bandas diferentes, refere-se ao número de bandas diferentes encontradas ao longo das fases, respectivamente para cada enzima.

	Ino.	CULTIVO 1			CULTIVO 2			CULTIVO 3			*Nº Total de Bandas diferentes
		24h	Exp.	Esta.	24h	Exp.	Esta.	24h	Exp.	Esta.	
P. Haell	0	1	3	4	8	3	0	5	4	2	9
P. Haelll	4	7	8	8	5	8	5	5	11	5	11
P. Mspl	5	5	2	5	7	5	2	4	3	4	7
P. Rsal	6	5	5	6	4	3	2	6	6	3	8
P. Hsp92ll	6	6	6	4	6	7	5	6	6	3	7
S. Haell	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. Haelll	4	4	2	4	3	1	2	4	5	4	5
S. Mspl	8	8	7	3	8	3	5	8	5	8	9
S. Rsal	7	7	7	4	7	4	6	7	3	6	10
S. Hsp92ll	4	6	3	3	5	2	4	3	2	0	6

FONTE: O autor (2017).

Analisando a diversidade com o uso do Coeficiente de Similaridade de Jacard, as médias da percentagem de similaridade bacteriana entre os três cultivos de *P. tricornutum* para todas as enzimas variou ao longo de todas as fases da curva de crescimento entre 51,3% e 68,6% (TABELA 10). Pode ser observada uma redução na percentagem de similaridade entre as fases da curva, porém, não houve diferenças significativas quando aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p=0,097$).

Para a espécie *S. obliquus* as médias da percentagem de similaridade bacteriana variaram entre 50,4% e 84,9% evidenciando um decréscimo significativo ao longo das fases da curva (TABELA 11). Pelo teste de Kruskal-Wallis os dados apresentaram alta significância entre as fases de cultivo ($p=0,005$). Quando comparadas as fases par a par com o teste U de Mann-Whitney, foram observadas significativas diferenças na porcentagem de similaridade entre as fases 24 horas e exponencial ($p= 0,00010$); e entre 24 horas e a fase estacionária ($p= 0,0018$).

Quando comparadas as fases par a par através do teste U de Mann-Whitney não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de similaridade entre as amostras do inóculo e da fase 24 horas tanto no cultivo de *S. obliquus* como no cultivo de *P. tricornutum* ($p=0,37$).

TABELA 10. RESULTADOS DAS MÉDIAS E MEDIANAS DO ÍNDICE DE SIMILARIDADE BACTERIANA EM PORCENTAGEM ENTRE OS TRÊS CULTIVOS DE *P. tricornutum* PARA AS DIFERENTES FASES DA CURVA DE CRESCIMENTO UTILIZANDO 5 ENZIMAS.

	Média	Mediana	Desvio Padrão	Minimo-Máximo
Inóculo	84,7	81,5	15,20	57-100
24hs	68,6	71,0	29,67	0-100
Fase exponencial	63,13	72,0	30,51	0-100
Fase estacionaria	51,3	60,0	24,74	0-80

FONTE: O autor (2017).

TABELA 11. RESULTADOS DAS MÉDIAS E MEDIANAS DO ÍNDICE DE SIMILARIDADE BACTERIANA EM PORCENTAGEM ENTRE O. TRÊS CULTIVOS DE *S. obliquus* PARA AS DIFERENTES FASES DA CURVA DE CRESCIMENTO UTILIZANDO 4 ENZIMAS.

	Media	Mediana	Desvio Padrão	Minimo-Máximo
Inóculo	91,3	100	13,15	66-100
24hs	84,9	88	17,04	50-100
Fase exponencial	43,7	46,5	25,40	0-75
Fase estacionaria	50,4	52,5	28,68	0-100

FONTE: O autor (2017).

5. DISCUSSÃO

Conforme o Índice de Similaridade aplicado neste estudo, pode-se identificar uma diminuição da similaridade conforme as fases de crescimento das microalgas, tanto para *P. tricornutum* como para *S. obliquus*. O Índice de Similaridade testou a média e a mediana das 5 enzimas utilizadas para análise e encontrou um padrão de diminuição da similaridade conforme os estágios da curva de crescimento, ou seja, a diversidade bacteriana diminuiu conforme as fases de crescimento das microalgas. Também pode-se identificar que a diversidade bacteriana de *S. obliquus* foi menor quando comparada a *P. tricornutum*, devido ter obtido maiores porcentagens de similaridade conforme o índice. O índice de Similaridade apontou um mínimo e um máximo (TABELA 10 e 11), esses que variaram muito, como por exemplo, as fases 24h e a fase exponencial foram de 0% até 100%, isto ocorreu, pois o índice somou as 5 enzimas e exemplificou com a média e a mediana. Com esses dados é possível ter um parâmetro geral, mas não para cada enzima. Quando se baseamos no número de cortes de padrões ARDRA para cada enzima (ANEXO 2 até 12 – TABELA 9), pode identificar-se algumas diferenças que o teste anterior não conseguiu identificar. Como por exemplo, um aumento da diversidade bacteriana na fase exponencial de cada espécie (TABELA 8).

O aumento da diversidade bacteriana ocorreu principalmente na fase exponencial, para as duas espécies. Isto pode ter ocorrido pelo crescimento rápido neste momento da curva de crescimento e pela disponibilidade de nutrientes ainda presentes no cultivo, pois como a taxa de divisão das microalgas está em sua máxima expressão na fase exponencial, a interação com os diferentes grupos bacterianos pode resultar no crescimento de ambos os grupos, pela disponibilidade de nutrientes ainda existentes nos cultivos. Neste momento da curva de crescimento, pode começar ou intensificar uma competição por espaço entre as espécies. Esta competição pode resultar no acréscimo de determinados grupos, contribuindo para um acréscimo da diversidade bacteriana dentro dos cultivos (FUENTES, et al. 2016, p.1405). No entanto, ao chegar na fase estacionária percebe-se uma nítida redução dos grupos bacterianos, pois esta competição pode ter se intensificado muito, conseqüentemente, ocorrendo a perda de alguns grupos bacterianos, estes grupos, que não foram capazes de competir com as microalgas.

O aumento da diversidade bacteriana na fase exponencial também pode ser explicado pela dependência das espécies a determinados grupos bacterianos, de acordo com FUENTES e colaboradores (2017, p.1705) e Cho e colaboradores (2015, p.481), as microalgas possuem a necessidade de alguns grupos bacterianos em seu cultivo para que possam eventualmente se desenvolver. Segundo Bell e Mitchell (1972, p.190), os produtos extracelulares presentes nas algas, tais como aminoácidos, peptídeos, açúcares, poliálcools, vitaminas, enzimas, toxinas e material orgânico extracelular em geral, desempenham um papel importante nas cadeias alimentares marinhas, especialmente como nutrientes potenciais para bactérias. De acordo com ele, para o desenvolvimento natural de ambas, sua associação é essencial. Segundo Ukeles e Bishop (1975, p.142) e Caldwell (1977, p.305) as bactérias também podem estimular o crescimento das algas, com a liberação de vitaminas, fatores de crescimento orgânicos, ou até mesmo modificando o pH do meio.

O pH no cultivo de microalgas é um fator determinante para o desenvolvimento microalgal, devido ao crescimento das microalgas envolverem o consumo de CO₂ dissolvido, com o CO₂ em excesso no cultivo pode baixar muito o pH, tornando-o inadequado para o crescimento das microalgas (LOURENÇO, 2006, p.190). O controle do pH em um cultivo contribui para elevar a assimilação do carbono inorgânico, como consequência aumenta a produtividade da microalga (COSTA *et al.*, 2014). O pH do meio varia entre neutro e alcalino para a maioria das espécies de microalgas (RAVEN, 1990, p.724). A água do mar tende a ter pH 8, e o cultivo de *P. tricornutum* iniciou em 8 e se tornou ácido na fase estacionária. Isso pode ter controlado a abundância de *P. tricornutum* nesta fase pela menor assimilação do carbono inorgânico dentro do cultivo, consequentemente, as bactérias puderam ter mais espaço para seu desenvolvimento. No entanto o pH se tornando ácido ao longo do cultivo, pode ter restringido o crescimento e a permanência de muitas bactérias, que em geral possuem o valor de pH ideal para crescimento de 7 (neutro) ou semelhante (MADIGAN; MARTINKO. PARKER, 2004, p.148); Já o pH nos cultivos de *S. obliquus* permaneceram na faixa de 8 na maior parte do cultivo, como a espécie é dulcícola tende a ter a água do cultivo mais próximo da neutralidade (LOURENÇO, 2006, p.190). Sofre apenas um pico de pH logo na fase 24 horas após a inoculação, talvez pelo impacto da inoculação no meio

de cultivo, pois logo após ganha estabilidade no pH. Teoricamente, poucas bactérias conseguem sobreviver em pH muito básico, porém não foi suficiente para extinguir os grupos que já existiam no cultivo de *S. obliquus* no momento do inóculo (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

O pH além de afetar negativamente a assimilação do carbono, o aumento no pH dos cultivos também pode influenciar a concentração de nutrientes no meio, em condições de pH maiores que 9,5 e em temperaturas maiores que 25°C, resulta na dissociação do íon de amônio (NH_4^+) em amônia livre (NH_3), que é mais difícil assimilação. Essa amônia por ser gasosa, desprende-se da fase líquida, e a parte que se dissolve pode reduzir as taxas fotossintéticas em até 90% (AZOV, GOLDMAN, 1982, p.735). Ainda, com o aumento do pH associado a presença de alguns cátions metálicos bivalentes (Ca^{2+}) pode ocasionar a precipitação do fósforo na forma de sais insolúveis, diminuindo a quantidade de fósforo disponível para o cultivo: microalgas e as bactérias (CAI *et al.*, 2013, p.360)

A fase estacionária foi responsável por grande parte do declínio no número padrões ARDRA de grupos bacterianos, principalmente em *S. obliquus*, conforme o Índice de Similaridade, na fase estacionária a porcentagem de similaridade diminuiu muito para as duas espécies. Isso pode ter ocorrido pela competição das espécies, onde a microalga ficou em vantagem sob alguns grupos bacterianos, conseqüentemente, alguns grupos se extinguiram. Esta competição pode ter acontecido pelos nutrientes presentes no cultivo, principalmente algumas vitaminas e o fosfato, que são importantes e limitantes para o crescimento desses organismos. Segundo Andrade *et al.*, (2004), as bactérias necessitam de mais nutrientes para seu crescimento do que as microalgas, pois as microalgas conseguem extrair os principais compostos de seu próprio metabolismo autotrófico.

