

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JAQUELINE DOS SANTOS PONTES

DIVERSIDADE MICROBIANA ENCONTRADA NO PARNAMAR (PARQUE
NACIONAL MARINHO) DAS ILHAS DOS CURRAIS E NO CONJUNTO DE RECIFES
ARTIFICIAIS MARINHOS

MATINHOS

2020

JAQUELINE DOS SANTOS PONTES

DIVERSIDADE MICROBIANA ENCONTRADA NO PARNAMAR (PARQUE
NACIONAL MARINHO) DAS ILHAS DOS CURRAIS E NO CONJUNTO DE
RECIFES ARTIFICIAIS MARINHOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Desenvolvimento Territorial Sustentável, no Curso de Pós-Graduação em Desenvolvimento Territorial Sustentável, Setor Litoral da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Metri

MATINHOS

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte
Biblioteca da Universidade Federal do Paraná - Setor Litoral

S237 Pontes, Jaqueline dos Santos
Diversidade microbiana encontrada no pamamar (parque nacional marinho) das ilhas dos currais e no conjunto de recifes artificiais marinhos / Jaqueline dos Santos Pontes ; orientador Luciano Fernandes Huergo. – 2020.
76 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná - Setor Litoral, Matinhos/PR, 2020.

1. Ilhas dos Currais (Litoral do Paraná). 2. Recifes artificiais (Litoral do Paraná). 3. Litoral do Paraná. 4. Bactérias. I. Dissertação (Mestrado) – Programa do Mestrado em Desenvolvimento Territorial Sustentável. II. Título.

CDD – 589.95



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR LITORAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DESENVOLVIMENTO
TERRITORIAL SUSTENTÁVEL - 40001016081P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em DESENVOLVIMENTO TERRITORIAL SUSTENTÁVEL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JAQUELINE DOS SANTOS PONTES** intitulada: **DIVERSIDADE MICROBIANA ENCONTRADA NO PARNAMAR (PARQUE NACIONAL MARINHO) DAS ILHAS DOS CURRAIS E NO CONJUNTO DE RECIFES ARTIFICIAIS MARINHOS**, sob orientação do Prof. Dr. LUCIANO FERNANDES HUERGO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

MATINHOS, 26 de Novembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

18/12/2020 15:44:44.0

LUCIANO FERNANDES HUERGO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

17/12/2020 19:17:12.0

CASSIANA BAPTISTA METRI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

18/01/2021 14:23:12.0

RODRIGO ARANTES REIS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

RUA JAGUARIANA, 512 - MATINHOS - Paraná - Brasil
CEP 83260-000 - Tel: (41) 3511-8371 - E-mail: ppgdts@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 66158

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 66158

Aos meus pais João e Lourdes Pontes pelo carinho, afeto, dedicação e cuidado que me deram durante toda a minha existência, dedico esta dissertação a eles. Com muita gratidão.

Aos meus irmãos Robson e Fabiano, em especial para ao Fabiano pela paciência, apoio, companheirismo e por dividir comigo todos os momentos da minha gravidez, principalmente aqueles que envolviam comida e/ou desejos.

Dedico ao meu companheiro Cassiano Vargas que foi capaz de suportar todos os meus momentos de estresse durante o processo e de distanciamento por vezes. Com muita gratidão no coração por fazer parte da minha vida.

Gostaria de agradecer em especial para minha sogra Zenaide Vargas e meu cunhado Eduardo Vargas, que nesse último ano que se passou me ajudaram com cuidados para com meu filho, para que assim eu pudesse me dedicar a essa dissertação, por vezes deixando seus afazeres. Meu muito obrigado.

Ao meu filho amado, que de todas as surpresas e bençãos que Deus me proporcionou você é a melhor e maior de todas elas. Meu amor eterno Isaac Pontes Vargas.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Luciano Fernandes Huergo pela orientação, ensinamento, apoio, amizade durante esse tempo de convivência e por confiar este trabalho a mim. Essa confiança contribuiu para o meu amadurecimento profissional e pessoal.

Ao meu Coorientador Professor Rafael Metri, pela sua parceria nas coletas e extração dos materiais de pesquisa. Seus ensinamentos, apoio e amizade foram de grande valia para minha vida profissional.

Agradeço ao Professor Rodrigo Arantes Reis, pelo incentivo e pelo voto de confiança no meu trabalho e em mim. Espero que sua dedicação mesmo com seu escasso tempo tenha valido a este projeto de pesquisa.

Às pessoas que acreditaram e torceram por mim: meus familiares (não vou citar nomes, pois são muitos), a família dos meus padrinhos Adriana e André que me acolheram com muito carinho. Obrigada pela torcida sempre!

Ao Grupo Tretas que vibraram a cada etapa conquistada e torceram para que eu conseguisse chegar até aqui. Valeu pessoal!

Aos meus grandes amigos e colegas do laboratório de Microbiologia Ambiental: Felipe, Júlia, Marcelo, Fabiano e Layla não só pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho, mas também pelo carinho, companheirismo, convívio diário, troca de informações e ensinamentos tanto profissionais quanto pessoais. Obrigada por me entenderem, principalmente nas minhas ausências devido à gravidez.

Gostaria de agradecer aos técnicos dos laboratórios da UFPR Litoral, em especial a Mariana Nazário pelas horas de conversa, pelos incentivos, pela levatada de autoestima, pelo apoio durante minha gravidez e principalmente pelo carinho que você me ofertava quando me sentia sozinha. Muito obrigada Mari!

Gostaria de agradecer a minha amiga Renata Pires, que me acompanhou desde minha inscrição até eu dizer fui “APROVADA”, foram muitas conversas, muitos chororôs, muita comida e muito vinho (rsrs). Obrigada por tudo nessa caminhada Rê.

Não posso me esquecer da equipe do EA do REBIMAR, Jeziel obrigada pela sua força e parceria em todos os dias durante esse mestrado. Com você eu ri horrores, mesmo porque pessoas “juvenis” são assim, vivem rindo até mesmo nos dias ruins. Obrigada pela parceria.

Tem uma serumaninho que não tem como eu esquecer, esse alguém é você Marjorie e/ou Margela (rsrs). Obrigada! Obrigada por você existir! Você é uma criatura linda que Deus colocou no meu caminho. De início não entendi bem ao certo, mas hoje sei que você faz parte da minha vida simplesmente porque divide comigo todos os momentos. Todas as alegrias, tristezas, ganhos, perdas, me abraçava quando me faltou um abraço e me dá uma dura quando precisava. Você é uma amiga especial, uma joia preciosa que jamais encontrarei em outro lugar. Quero guardar você sempre no meu coração, aliás, como sairá de lá se já ocupa um lugar essencial, hein? Obrigada! Não tenho nada com que possa recompensar uma amizade tão linda assim. Apenas digo eu amo você e mais uma vez obrigada!

À minha amiga e professora de zoologia e da vida Fernanda Gatto, minha (florzinha), por todo seu carinho, ajuda em todos os momentos e por fazer com que as horas tristes se tornassem mais alegres com suas palavras de carinho e afeto.

Gostaria de agradecer a todos da turma de 2018 do Mestrado de Desenvolvimento Territorial Sustentável – PPGDTS. Mas, um agradecimento em especial a Camila Confortin minha gaúcha favorita na verdade conheço poucos (rsrsrs), você é uma grande companheira e amiga sem igual. Grata por tudo.

À Universidade Federal do Paraná - Setor Litoral e ao Programa de Pós-Graduação Desenvolvimento Territorial Sustentável, sem a qual esse trabalho não poderia ter sido desenvolvido.

A CAPES pela concessão da bolsa.

Obrigada a todos por acreditarem nesta e nas futuras conquistas que farei!.

“As espécies que sobrevivem não são as mais fortes, nem as mais inteligentes, e sim aquelas que se adaptam melhor às mudanças”.

(Charles Darwin)

“A frase mais empolgante de ouvir em ciência, a que prenuncia novas descobertas, não é “EUREKA”, mas sim “isto é estranho...”.

(Isaac Asimov)

RESUMO

O ambiente marinho é caracterizado por possuir parâmetros típicos, como alta pressão, salinidade, temperatura, ausência de luz, entre outros e por possuir uma enorme diversidade de microrganismos. Estudar a comunidade bacteriana marinha é de suma importância para compreender a estrutura e o padrão de distribuição dessa comunidade. A diversidade bacteriana marinha pode ser mais bem estudada, combinando técnicas convencionais e técnicas que empreguem tecnologias modernas para sua melhor compreensão. Portanto, este estudo buscou analisar a comunidade microbiana marinha de um dos únicos afloramentos rochosos existente no Estado do Paraná, encontrado no Parque Nacional Marinho das Ilhas dos Currais, a qual foi estudada pela primeira vez, através da utilização de uma metodologia inovadora como o sequenciamento do gene 16S rRNA e ainda o emprego das estruturas denominadas de ARMS, para a captura passiva das amostras a serem analisadas em dois pontos dentro do parque (Ponto RAM e Ponto Currais). Foram identificados 36 diferentes tipos de filós na amostra total do ponto de coleta RAM e 34 diferentes tipos de filós na amostra total do ponto de coleta Currais. Ambos os pontos apresentaram como mais representativos os seguintes filós: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria* e *Verrucomicrobia*. Foi possível identificar 74 diferentes classes no ponto RAM e 77 no ponto Currais. Com prevalência para as classes pertencentes ao filo *Proteobacteria* em ambos os pontos: *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*. A classificação em nível de gênero do ponto RAM contabilizou um total de 309 diferentes possíveis gêneros, contando com as OTUs que não foram atribuídas a nenhum gênero encontrado no Banco de dados SILVA 132. Já no ponto Currais foram identificados 333 possíveis gêneros. Todos esses dados são únicos no afloramento rochoso das Ilhas dos Currais, esses dados contribuem diretamente para o conhecimento sobre a biodiversidade microbiana em ambientes recifais rochosos e podem contribuir ainda para o desenvolvimento de estudos sobre a dinâmica ecológica e ecossistêmica da comunidade microbiana marinha no litoral paranaense.