No trabalho de Rhee (1972, p.141) ele discutiu a competição de algas e bactérias pelo fosfato, utilizando *Scenedesmus sp.* e *Pseudomonas sp.* O acúmulo de fosfato por esses organismos não é o mesmo, ela varia de acordo com sua fisiologia. A microalgas possuem maior capacidade de acumular o fosfato do que as bactérias (KUHL, 1960, p.144; HAROLD, 1966, p.307). Essa diferença possibilita a vantagem de crescimento das microalgas sobre as bactérias. O fósforo é muito importante, quando em pequenas quantidades em um cultivo, pode limitar o crescimento das microalgas (ROUND, CRAWFORD, MANN, 1990; HAYES, PHILIPIS, 1958, p.459).

Uma das principais relações mutualísticas entre as microalgas e as bactérias são o fluxo de O_2 entre elas, segundo o trabalho de Mouget e colaboradores (1995) demonstra uma dependência das microalgas em relação às bactérias para as trocas gasosas naturais, pois os cultivos envolvem o consumo e a remoção de O_2 . Tendo em vista que, em contato com o ar, as células microalgais cresceram muito mais do que em cultivos tampados com algodão em seu experimento, pois restringir o gás, pode acumular o oxigênio dissolvido, o que por sua vez pode limitar a fixação do carbono e alterar os processos da fotossíntese. Os cultivos com baixas concentrações de carbono inorgânico, nota-se um aumento da atividade fotossintética. No seu trabalho ficou evidenciado que o crescimento bacteriano impulsionou o crescimento microalgal, no entanto, a população bacteriana diminuiu posteriormente, mas não afetando o crescimento das algas. O autor reforça que a relação benéfica bactéria-microalga está ligeiramente relacionada se as bactérias competem ou não com algas em relação aos nutrientes, como o fósforo ou nitrogênio. Isto ocorreu de forma parecida para as enzimas RsaI e HaeIII para *P. tricornutum*, onde nota-se um aumento nos padrões de corte na fase exponencial e logo na fase estacionária esse padrão diminui. Os dados fornecem o mesmo padrão para os cultivos, as bactérias associadas podem ter impulsionado o crescimento das microalgas na fase exponencial e após ocorre a diminuição da diversidade bacteriana na fase estacionária.

As condições ideais de cultivo também podem ter afetado a diversidade bacteriana, devido não estar sendo influenciado por situações adversas, como seria em ambiente externo, a microalga pode se desenvolver livremente, teoricamente em um cultivo mais puros.

A diversidade bacteriana existente nos cultivos, não afetaram seu desenvolvimento, mas pelo contrário podem ter influenciado de forma positiva, isso pode ser observado principalmente nas bactérias que permaneceram no cultivo em todas as fases, e aquelas que surgiram na fase exponencial e permaneceram na fase estacionária.

6. CONCLUSÃO

O estudo da diversidade bacteriana em cultivos de microalgas é importante para obtenção de um cultivo puro, sem contaminações. A técnica ARDRA, através das cinco enzimas utilizadas, foi eficiente para inferir a diversidade bacteriana das diferentes fases dos cultivos das duas espécies estudadas. No entanto, a maior eficiência da técnica pode ser analisada quando comparamos as enzimas isoladamente. Para ambas as espécies, apesar de serem de ambientes totalmente diferentes, observou-se maior diversidade bacteriana na fase exponencial para as duas espécies de microalgas e uma redução da diversidade bacteriana entre o início e a fase estacionária dos cultivos. Os cultivos de microalgas não foram afetados pela diversidade bacteriana existente, pois desenvolveram-se normalmente mesmo com a presença dos grupos bacterianos. Neste trabalho as enzimas foram utilizadas separadamente, no entanto seria interessante também utilizar um mix das enzimas para obter grupos bacterianos ainda mais específicos.

REFERÊNCIAS

ACINAS, S.G.; ANTÍN, J.; RODRIGZ-VARRA, F. Diversity of Free-Living and Attached Bacteria in Offshore Western Mediterranean Waters as Depicted by Analysis of Genes Encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65 n. 2, p 514-522, 1999.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia celular**. Porto Alegre: Artmed, 3. ed., 2011.

ALGA E BASE. Disponível em: <http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43474&-session=abv4:A896FD371670314520MWPk838474>. Acesso em: 11/05/2017.

ALTERTHUM, F. Bacteriologia Básica. In: **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 4.ed., cap. 1, p. 1-97, 2008.

AMIN, S. A.; GREEN, D. H.; HART, M. C.; KUPPER, F. C.; SUNDA, W. G.; CARRANO, C. J.; Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism. **Proc. Natl. Academy Science**, USA, n. 106, p. 17071-17076, 2009.

ANDRADE, D. S.; DA SILVA, M. R. L.; SCHERER, A.; CARDOSO, J. D. Características dos principais grupos de microalgas de águas continentais. In: **Microalgas de águas continentais**. ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. Londrina: IAPAR, 2014.

AVNIMELECH, Y. **Biofloc Technology: A Practical Guide Book**. Baton Rouge World Aquaculture Society, p. 120, 2009.

AZOV, Y.; GOLDMAN, J. C. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 43, p. 735-739, 1982.

BARBOSA, G. M. C.; SILVA, H. R.; GATTI, I. C. A.; CARSDO, J. D.; MATOS, M. A.; MIYAZAWA, M.; SILVA, M. R. L.; GOMES, P. C. Potencialidades e Desafios do Cultivo: Microalgas de Águas Continentais. **Instituto Agrônomo do Paraná**, Londrina, v. 1, 2014.

BARBOSA, M.J.G.V. **Microalgal photo bioreactors: scaleup and optimisation**. 166 f. Tese (Doutorado em Ciências). Wageningen University, Wageningen, 2003.

BENEMAMM, J. R. Hydrogen production microalgae. **Journal Appl. Phycology**, p. 291-300, 2000.

BELL, W.; MITCHELL, R. Chemotactic and Growth responses of Marine Bacteria to Algal Extracellular Products. **Marine Biological Laboratory**, Massachusetts , v. 143, n. 2, 1972.

BIONDI, N.; CHELONI, G.; TATTI, E.; DECOROSI, F.; RODOLFI, L.; GIOVANNETTI, L.; VITI, C.; TREDICI, M. R.. The bacterial community associated with *Tetraselmis suecica* outdoor mass cultures. **Journal Appl Phycology**, Florencia, 2016.

BROWN, L. M.; ZEILER, K.G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energy Conversion Management**, USA, v. 34, n. 9-11, p.1005-1013, Novembro 1993.

BROWN, M. R.; BARRETT, S. M.; VOLKMAN, J. K.; NEARHOS, S. P; NELL, J. A.; ALLAN, G. L. Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture. **Aquaculture**, USA, n. 143, p. 341-360, 1996.

BROWN, T. A. **Genética um enfoque molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

BRUCE, K.D. Analysis of mer gene subclasses within bacterial communities in soils and sediments resolved by uorescent-PCR-restriction fragment length polymorphism proling. **Appl Environ Microbiol**, n. 63, p. 4914-4919, 1997.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360-369, 2013.

CALDWELL, D. E. The planktonic microflora of lakes. **Critical Reviews in Microbiology**, Ohio, v. 5 p. 305-370,1977.

CHO, D. H.; RAMANAN, R.; HEO, J.; KANG, Z.; KIM, B.H.; AHN, C.Y.; OH, H.M.; KIM, H.S. Organic carbon influent microbial diversity and temperature strongly influence algal diversity and biomass in raceway ponds treating raw municipal wastewater. **Bioresour. Technology**, n. 191, p. 481–487, 2015.

CLEMENT, B.G.; KEHL, L.E.; DEBORD, K.L.; KITTS, C.L. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR based method for the comparison of complex communities. **Journal Microbiology Methods**, n. 31, p. 135-142, 1998.