Palavras-chave: Microbiota marinha. 16S rRNA. Metagenômica. ARMS.

ABSTRACT

The marine environment is characterized by having typical parameters, such as high pressure, salinity, temperature, absence of light, among others, and by having a huge diversity of microorganisms. Studying the marine bacterial community is of paramount importance to understand the structure and distribution pattern of that community. Marine bacterial diversity can be better studied, combining conventional techniques and techniques that employ modern technologies for their better understanding. Therefore, this study sought to analyze the marine microbial community of one of the only rocky outcrops in the State of Paraná, found in the Marine National Park of the Currais Islands, which was studied for the first time, using an innovative methodology such as sequencing of the 16S rRNA gene and also the use of structures called ARMS, for the passive capture of samples to be analyzed at two points within the park (Ponto RAM and Ponto Currais). 36 different types of phyla were identified in the total sample of the RAM collection point and 34 different types of phyla in the total sample of the Currais collection point. Both points presented the following phyla as most representative: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria* and *Verrucomicrobia*. It was possible to identify 74 different classes at the RAM point and 77 at the Currais point. With prevalence for the classes belonging to the phylum *Proteobacteria* in both points: *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*. The gender level classification of the RAM point accounted for a total of 309 different possible genres, including OTUs that were not assigned to any gender found in the SILVA 132 database. In the Currais point, 333 possible genres were identified. All these data are unique in the rocky outcrop of the Currais Islands, these data directly contribute to the knowledge about microbial biodiversity in rocky reef environments and may also contribute to the development of studies on the ecological and ecosystem dynamics of the marine microbial community on the Paraná coast.

Key-words: Marine microbiota. 16S rRNA. Metagenomic. ARMS.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - ÁRVORE FILOGENÉTICA UNIVERSAL.....	29
FIGURA 02 - QUANTIDADE DE ESTUDOS COM MICRORGANISMOS MARINHOS NO MUNDO	30
FIGURA 03 - LOCALIZAÇÃO DOS RECIFES ARTIFICIAIS MARINHOS DO PROGRAMA REBIMAR.....	35
FIGURA 04 - ESTRUTURA E INDICAÇÃO DAS SUBUNIDADES E MACROMOLÉCULAS DO RIBOSSOMO BACTERIANO	38
FIGURA 05 - O ESQUEMA DO COMPLEXO RIBOSSÔMICO E DO GENE 16S rRNA.....	39
FIGURA 06 - PROCESSAMENTO DA METAGENÔMICA DO GENOMA DE UMA COMUNIDADE INTEIRA DE MICROORGANISMOS	41
FIGURA 07 - EXPANSÃO EM ESCALA GLOBAL DO PROJETO ARMS.....	43
FIGURA 08 - ARMS (AUTONOMOUS REEF MONITORING STRUCTURES)	45
FIGURA 09 - LOCALIZAÇÃO DO “PONTO DE COLETA RAM” DENTRO DO PARNAMAR DAS ILHAS DOS CURRAIS.....	46
FIGURA 10 - LOCALIZAÇÃO DO “PONTO DE COLETA CURRAIS” NO INTERIOR DO PARNAMAR DAS ILHAS DOS CURRAIS.....	47
FIGURA 11 - PREPARAÇÃO PARA INSTALAÇÃO DOS ARMS JUNTO AO RAM, NO PARNAMAR DAS ILHAS DOS CURRAIS.....	48
FIGURA 12 - MÉTODO DE COLETA UTILIZANDO ARMS	49
FIGURA 13 - PREPARAÇÃO DA AMOSTRA MARINHA PARA ANÁLISES 16S RDNA	50
FIGURA 14 - ANÁLISE DE RAREFAÇÃO DA AMOSTRA TOTAL DO PONTO DE COLETA CURRAIS E RAM, NO PARNAMAR DAS ILHAS DOS CURRAIS	52
FIGURA 15 - FREQUÊNCIA RELATIVA EM NÍVEL DE DOMÍNIO DOS ORGANISMOS PROCARIOTOS IDENTIFICADOS NO PONTO DE COLETA RAM	52
FIGURA 16 - PERFIL DE DIVERSIDADE PARA ÁREAS AMOSTRADAS EM DOIS PONTOS NO PARQUE NACIONAL MARINHO DAS ILHAS DOS CURRAIS, PARANÁ, BRASIL USANDO A SÉRIE DE RÉYNI	55

FIGURA 17 - DISPERSÃO RIQUEZA VS EQUITABILIDADE, DOS GÊNEROS DA MICROBIOTA ENCONTRADOS NO PARNAMAR DAS ILHAS DOS CURRAIS	56
--	----