COSTA, A.; BARBOSA, G. M. C.; MIYAZAWA, M.; GOMES, P. C.; GATTI, I. C. A. Ambiente de Crescimento de Microalgas. In: **Microalgas de águas continentais**. ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. Londrina: IAPAR, 2014.

DAKHAMA, A.; NOIIE, J.; LAVOIE, M. C. Isolation and identification of antialgal substances produced ton cell size and the development of microenvironments by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Appl. Phycology**, n. 5, p.297-306, 1993.

DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. **De Robertis, bases da Biologia Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4 ed., p. 1-389, 2006.

DEVI, M.P, SUBHASH, G.V, MOHAN, S.V. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. **Renewable Energy**, p. 276- 283, 2012.

FAHY, E. Lipid classification, structures and tools. Amsterdam: *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1811, p. 637-647, 2011.

FORJÁN, E.; NAVARRO, F.; CUARESMA, M.; VAQUERO, I.; RUÍZ-DOMÍNGUEZ, M.C.; Gojkovic, Ž.; VÁZQUEZ, M.; MÁRQUEZ, M.; MOGEDAS, B.; BERMEJO, E. Microalgae: Fast-growth sustainable green factories. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol*, n. 45, p.1705–1755, 2015.

FUENTES, J. L.; GARBAYO, I.; CUARESMA, M.; MONTERO, Z.; GONZÁLEZ-DEL-VALLE, M.; VILCHEZ, C. Impacto f Microalgae-Bacteria Interactions on the Production of Algal Biomass and Associated Compounds. *Marine Drugs*, Espanha, n. 14, p. 3-16, maio 2016.

GRESES, S.; GABYC, J. C.; AGUADOB, D; FERRERB, J.; SECOA, A.; HORN, S. J. Microbial community characterization during anaerobic digestion of *Scenedesmus spp.* under mesophilic and thermophilic conditions. *Algal Research*, Valencia, n.27, p.121–130, 2017.

HAROLD, F. M. 1965. Regulatory mechanisms in the metabolism of inorganic polyphosphate in *Aerobacter aerogenes*. *Colloq. Int. Centre Nat. Rech. Sci., Paris*, v. 124, p. 307-315, 1966.

HAYES, F. R.; PI-IILLIPS J. E. Lake water and sediment. 4. *Limnology Oceanografic*. v.3, p. 459-475, 1958.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal rna analysis of uncultivated microorganisms. *Microbiology Ecology*, New York, v. 35, p.1–21, Janeiro 1998.

HEYNDRICKX, M.; VAUTERIN, L.; VANDAMME, P.; KERSTERS, K.; DE VOS, P. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiology Methods*, n. 26, p. 247-259, Maio 1996.

HUNTER-CEVERA, J. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*, Amsterdam, v. 1, n. 3, p. 278-285, 1998.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. *Biologia Celular e Molecular*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1-364, 2015.

KAZAMIA, E.; CZESNICK, H.; NGUYEN, T. T.; CROFT, M. T.; SHERWOOD, E.; SASSO, S.; HODSON, S.J.; WARREN, M. J.; SMITH, A. G. Mutualistic interactions between vitamin B₁₂-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibitregulation. *Environmental Microbiology*, n. 14, p.1466–1476, 2012.

KOZDRÓJ, J.; VAN-ELSAS, J. D. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 43, n. 3 , p. 197-212, 2001.

KUHL, A. Die Biologie der kondensierten anorganischen Phosphate. **Ergeb. Biol.** v.23, p.144-185, 1960.

KURANO, N.; IKEMOTO, H.; MIYASHITA, H.; HASEGAWA, T.; HATA, H.; MIYACHI, S. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. **Energy Conversion Management**, Japão, v. 36, n. 6-9, p. 689-692, 1995.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid Identification of Rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, França, v. 60, p. 56–63, Janeiro 1994.

LEWIN, J. C., LEWIN, R. A. PHILPOTT, D. E.. Observations on *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of General Microbiology**, Estados Unidos, v. 18, p. 418-427, 1958.

LEYA, L.A.; BASHAN, Y.; MENDONZA, A.; DE-BASHAN, L.E. Accumulation fatty acids of in *Chlorella vulgaris* under heterotrophic conditions in relation to activity of acetyl CoA carboxylase, temperature, and co-immobilization with *Azospirillum brasilense*. **Naturwissenschaften**, n. 101, p. 819–830, 2014.

LIU, W. T; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Determination of the microbial diversity of anaerobic-aerobic activated sludge by a novel molecular biological technique. **Water Sci Technology**, Michigan n. 37, p.417-422, 1998.

LIU, W. T; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. **American Society for Microbiology**, Michigan, v. 63, n. 11, p. 4516–4522, 1997.

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, 1 ed., 2006.

MADIGAN, M. T; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Pearson, 10 ed., 2004.

MARINE ESPECIES. Identification Portal. Disponível em: <marine especies.org> Acesso em: 25/07/2017.

MARSH, T. L.; LIU, W. T.; FORNEY, L. J.; CHENG, H. Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge. **Water Science Technology**, n. 34, p. 455-460, 1998.

NBCI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 28/09/2016.

OLIVEIRA, V. C.; COSTA, J. L. S. da. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatol. Bras**, v.27, n.6, p.631-634, 2002.

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

PACE, N. R., OLSEN, G. J. & WOESE, C. R. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. **Cell**, p. 325-326, 1986.

PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; EDWARDS, D. D.; PELCZAR, M. F. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. São Paulo: Pearson, 2. ed., 2005.

POLLARD, T. D.; EARNSHAW, W. C. **Biologia Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, p.1-799, 2006.

PROTOCÓLO DE EXTRAÇÃO. AxygenBiosciences, Union City, USA. Disponível em:

<http://csmedia2.corning.com/LifeSciences//media/pdf/protocol_AxyPrep_Multi_Source_Genomic_DNA.pdf>. Acessado em 11/05/2016.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 51, n. 3, p. 167–177, 2000.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 1, p. 1-90, 2001.

REVIERS, B. **Biologia e Filogenia das Algas**. São Paulo: Artmed, p. 1-216, 2006.

RHEE, G. Y. Competition between an alga and an aquatic bacterium for phosphate. **Limnology Oceanography** n.17, p.141-505, 1972

RIER, S. T.; STEVENSON, R. J. Relation of environmental factors to density of epilithic lotic bacteria in 2 ecoregions. **Journal am. Benthol. Soc**, n.20, p. 588–600, 2001.

RIQUELME, C. E.; AVEDAÑO-HERRERA, R. E. Interacción bacteria-microalga em el ambiente marino y uso potencial em acuicultura. **Revista Chilena de Historia Natural**, Antofagasta, n. 76, p. 725-736, 2003.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMMAN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

ROUND, F. E.; CRAWFORD, R. M.; MANN, M. The diatoms – **Biology and Morphology and Biotechnology**. Cambridge, New York. Cambridge University Press, 1990.

ROY D.; SIROIS, S. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *Idh* gene. **Microbiology Lett.**, n.191 p. 17–24, 2000.

SANTOS, C.A.; REIS, A. Microalgal symbiosis in biotechnology. **Appl. Microbiology Biotechnology**, n. 98, p. 5839–5846, 2014.

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 e Tecnologia**, Jaboticabal, v. 8, 2016.

SCHLUCHTER, W. M. BRYANT, D. A. Analysis and reconstitution of phycobiliproteins: methods for the characterization of bilin attachment reactions. **Humana Press**, Nova Orleans, p.311-334, 2002.

SCHWENK, D.; NOHYNEK, L.; RISCHER, H. Algae-bacteria association inferred by 16S rDNA similarity in established microalgae cultures. **Microbiology Open**, Finlandia, n. 3, p. 356-368, 2014.

SILVA, A. Effect of the microalga *Isochrysis galbana* on the early larval culture of *Paralichthys adspersus*. **Cienc. Mar**, n. 25, p.267–276, 1999.

SILVA, L. P. Análise Molecular do Gene TP53 em Tumores de cabeça de Pescoço. Monografia, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2015.

SUN, L.; ZHANG, Y.; HE, L.; CHEN, Z.; WANG, Q.; QIAN, M.; SHENG, X. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. **Bioresource Technology**, China, n. 101, p. 501–509, 2010.

SZEWZYK, R.; BĄZ, G.; BARTOCHA, W. Survival and growth of *Legionella pneumophila* in biofilms of drinking water bacteria and amoebae. **American Society for Microbiology**, Washington, 2000.

TEIXEIRA, C.; VIEIRA, A. A. H. Nutrient experiment using *Phaeodactylum tricornutum* as na assay organism. **Bolm Institute Oceanography**, p.29-42, 1976.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Bergen, p. 240-245, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 6. ed., p. 82, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TULLI, F.; CHINI-ZITTELLI, G.; GIORGI, G.; POLI, B.M.; TIBALDI, E.; TREDICI, M.R. Effect of the inclusion of dried *Tetraselmis suecica* on growth, feed utilization, and fillet composition of European sea bass juveniles fed organic diets. **Journal Aquatic Food Production Technology**, p.188–197, 2012.

UKELES, R. BISHOP, J. Enhancement of phytoplankton growth by marine bacteria. **Journal Phycology**, n.11, p.142-149, 1975.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; ARTZ, R. R. E.; HAANSTRA, R.; FORNEY, L.J. Association of marine *Archaea* with the digestive tracts of two marine fish species. **Appl Environ Microbiology**, n. 642, p.894-2898, 1998.

WILSON, E. O. The current state of biology diversity. Biodiversity. **National Academy Press**, Washington, p. 3-18, 1988.

YARZA, P.; YILMAZ, P.; PRUESSE, E.; GLOCKNER, F. O.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B.; EUZÉBY, J.; ARMANN, R.; ROSSELLÓ-MORA, R. **Nature Reviews Microbiology**, p.635–645, 2014.

YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; CRAPEZ, M. A. C. Ciclos de vida de algas marinhas pluricelulares e Bactérias Marinhas. In: **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 69-101, 2002.

ZILLI J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade Microbiana como Indicador de Qualidade do Solo. Brasília: **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 391-411, setembro, 2003.

ANEXO 1 – MEIO DE CULTIVO

Composição do Meio LCA-AM* usado no LCA/UFSC, empregado nas culturas de microalgas marinhas. * Desenvolvido a partir do Meio Conway.

1. Solução de Nitrato

NaNO₃ ----- 510,0 g
 FeCl₃.6H₂O ----- 8,0 g
 EDTA Na₂ ----- 10,0 g
 Sol. Traços de Metais ----- 2,0 mL (de cada solução)
 Água destilada ----- a 1,0 L

Filtrar 100 mL da Solução de Nitrato em filtro de membrana de 0,2 µm de porosidade. Todo o material usado neste processo deve ter sido esterilizado em autoclave. A Solução de Nitrato filtrada deve ser substituída a cada 15 dias.

Solução de Traço de Metais

ZnCl₂.7H₂O ----- 1,65 g
 CoCl₂.6H₂O ----- 1,50 g
 (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O ----- 0,60 g
 CuSO₄.5H₂O ----- 1,47 g
 MnCl₂.6H₂O ----- 27,0 g
 Água destilada para cada solução ----- a 150,0 mL

2. Solução de Fosfato

NaH₂PO₄.H₂O ----- 48,0 g
 Solução de Vitaminas ----- 1,0 mL
 Água destilada ----- a 1,0 L

Filtrar 100 mL da Solução de Fosfato em filtro de membrana de 0,2 µm de porosidade. Todo o material usado neste processo deve ter sido esterilizado em autoclave. A Solução de Fosfato filtrada deve ser substituída a cada 15 dias.

Solução de Vitaminas

Citoneurim 5.000 mg (Merck) ----- 2 ampolas de 3,0 mL
 Água destilada ----- 100 mL

3. Solução de Silicato (somente para cultivo de diatomáceas)

Silicato de Sódio Comercial (H-300, QUIMIDROL ----- 80,0 g
 Água destilada ----- a 1,0 L

Para elaborar o meio: Filtrar 100 mL da Solução de Silicato em filtro de membrana de 0,2 µm de porosidade. Todo o material usado neste processo deve ter sido esterilizado em autoclave. A Solução de Nitrato filtrada deve ser substituída a cada 15 dias.

Para elaborar o Meio LCA-AM, adicionar:

Solução de Nitrato ----- 2,0 mL

Solução de Fosfato ----- 2,0 mL

Solução de Silicato ----- 1,0 mL

Para cada litro de água do mar esterilizada em autoclave (aguardar 2 dias antes de usar). O meio pronto, deverá ser usado imediatamente ou armazenado por até 5 dias.

Composição do Meio LCA-AD* usado no LCA/UFSC, empregado nas culturas de microalgas dulcícolas. * Desenvolvido a partir do Meio BBM.

Solução 1

NaNO ₃ -----	100 g
MgSO ₄ .7H ₂ O -----	7,5 g
K ₂ HPO ₄ -----	2,5 g
KH ₂ PO ₄ -----	6,0 g
NaCl -----	2,5 g
Água destilada -----	a 1,0 L

Solução 2

CaCl ₂ .2H ₂ O -----	2,5 g
Água destilada -----	a 1,0 L

Solução 3

C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ -Na ₂ (EDTA – Na ₂) -----	50 g
KOH -----	31g
Água destilada -----	a 1,0 L

Solução 4

FeSO ₄ .7H ₂ O -----	4,98 g
Água destilada -----	a 1,0 L

Solução 5

H ₃ BO ₃ -----	11,42 g
Água destilada -----	a 1,0 L

Solução 6

ZnSO ₄ .7H ₂ O -----	8,82 g
MnCl ₂ .4H ₂ O -----	1,44 g
MoO ₃ -----	0,71 g
CuSO ₄ .5H ₂ O -----	1,57 g
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O -----	0,49 g
Água destilada -----	a 1,0 L

Para elaborar o Meio LCA-AD, adicionar:

Solução 1 ----- 10,0 mL

Solução 2 ----- 10,0 mL

Solução 3 ----- 1,0 mL

Solução 4 ----- 1,0 mL

Solução 5 ----- 1,0 mL

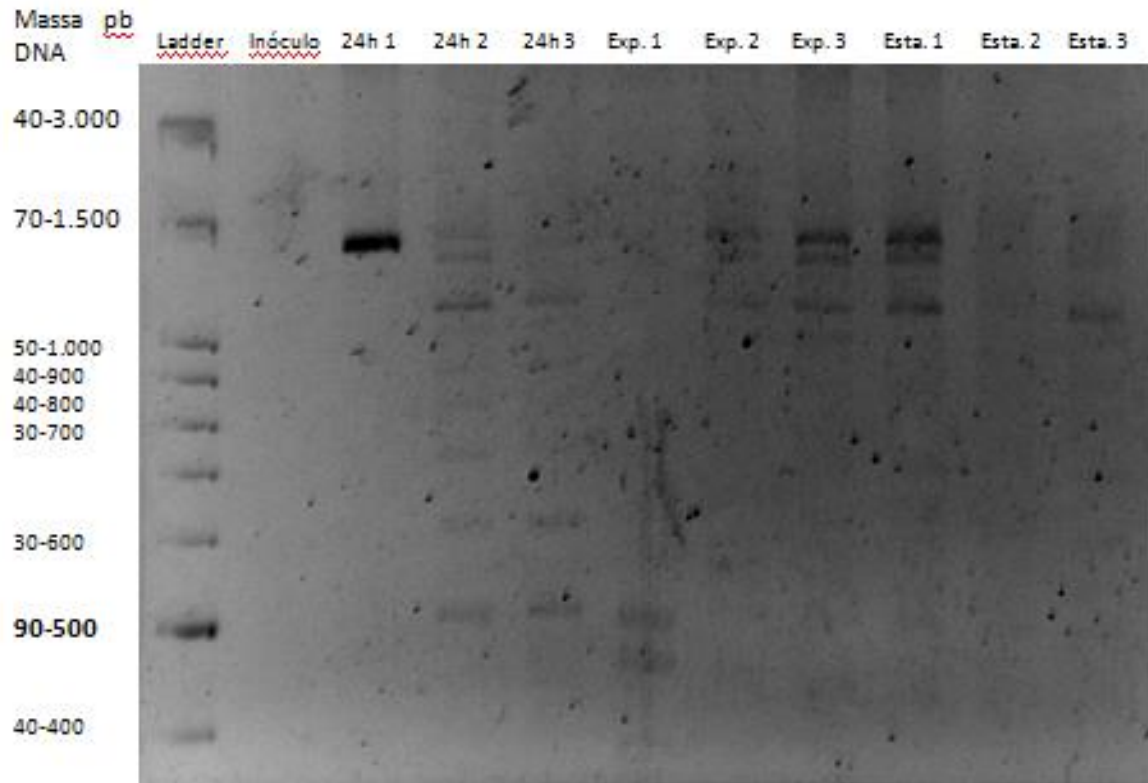
Solução 6 ----- 1,0 mL

Para cada litro de água doce.

O Meio deve ser esterilizado em autoclave (aguardar 2 dias antes de usar) e poderá ser armazenado por até 7 dias.