LISTA DE TABELA

TABELA 01 – OS DIFERENTES FILOS, CLASSES E GÊNEROS ENCONTRADOS NA AMOSTRA TOTAL NOS PONTOS RAM E CURRAIS.....	53
---	----

LISTA DE SIGLAS

%	- Por cento
®	- Registrado
µm	- micrômetro
16S rDNA	- RNA ribossomal 16s é um componente da pequena subunidade 30S dos ribossomos procarióticos.
ARMS	- (Autonomous Reef Monitoring Structures) ou Estruturas Autônomas de Monitoramento de Recifes
CEM	- Centro de Estudos do Mar
CoML	- Programa Census of Marine Life
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente
CRReefs	- Census of Coral Reef Ecosystems
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
ECO-92	- Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento
ECOPLAN	- Plano de Trabalho Consolidado
G	- gramas
IAP	- Instituto Ambiental Paranaense
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
ICoMM	- Censo Internacional de Micróbios Marinhos
INPE	- Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
IUCN	- International Union for Conservation of Nature ou União Internacional para a Conservação da Natureza.
Km	- quilômetro
km ²	- Quilômetro quadrado
ML	- Mililitro
Mm	- milímetro
MMA	- Ministério do Meio Ambiente
NOAA	- National Oceanographic and Atmospheric Administration
ONG	- Organização Não Governamental
PADCT	- Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

PARNAMAR	- Parque Nacional Marinho
Pb	- pares de base
PCR	- Reação Em Cadeia da Polimerase
pH	- Potencial Hidrogeniônico
PNUMA	- Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
PR	- Paraná
RAM	- Recifes Artificiais Marinhos
REBIMAR	- Programa de Recuperação da Biodiversidade Marinha
REP	- Repetitive Extragenic Palindromic
Rrna	- Ácido Ribonucleico Ribossômico
S	- Svedberg
SOS Mata Atlântica	- Fundação SOS Mata Atlântica
UAA	- Unidades Antiarrasto
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UNESCO	- Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a
Cultura	
WWF	- Fundo Mundial para a Natureza
μL	- microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	JUSTIFICATIVA.....	21
1.2	OBJETIVOS.....	21
1.2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
1.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1	DESENVOLVIMENTO TERRITORIAL SUSTENTÁVEL: UMA ANÁLISE DA RELAÇÃO DO PENSAMENTO HUMANO PARA COM O MEIO AMBIENTE	23
2.2	BIODIVERSIDADE MARINHA: A PERDA	26
2.3	MICROBIOLOGIA MARINHA	28
2.4	AMBIENTES RECIFAIS E RECIFES ARTIFICIAIS MARINHOS	31
2.5	RECIFES ARTIFICIAIS MARINHOS NO LITORAL PARANAENSE	33
2.6	PROGRAMA DE RECUPERAÇÃO DA BIODIVERSIDADE MARINHA - REBIMAR.....	34
2.7	MÉTODOS DE ESTUDO DA MICROBIOTA DO PARNAMAR DAS ILHA DOS CURRAIS E CONJUNTO RAM	35
2.7.1	ANÁLISES MOLECULARES DE COMUNIDADES MICROBIANAS	35
2.7.2	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 16S RDNA PELA REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE – PCR	36
2.7.3	METAGENÔMICA	39
2.7.4	ARMS - AUTONOMOUS REEF MONITORING STRUCTURES.....	41
3	METODOLOGIA	43
3.1	DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL ..	43
3.1.1	UTILIZAÇÃO DE AUTONOMOUS REEF MONITORING STRUCTURES (ARMS) PARA OBTENÇÃO DE AMOSTRAS AMBIENTAIS MARINHAS DE MICROORGANISMOS	44
3.1.2	PERÍODOS DE AMOSTRAGEM E PONTO DE COLETA DE AMOSTRA MICROBIANA MARINHA NO CONJUNTO DE RECIFES ARTIFICIAIS MARINHOS (RAM)	45

3.1.3	PERÍODOS DE AMOSTRAGEM E PONTO DE COLETA DE AMOSTRA MICROBIANA MARINHA NO INTERIOR DO PARNAMAR DAS ILHAS DOS CURRAIS	46
3.2	MÉTODOS DE COLETA.....	47
3.2.1	PROCESSAMENTO DO ARMS PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS MICROBIANAS NO PARNAMAR DAS ILHAS DOS CURRAIS	47
3.2.2	EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO (ARMS).....	50
4	RESULTADOS	51
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

A humanidade está vivendo em uma grave crise socioambiental, ao passo que o pensamento humano vem passando por diversas mudanças quanto ao quesito meio ambiente. A população já passou por vários eventos de destruição, desigualdades, desemprego e fome, levando várias nações a buscarem melhores condições de vida para sua população (KRONEMBERGER, 2011). Porém, esta melhoria tornou-se sinônimo de desenvolvimento, fazendo com que a partir da primeira metade do século XX, essa palavra fosse atrelada por muitos economistas da época como um processo de mudança quantitativa da estrutura econômica e social (KRONEMBERGER, 2011). Esse entendimento deixou menos explícito seu real significado de mudanças e transformações de ordem econômica, política e principalmente humana, social e ambiental (RODRIGUES, 2012).