ANEXO 2 – PERFIS ELETROFORÉTICOS *P. tricorutum*

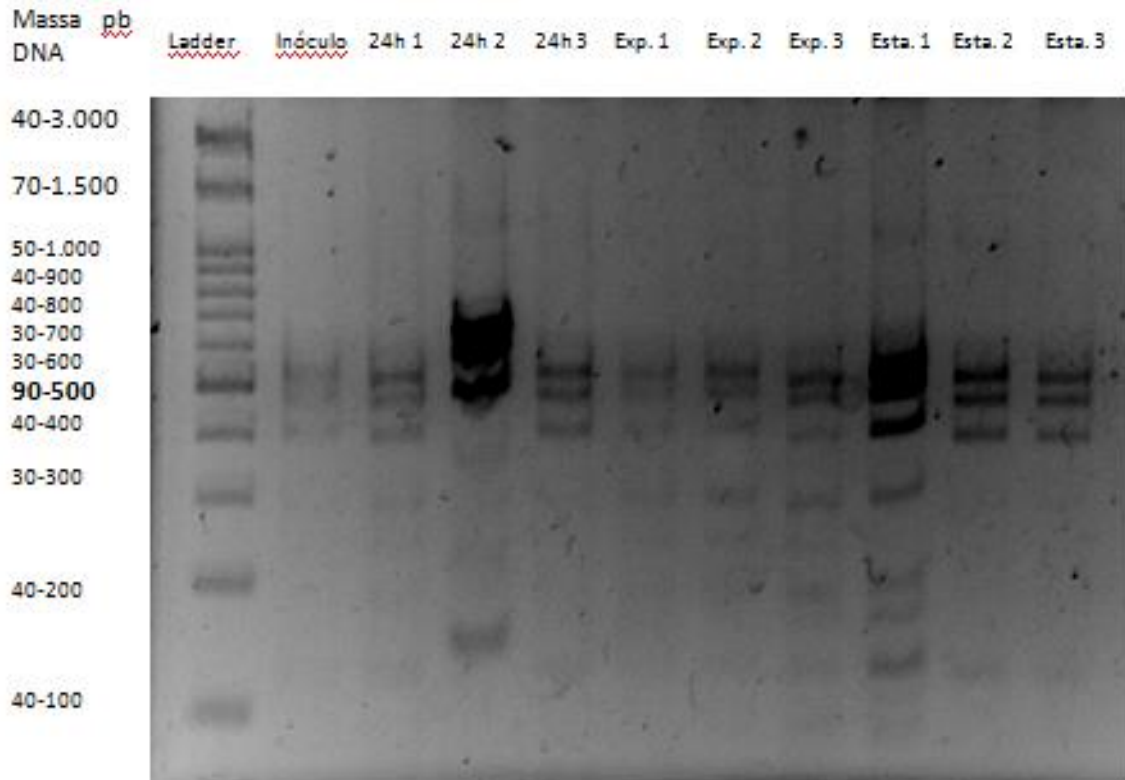
ARDRA REALIZADA PARA CORTE DO DNA BACTERIANO APARTIR DO CULTIVO DE *Phaeodactylum tricorutum* COM A ENZIMA HaeII EM GEL DE AGAROSE 3%. Massa DNA (concentração do DNA); pb (pares de bases); Ladder (marcador); Fases de Crescimento do cultivo: Inóculo (momento da inoculação da microalga - controle), 24h (24 horas após a inoculação da microalga), Exp. (fase exponencial) e Esta. (fase estacionária); 1 (cultivo 1); 2 (cultivo 2); 3 (cultivo 3).



FONTE: O autor (2017).

ANEXO 3 – PERFIS ELETROFORÉTICOS *P. tricornutum*

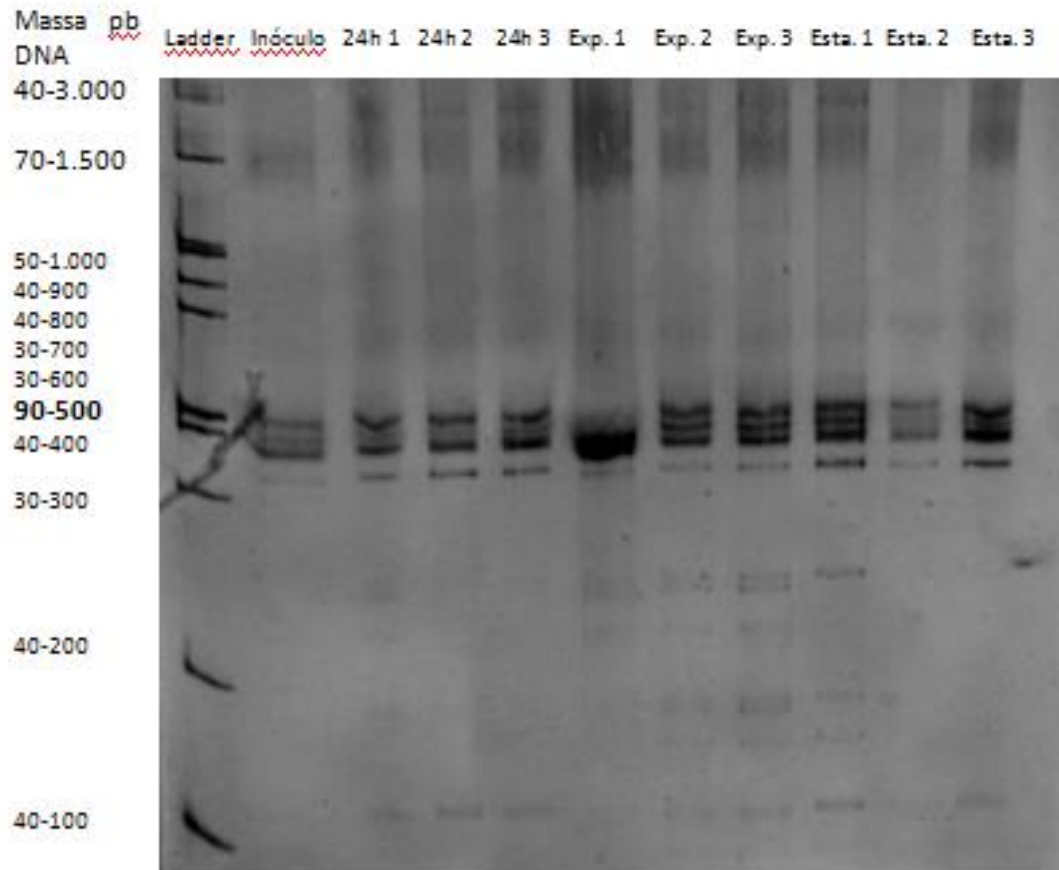
ARDRA REALIZADA PARA CORTE DO DNA BACTERIANO APARTIR DO CULTIVO DE *Phaeodactylum tricornutum* COM A ENZIMA HaeIII EM GEL DE AGAROSE 3%. Massa DNA (concentração do DNA); pb (pares de bases); Ladder (marcador); Fases de Crescimento do cultivo: Inóculo (momento da inoculação da microalga - controle), 24h (24 horas após a inoculação da microalga), Exp. (fase exponencial) e Esta. (fase estacionária); 1 (cultivo 1); 2 (cultivo 2); 3 (cultivo 3).



FONTE: O autor (2017).

ANEXO 4 – PERFIS ELETROFORÉTICOS *P. tricornutum*

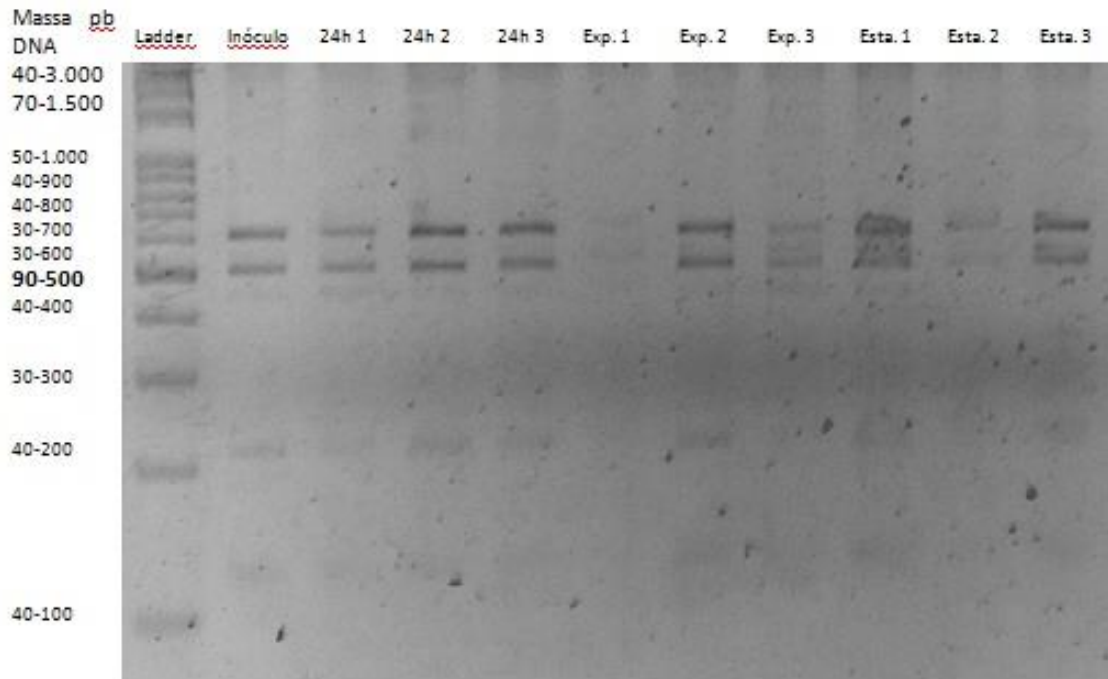
ARDRA REALIZADA PARA CORTE DO DNA BACTERIANO APARTIR DO CULTIVO DE *Phaeodactylum tricornutum* COM A ENZIMA HaeIII EM GEL DE POLIACRILAMIDA. Massa DNA (concentração do DNA); pb (pares de bases); Ladder (marcador); Fases de Crescimento do cultivo: Inóculo (momento da inoculação da microalga - controle), 24h (24 horas após a inoculação da microalga), Exp. (fase exponencial) e Esta. (fase estacionária); 1 (cultivo 1); 2 (cultivo 2); 3 (cultivo 3).



FONTE: O autor (2017).

ANEXO 5 – PERFIS ELETROFORÉTICOS *P. tricornutum*

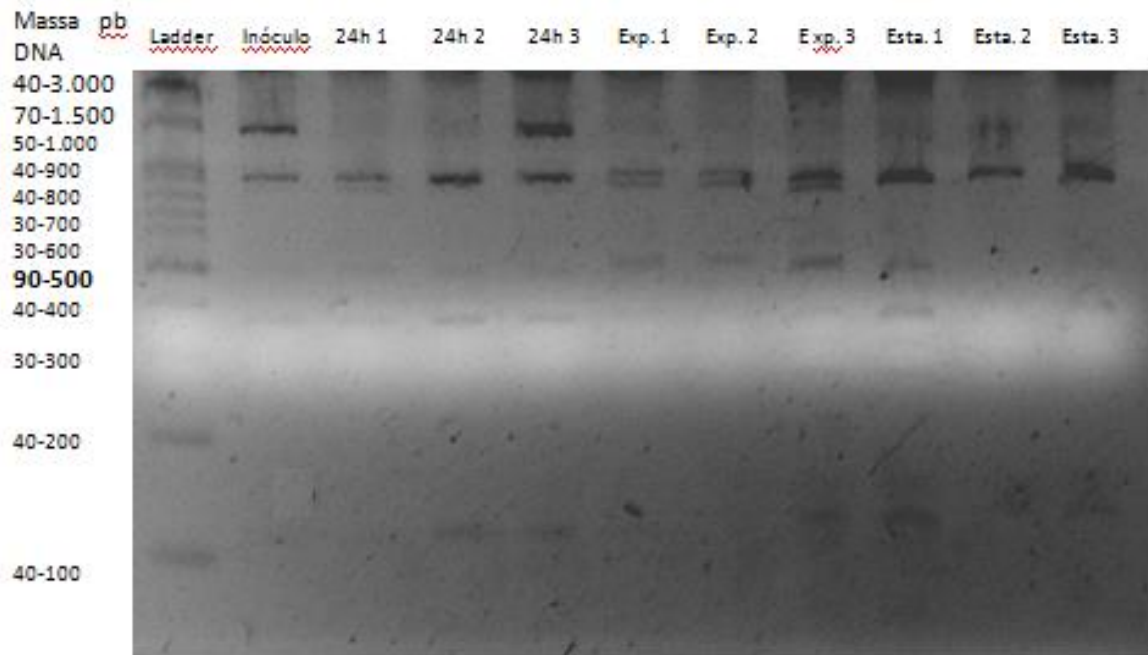
ARDRA REALIZADA PARA CORTE DO DNA BACTERIANO APARTIR DO CULTIVO DE *Phaeodactylum tricornutum* COM A ENZIMA *MspI* EM GEL DE AGAROSE 3%. Massa DNA (concentração do DNA); pb (pares de bases); Ladder (marcador); Fases de Crescimento do cultivo: Inóculo (momento da inoculação da microalga - controle), 24h (24 horas após a inoculação da microalga), Exp. (fase exponencial) e Esta. (fase estacionária); 1 (cultivo 1); 2 (cultivo 2); 3 (cultivo 3).



FONTE: O autor (2017).

ANEXO 6 – PERFIS ELETROFORÉTICOS *P. tricornutum*

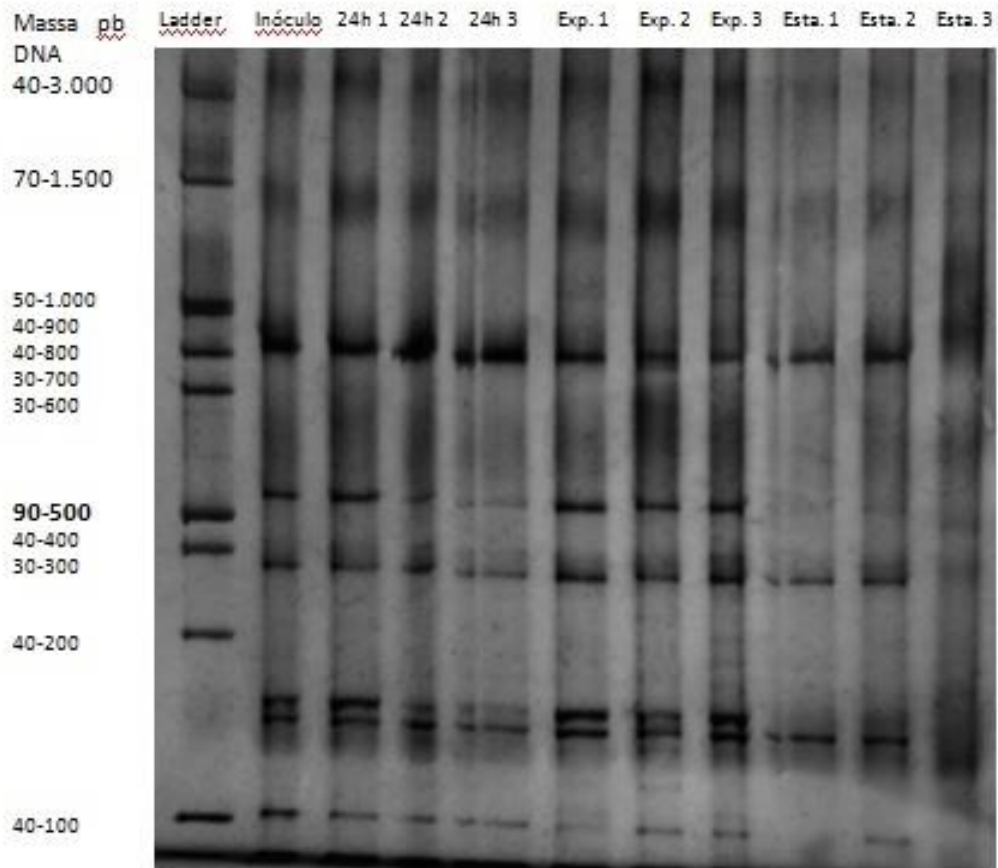
ARDRA REALIZADA PARA CORTE DO DNA BACTERIANO APARTIR DO CULTIVO DE *Phaeodactylum tricornutum* COM A ENZIMA RsaI EM GEL DE AGAROSE. Massa DNA (concentração do DNA); pb (pares de bases); Ladder (marcador); Fases de Crescimento do cultivo: Inóculo (momento da inoculação da microalga - controle), 24h (24 horas após a inoculação da microalga), Exp. (fase exponencial) e Esta. (fase estacionária); 1 (cultivo 1); 2 (cultivo 2); 3 (cultivo 3).



FONTE: O autor (2017).

ANEXO 7 – PERFIS ELETROFORÉTICOS *P. tricornutum*

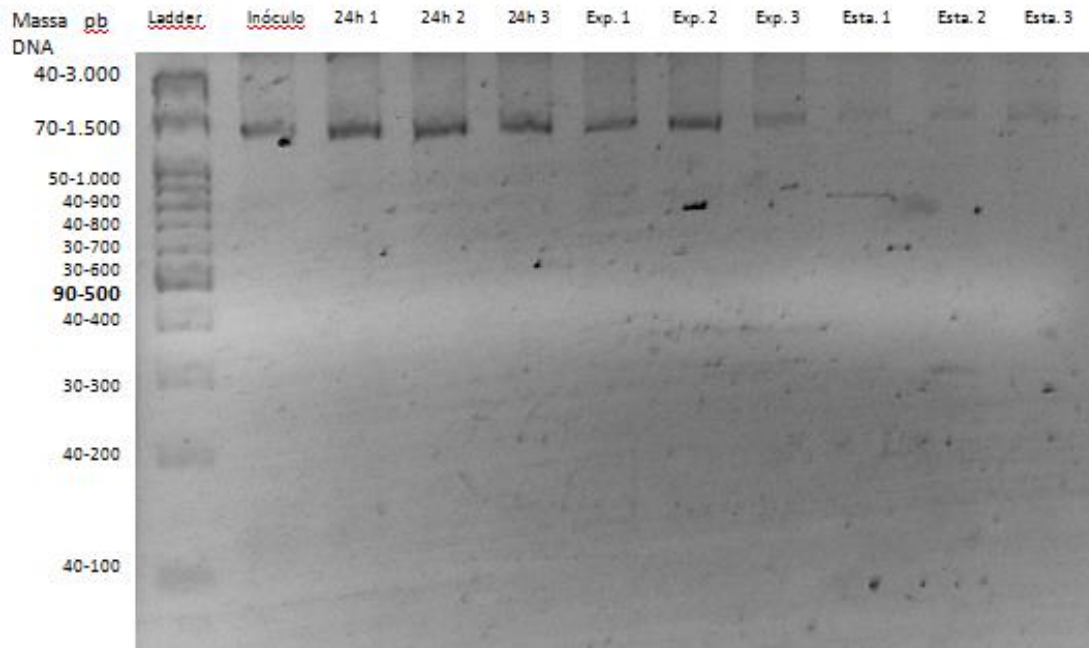
ARDRA REALIZADA PARA CORTE DO DNA BACTERIANO APARTIR DO CULTIVO DE *Phaeodactylum tricornutum* COM A ENZIMA Hsp92II EM GEL DE POLIACRILAMIDA. Massa DNA (concentração do DNA); pb (pares de bases); Ladder (marcador); Fases de Crescimento do cultivo: Inóculo (momento da inoculação da microalga - controle), 24h (24 horas após a inoculação da microalga), Exp. (fase exponencial) e Esta. (fase estacionária); 1 (cultivo 1); 2 (cultivo 2); 3 (cultivo 3).