Esse pensamento resultou em diversos problemas ambientais, tais como: exploração irracional dos recursos naturais, destruição da camada de ozônio, contaminação de rios e mares, perda da biodiversidade, devastação das florestas, dentre outros (ZHOURI et al., 2005). O ser humano tratou por muito tempo o meio ambiente como algo separado de sua existência, como algo que se possa viver distanciados, tornando assim a "dominação do meio ambiente" como seu motivador existencial. Porto-Gonçalves (2011) disserta que:

Desenvolvimento é o nome síntese da ideia de dominação da natureza. Afinal ser desenvolvido é ser urbano, é ser industrializado, enfim, é ser tudo aquilo que nos afasta da natureza e que nos coloque diante de constructos humanos, como a cidade, como a indústria (...) (PORTO-GONÇALVES, 2011, p. 24-25).

Esse período de transformações em que a sociedade atravessa parece clamar por um novo paradigma de desenvolvimento. O componente ambiental da crise é proveniente de demandas sociais resultantes da combinação entre um padrão de consumo insustentável, em particular nos países desenvolvidos, com a tenacidade da pobreza em países em desenvolvimento, como declarado no relatório da Avaliação Ecosistêmica do Milênio (MEA, 2005). Desta forma, é possível assemelhar a existência de uma relação mutuamente excludente entre desenvolvimento socioeconômico e conservação do meio ambiente. Assim, predomina um entendimento que conservar o meio ambiente implica em obstáculos ao desenvolvimento e geração de renda, e vice-versa. O desenvolvimento que é baseado à custa da degradação do meio ambiente é insustentável, especialmente na sociedade atual, nos quais

o consumismo se tornou um valor e as demandas de consumo aumentam em uma relação desmedida com o elevado aumento populacional (BAUMAN, 2011).

Com o mau uso da terra, em sua maior parte decorrente das demandas de consumo e dos interesses que movem o mercado, resultou no surgimento de 35 *hotspots* globais de biodiversidade, ou seja, espaços geográficos com elevada diversidade de espécies, altas taxas de endemismo e grande proporção de habitats degradados (MITTERMEIER et al., 2011). O Brasil possui dois *hotspots*, a Mata Atlântica e o Cerrado (SCARANO e CEOTTO, 2016). Atualmente, o modelo de desenvolvimento tradicional ameaça extensas coberturas naturais do planeta, visualizadas como fronteiras de expansão econômica. Pode-se citar a Amazônia brasileira como o maior exemplo dessa segunda categoria (NEPSTAD et al., 2009).

A conservação do meio ambiente deve ser reconhecida como parte essencial ao desenvolvimento sustentável, logo a biodiversidade assume seu papel central na atualidade. A biodiversidade - termo cunhado pelo cientista norte-americano Edward O. Wilson (nascido em 1929) para definir a diversidade biológica em vários níveis (ecossistemas, espécies e genes) - é particularmente rica no Brasil. Essa biodiversidade, por sua vez, é a garantia da oferta de diversos serviços ecossistêmicos que são vitais para a sobrevivência e o bem-estar humano. O Brasil é um país megadiverso, não surpreende que seja o país que contém também a maior proporção de água doce superficial (12%), seja o segundo maior produtor de alimentos e possua o maior estoque de carbono (SCARANO et al., 2010;2012).

A biodiversidade possui uma grande importância ambiental, econômica, social e até mesmo cultural. No âmbito das funções ambientais apresentadas pela biodiversidade, não se pode esquecer que ela é essencial para o funcionamento e equilíbrio de todos os ecossistemas do planeta (ADAMS et al., 2004). Sabe-se, que todos os seres vivos possuem uma parcela na participação da cadeia alimentar, e que quando ocorre à retirada de um organismo poderá desencadear um desequilíbrio ecológico. Dentro dessa biodiversidade, encontramos os microrganismos, seres de tamanhos extremamente reduzidos, muitas vezes incapazes de serem percebidos a olho nu. Segundo Ferreira (2014), os microrganismos foram os primeiros seres a colonizarem a Terra, e com o tempo se tornaram o grupo mais abundante e diversificado de organismos, os quais habitam praticamente todos os tipos de ambientes, inclusive os que extrapolam o limite de sobrevivência de animais e plantas, incluindo ambientes com altas e baixas temperaturas, ambientes abissais e áreas quimicamente contaminadas.

Os microrganismos encontrados nos ecossistemas marinhos desempenham papéis centrais nas cadeias alimentares, assim como nos ciclos biogeoquímicos, como, por exemplo, os ciclos do carbono e nitrogênio (WHITMAN et al., 1998). Os microrganismos marinhos podem ser encontrados tanto em vida livre como em relações de simbiose com outros organismos, como camarões, esponjas, foraminíferos, peixes, poliquetas, entre outros. Aqui se destaca a associação destes organismos aos ambientes recifais, os quais apresentam uma microbiota bastante biodiversa (ROHWER et al., 2002) e que vem sendo crescentemente estudada. Para Marhaver et al. (2008), o interesse no estudo pela microbiota associada aos ambientes recifais cresceu devido à confirmação que estes podem ser patogênicos ou mutualistas, quando servem-se dos restos de alimentos dos organismos encontrados nesse habitat, os quais realizam fixação de nitrogênio, produção de vitaminas e substâncias antimicrobianas.