FONTE: O autor(2017).

ANEXO 8 – PERFIS ELETROFORÉTICOS *S. obliquus*

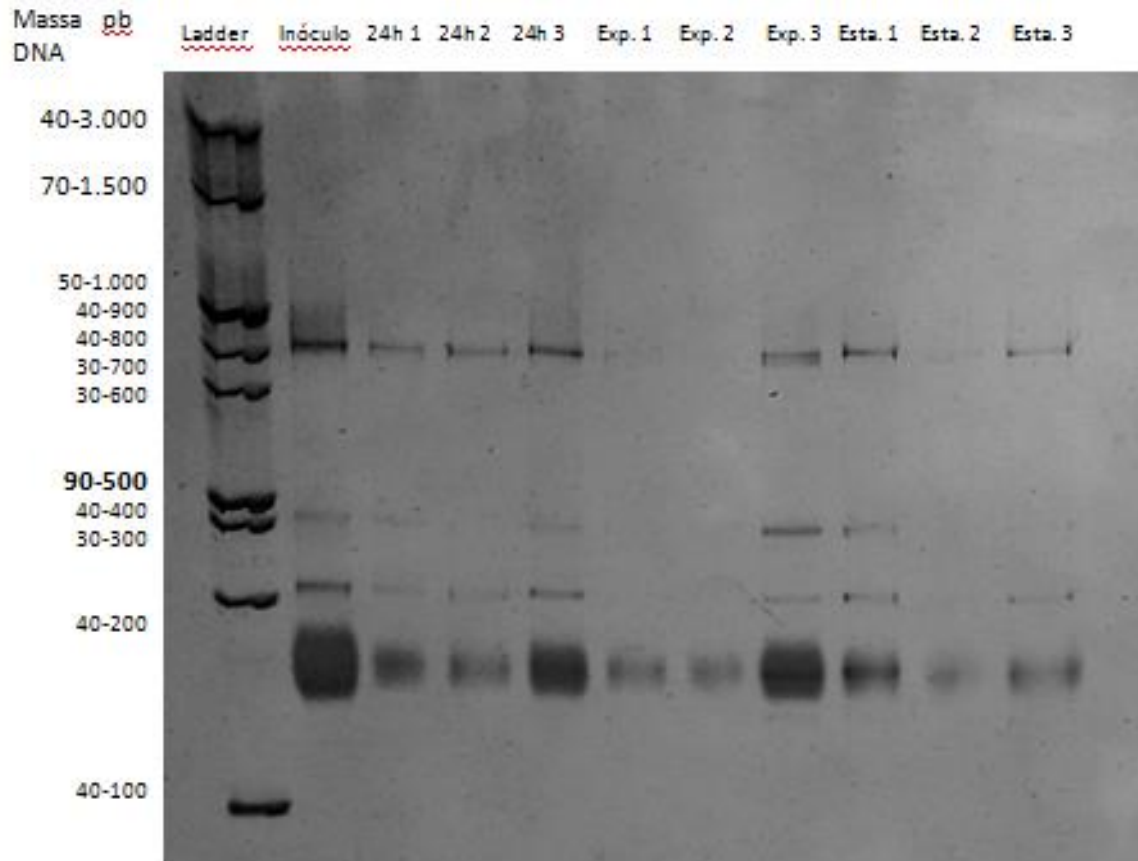
ARDRA REALIZADA PARA CORTE DO DNA BACTERIANO APARTIR DO CULTIVO DE *Scenedesmus obliquus* COM A ENZIMA HAE II EM GEL DE AGAROSE. Massa DNA (concentração do DNA); pb (pares de bases); Ladder (marcador); Fases de Crescimento do cultivo: Inóculo (momento da inoculação da microalga - controle), 24h (24 horas após a inoculação da microalga), Exp. (fase exponencial) e Esta. (fase estacionária); 1 (cultivo 1); 2 (cultivo 2); 3 (cultivo 3).



FONTE: O autor (2017).

ANEXO 9 – PERFIS ELETROFORÉTICOS *S. obliquus*

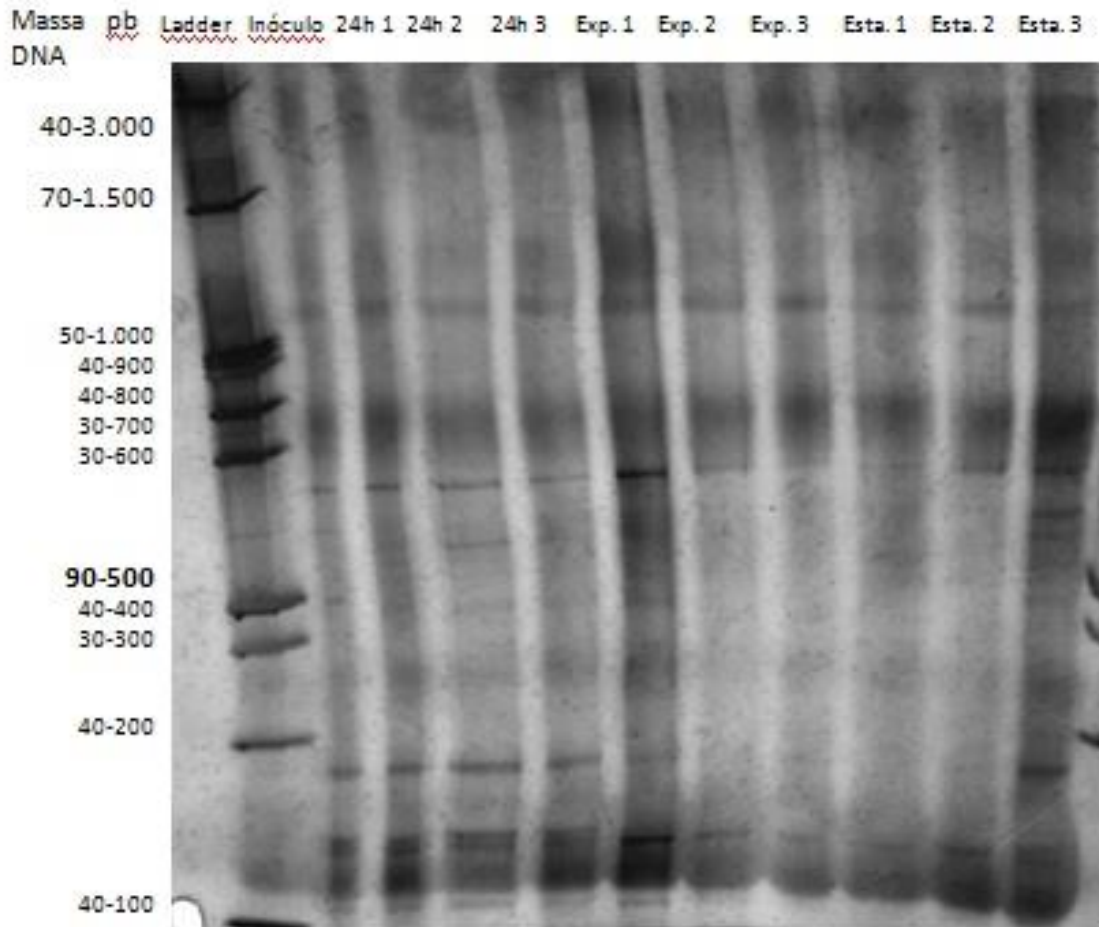
ARDRA REALIZADA PARA CORTE DO DNA BACTERIANO APARTIR DO CULTIVO DE *Scenedesmus obliquus* COM A ENZIMA HaeIII EM GEL DE POLIACRILAMIDA. Massa DNA (concentração do DNA); pb (pares de bases); Ladder (marcador); Fases de Crescimento do cultivo: Inóculo (momento da inoculação da microalga - controle), 24h (24 horas após a inoculação da microalga), Exp. (fase exponencial) e Esta. (fase estacionária); 1 (cultivo 1); 2 (cultivo 2); 3 (cultivo 3).



FONTE: O autor (2017).