São poucos os trabalhos que cingem o ecossistema marinho brasileiro acerca deste assunto, mesmo o nosso país possuindo ecossistemas marinhos únicos, que englobam desde recifes de corais com altos níveis de endemismo até amplas áreas de manguezais ainda conservadas (ALVARENGA et al., 2015). Desta forma, trabalhos recentes têm mostrado que a diversidade microbiana brasileira vem sendo estudada, principalmente no que diz respeito às comunidades microbianas associadas a sedimento (DIAS et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009), rochas (von der WEID et al., 2008), solos (OLIVEIRA et al., 2006; ABOIM et al., 2008), plantas (ANDREOTE et al., 2009) e algumas espécies de corais (BOURNE e MUNN, 2005; REIS et al., 2009).

Portanto, o presente estudo procurou caracterizar a diversidade da microbiota encontrada no ecossistema marinho no conjunto de Recifes Artificiais Marinhos (RAM) e no interior no Parque Nacional Marinho (PARNAMAR) das Ilhas dos Currais, a pesquisa enfoca as comunidades bacterianas identificadas através de abordagens metagenômicas e a utilização de metodologia inovadora de coleta passiva de ambientes recifais com a utilização dos *Autonomous Reef Monitoring Structures* (ARMS).

1.1 JUSTIFICATIVA

O conhecimento da biodiversidade marinha paranaense baseia-se principalmente em estudos relacionados com produtividade pesqueira e riqueza de espécies ocorrentes no Complexo Estuarino de Paranaguá e praias vizinhas (PINHEIRO, 2005), deixando os estudos sobre diversidade da microbiota marinha muito atrás dos outros grupos estudados. Os microrganismos marinhos desempenham papéis de grande importância nos ciclos biogeoquímicos, como, por exemplos, os ciclos do carbono e nitrogênio (WHITMAN et al., 1998). São poucos os trabalhos que cingem o ecossistema marinho brasileiro relacionado com a microbiota (ALVARENGA et al., 2015). Para minimizar as perdas da biota marinha por fatores diversos, foram criados os “Recifes Artificiais Marinhos” ou como são popularmente chamados de “RAM”, os quais foram instalados dentro da área do PARNAMAR das Ilhas dos Currais. São estruturas de materiais construídos pelo ser humano, que quando dispostos no ambiente marinho fornecem substrato para a colonização de diversos organismos, criando um ambiente artificial similar aos recifes naturais, ou seja, são estruturas criadas com o propósito de imitar algumas características dos recifes naturais (SALE, 2005).

Acredita-se que os microrganismos possuem um importante papel fisiológico e ecológico dentro dos ecossistemas recifais relacionados à nutrição e a defesa (COFFROTH, 1990; RITCHIE, 2006). Alguns organismos marinhos contêm bactérias capazes de fixar nitrogênio quando a concentração de oxigênio intracelular está baixa (LESSER et al., 2004) e outros microrganismos são produtores de toxinas e antibióticos contra predadores e/ou competidores (KELLOGG, 2004; RITCHIE, 2006). Portanto, compreender como a associação entre os microrganismos e os ambientes recifais ocorre ao longo do tempo é de grande importância para entender a sucessão ecológica nos ecossistemas recifais (BOURNE e MUNN, 2005).

Baseado no pressuposto que o ambiente marinho possui uma ampla variedade bacteriana, parte-se da hipótese de que a diversidade microbiana encontrada no PARNAMAR das Ilhas dos Currais e no conjunto de Recifes Artificiais Marinhos apresente uma grande diversidade microbiana. Assim, o presente estudo visa analisar a diversidade bacteriana através de análises do gene 16S rDNA e testar pela primeira vez a estrutura denominada de ARMS, para a coleta passiva da amostra microbiana sem danos a comunidade incrustante.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar taxonomicamente a microbiota encontrada no Conjunto de Recifes Artificiais Marinhos e no interior do PARNAMAR das Ilhas dos Currais, utilizando ARMS (Autonomous Reef Monitoring Structures) e sequenciamento dos genes 16S rDNA.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Extrair o DNA total de material bentônico aderido ao dispositivo ARMS instalados no PARNAMAR das Ilhas dos Currais;
- B. Caracterizar a diversidade das bactérias, através da técnica de sequenciamento da região 16S rDNA;
- C. Realizar a análise da comunidade microbiana encontrada no PARNAMAR das Ilhas dos Currais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DESENVOLVIMENTO TERRITORIAL SUSTENTÁVEL: UMA ANÁLISE DA RELAÇÃO DO PENSAMENTO HUMANO PARA COM O MEIO AMBIENTE

Segundo Boff (2011), atualmente é questão de sobrevivência falar em sustentabilidade. Dessa forma, buscou-se sistematizar e problematizar a discussão sobre os agravos provocados pela sociedade ao meio ambiente, despertar uma realidade que requer planejamento, bem como responsabilidade para com o fator desenvolvimento. Certamente, já se ouviu falar muito em sustentabilidade no meio de diversos contextos. Contudo, essa não deve ser utilizada para conter ou regular a ação antrópica, uma vez, que para a compreensão de um desenvolvimento sustentável, traz-se uma discussão sobre uma nova relação entre Homem e Meio Ambiente, onde haja um desenvolvimento que atenda às necessidades básicas da população, respeitando a capacidade dos recursos naturais, para que estes não acabem se exaurindo.

Pode-se dizer que os processos territoriais e de desenvolvimento são interativos, contraditórios, conflitantes e estão se movendo através da economia, política e cultura (DEMATTEIS e GOVERNA, 2005). Aparentemente o território corresponde à primeira sensação de que temos posse de algo, é o concreto que se torna visível (SAQUET, 2013). “Desde a ocupação do planeta pela humanidade, a compreensão da espacialidade é vinculada a intervenção do homem no meio ambiente, ou seja, a forma como modificamos cada espaço” (NAVES e BERNARDES, 2014). Dessa forma, é possível relatar que a atual forma em que nosso planeta se encontra é resultado do modo de como a humanidade se vê e se relaciona com a natureza. O pensamento que reinava nos primórdios da civilização era de que o ser humano estava no centro de tudo (homocentrismo), acima do bem e do mal, e bem acima das demais formas de vida existentes no planeta, por esse motivo deveria assumir o papel de dominador da natureza através do trabalho. Nessa perspectiva, a natureza era vista somente como um recurso inesgotável, criada para servir aos prazeres da humanidade. Fazendo com que o meio ambiente fosse encarado como simples meio de produção, gerador de riqueza para o Homem. Sua utilização - em forma e intensidade - ficava dessa forma subordinada aos interesses econômicos. E a ciência econômica fundamentando-se no cálculo econômico, isto é, nos valores de troca, esquecendo os valores de uso (COMELIAU e SACHS, 1988).

Podemos dizer que a visão de creditar ao ser humano uma parcela significativa de culpa dos drásticos acontecimentos ao meio ambiente é devida à consequência da ideia de que é a partir do desenvolvimento das tecnologias e sua multiplicação socioespacial que as catástrofes e desastres ambientais vêm ocorrendo de forma surpreendente. Portanto, as questões relacionadas aos aspectos ambientais são hoje associadas ao desenvolvimento da civilização, às crises sociais, econômicas e políticas que as acompanham, da mesma maneira, que a degradação do meio ambiente deixa ser apenas um problema relativo à natureza e ganha a dimensão de um problema socioambiental (NAVES e BERNARDES, 2014).

Segundo Leff (2007), há uma óbvia relação entre o desenvolvimento da civilização e a degradação ambiental. “A problemática ambiental – a poluição e degradação do meio, a crise de recursos naturais, energéticos e de alimentos – surgiu, nas últimas décadas do século XX, como uma crise de civilização, questionando a racionalidade econômica e tecnológica dominante” (LEFF, 2007, p.61). Segundo o mesmo autor, os agravos ambientais acarretam mudanças globais que comprometem a manutenção de diversos sistemas socioambientais, prejudicando a sustentabilidade do planeta. Mas, ele considera que tal situação está intimamente vinculada ao modo como se compreende e se estabelece uma relação entre as ações ou modo de existir humano e o meio ambiente. Leff (2007), frisa a necessidade de se buscar novos valores e conhecimentos que visem ao estabelecimento de processos de gestão dos recursos naturais que suplantam o modo capitalista de racionalidade produtiva. Portanto, faz-se necessário evidenciar a relação do homem com espaço geográfico, sobretudo a concepção de natureza que ela traz, para elucidar os caminhos dos novos processos que se fazem presentes na sociedade contemporânea, promovendo a discussão sobre a questão ambiental e seus desdobramentos.

Mundialmente, foi a partir da década de 1960 no século XX que os movimentos ambientais ganharam maior notoriedade, pois foi a partir da “denúncia do viés economicista/produtivista ainda hoje profundamente enraizados nos nossos sistemas de planejamento e gestão, que o meio ambiente passou a ser considerado como uma dimensão constitutiva das políticas de desenvolvimento” (VIEIRA, 2013, p.122). Já no Brasil, o movimento ecológico surgiu na década de 1970 no século XX sob duas bases: a primeira na presença do Estado interessado nos investimentos estrangeiros, os quais só eram enviados se o país adotasse medidas preservacionistas; a segunda pelos movimentos sociais gaúchos e fluminenses com a contribuição dos exilados políticos um movimento político ou filosófico

que tem como uma de suas principais características as preocupações ambientais, reivindicando e legitimando-as (GONÇALVES, 2000).