ANEXO 10 – PERFIS ELETROFORÉTICOS *S. obliquus*

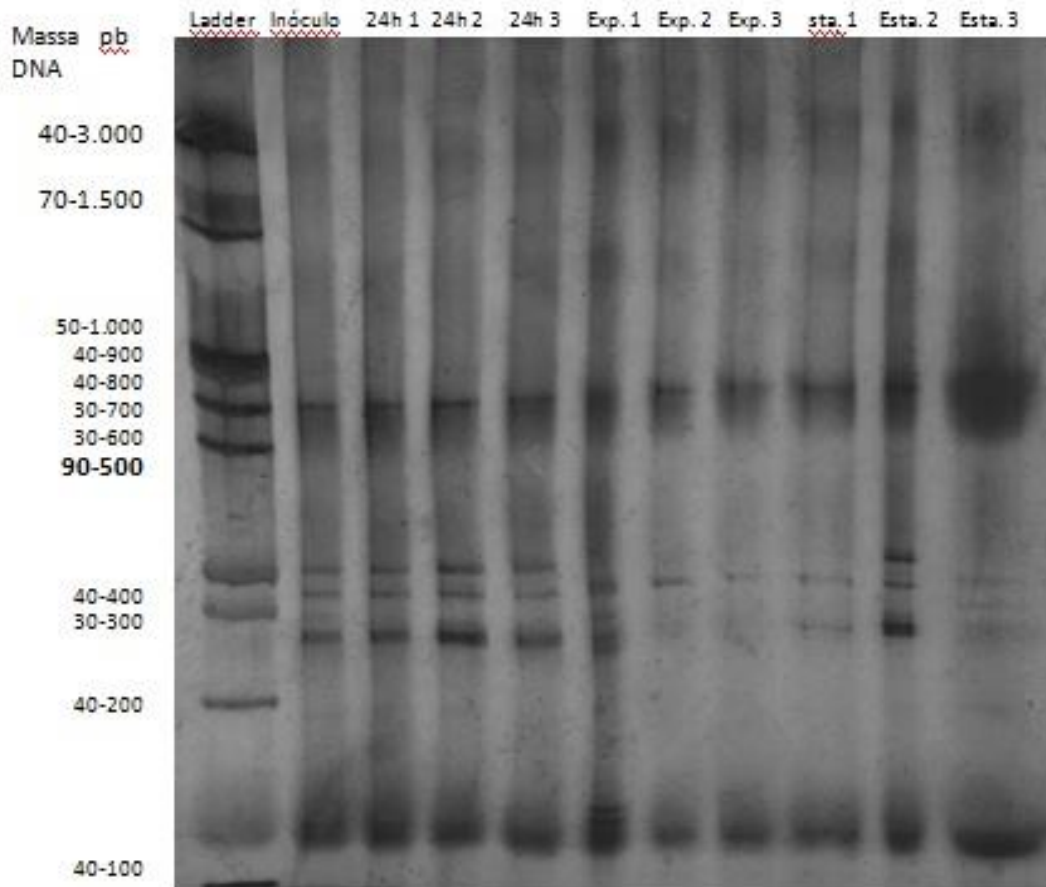
ARDRA REALIZADA PARA CORTE DO DNA BACTERIANO APARTIR DO CULTIVO DE *Scenedesmus obliquus* COM A ENZIMA *MspI* EM GEL DE POLIACRILAMIDA. Massa DNA (concentração do DNA); pb (pares de bases); Ladder (marcador); Fases de Crescimento do cultivo: Inóculo (momento da inoculação da microalga - controle), 24h (24 horas após a inoculação da microalga), Exp. (fase exponencial) e Esta. (fase estacionária); 1 (cultivo 1); 2 (cultivo 2); 3 (cultivo 3).



FONTE: O autor (2017).

ANEXO 11 – PERFIS ELETROFORÉTICOS *S. obliquus*

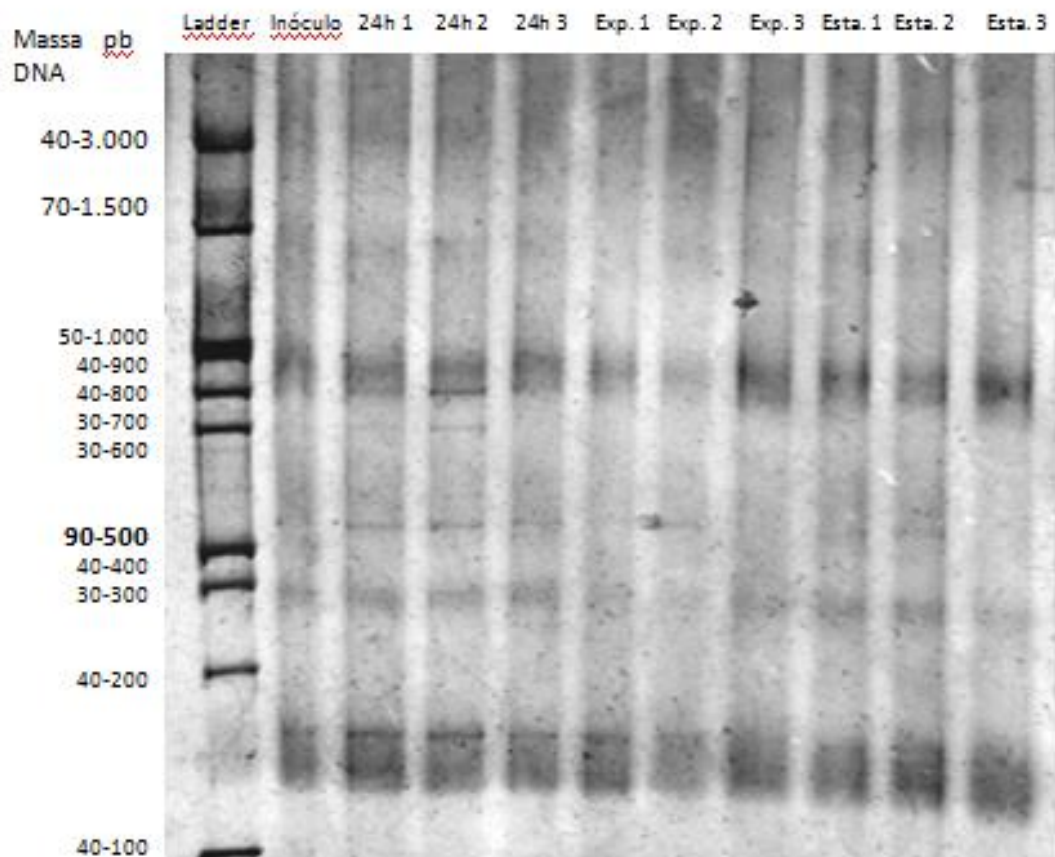
ARDRA REALIZADA PARA CORTE DO DNA BACTERIANO APARTIR DO CULTIVO DE *Scenedesmus obliquus* COM A ENZIMA *RsaI* EM GEL DE POLIACRILAMIDA. Massa DNA (concentração do DNA); pb (pares de bases); Ladder (marcador); Fases de Crescimento do cultivo: Inóculo (momento da inoculação da microalga - controle), 24h (24 horas após a inoculação da microalga), Exp. (fase exponencial) e Esta. (fase estacionária); 1 (cultivo 1); 2 (cultivo 2); 3 (cultivo 3).



FONTE: O autor (2017).

ANEXO 12 – PERFIS ELETROFORÉTICOS *S. obliquus*

ARDRA REALIZADA PARA CORTE DO DNA BACTERIANO APARTIR DO CULTIVO DE *Scenedesmus obliquus* COM A ENZIMA Hsp92 II EM GEL DE POLIACRILAMIDA. Massa DNA (concentração do DNA); pb (pares de bases); Ladder (marcador); Fases de Crescimento do cultivo: Inóculo (momento da inoculação da microalga - controle), 24h (24 horas após a inoculação da microalga), Exp. (fase exponencial) e Esta. (fase estacionária); 1 (cultivo 1); 2 (cultivo 2); 3 (cultivo 3).



FONTE: O autor (2017).

ANEXO 13 – ÍNDICE DE SIMILARIDADE DE *P. tricornutum*

ÍNDICE DE SIMILARIDADE DA DIVERSIDADE BACTERIANA ENTRE OS CULTIVOS DE *Phaeodactylum tricornutum* AO LONGO DAS FASES DE CRESCIMENTO PARA AS ENZIMAS HaeII, HaeIII, MspI, RsaI e Hsp92II. Cultivo 1 (1); Cultivo 2 (2); Cultivo 3 (3); Índice de similaridade entre (*).

	24h após	Exponencial	Estacionária
HAE II			
1*2	13%	0%	0%
1*3	0%	0%	0%
2*3	63%	75%	50%
HAE III			
1*2	71%	100%	62%
1*3	71%	72%	62%
2*3	100%	72%	100%
MSP I			
1*2	71%	40%	40%
1*3	80%	66%	80%
2*3	57%	60%	50%
RSA I			
1*2	80%	60%	33%
1*3	57%	83%	50%
2*3	66%	50%	66%
HSP92II			
1*2	100%	86%	80%
1*3	100%	100%	75%
2*3	100%	86%	60%

FONTE: O autor (2017).

ANEXO 14 – ÍNDICE DE SIMILARIDADE DE *S. obliquus*

ÍNDICE DE SIMILARIDADE DA DIVERSIDADE BACTERIANA ENTRE OS CULTIVOS DE *Scenedesmus obliquus* AO LONGO DAS FASES DE CRESCIMENTO PARA AS ENZIMAS HaeII, HaeIII, Mspl, RsaI e Hsp92II.. Cultivo 1 (1); Cultivo 2 (2); Cultivo 3 (3); Índice de similaridade entre (*); Não ocorreu nenhum corte (**).

	24h após	Exponencial	Estacionária
HAE II			
1*2	***	***	***
1*3	***	***	***
2*3	***	***	***
HAE III			
1*2	75%	50%	50%
1*3	100%	40%	100%
2*3	75%	20%	50%
MSP I			
1*2	88%	43%	60%
1*3	100%	71%	33%
2*3	88%	60%	55%
RSA I			
1*2	100%	57%	66%
1*3	100%	43%	66%
2*3	100%	75%	50%
HSP92II			
1*2	83%	0%	75%
1*3	50%	66%	0%
2*3	60%	0%	0%

FONTE: O autor (2017).