Foi em 1972, em Estocolmo na Suécia que houve a legitimação das preocupações ambientais na Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente, buscando soluções para as desigualdades sociais e econômicas entre países desenvolvidos (1º Mundo) e subdesenvolvidos (3º Mundo), bem como os elevados índices de poluição atmosférica e a escassez dos recursos naturais. Segundo Rodrigues (1994, p. 120), a Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente proclamou “o direito universal de todos os povos aos recursos naturais da Terra”. No relatório Brundtland de 1987, as desigualdades são os maiores problemas ambientais e a pobreza é a causa e o efeito dos problemas ambientais, nesse relatório foi apresentada uma proposta de desenvolvimento, que poderia manter o progresso humano no planeta inteiro para as próximas gerações, denominado como “Desenvolvimento Sustentável”, sendo este o ponto principal para Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento realizada no Rio de Janeiro 1992 ou “ECO-92”.

Para atingir o desenvolvimento sustentável é necessário retomar o crescimento econômico; alterar a qualidade do desenvolvimento; atender às necessidades essenciais de emprego, alimentação, energia, água e saneamento; manter um nível populacional sustentável; conservar e melhorar a base de recursos; reorientar a tecnologia e administrar o risco; incluir o meio ambiente e a economia no processo de tomada de decisões. Só assim, afirmam, se atingirá o desenvolvimento sustentável considerado como aquele que atende às necessidades do presente sem comprometer a possibilidade de as gerações futuras atenderem a suas próprias necessidades (RODRIGUES, 1994, p. 119-126). O desenvolvimento sustentável se configura como uma alternativa ao significado de “crescimento econômico”, apontando que, sem o meio ambiente, nada pode ser produzido de forma concreta. Notoriamente, o ponto exato onde a economia se localizará depende de considerações morais pertencentes aos interesses de gerações presentes e futuras (CAVALCANTI, 1999).

Nesta linha de pensamento pode-se dizer que é praticamente impossível dissociar a relação homem e meio ambiente. Tanto que a popular afirmação do geógrafo Ruy Moreira (1994, p.81) “[...] a natureza está no homem e o homem está na natureza [...]” é inegável e revela que a relação entre ambos se realiza de forma intrínseca. Portanto, o atual momento do desenvolvimento capitalista, crescimento demográfico, industrialização, poluição/degradação, recursos exaurindo, refere-se ao descomedimento capitalista sob a ciência e tecnologia. Ainda assim, outras ciências emergem no viés do desenvolvimento sustentável para unificar os

conceitos referentes à natureza, através de um equilíbrio entre a relação homem e meio ambiente (BERNARDES e FERREIRA, 2005).

A degradação ambiental é manifestada como o sintoma de uma crise da civilização. A questão ambiental conduz a problematização das bases de produção, apontando uma reorganização dos paradigmas econômicos para que possa ser possível a idealização de um futuro onde as bases econômicas estejam fundidas com as questões ambientais, garantirá um futuro para as novas gerações (LEFF, 2011). Mota (2006) revela que o meio ambiente nas primícias de seus diversos ecossistemas e habitats, fornece para a sociedade um agregado de serviços e produtos, dos quais, por exemplo, é base para, derivados medicinais, alimentação, lazer, entre outros. Todavia, esses elementos estão sujeitos à deterioração ao longo da utilização desenfreada do ser humano. Como visto, as atividades humanas e econômicas têm causado danos muitas vezes irreversíveis para o meio ambiente, através da superexploração dos recursos naturais, acarretando a perda da biodiversidade, muitas vezes sem nem conhecer e compreender a ecologia desses espécimes.

É através desse contexto que pesquisas envolvendo ecologia e diversidade, atrelados aos pilares do desenvolvimento sustentável, possuem suma importância, pois o conhecimento da biodiversidade local pode possuir grandes potenciais de usos e de propagação, além de contribuir no equilíbrio do ecossistema estudado, podendo gerar e agregar valor aos produtos locais obtidos através do meio ambiente.

2.2 BIODIVERSIDADE MARINHA: A PERDA

O termo biodiversidade e/ou diversidade biológica, representa não apenas as espécies, mas também os níveis genéticos e ecossistêmicos, o qual é o resultado de milhões de anos de evolução biológica e genética. Segundo a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), um dos mais importantes documentos internacionais relacionados ao meio ambiente, diversidade biológica ou biodiversidade é definida como:

“a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte; compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas” (BRASIL, 2000).

A biodiversidade total em estimativa mundial varia entre 3 e 100 milhões de espécies, atualmente a melhor estimativa é de 13 milhões (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME, 1995). Os trópicos possuem a maior parte da biodiversidade a ser descoberta, no Brasil estima-se que existam mais de três milhões de espécies, muitas ainda desconhecidas pelos pesquisadores. Do total de 1,5 milhão de espécies já catalogadas no mundo todo, o Brasil detém cerca de 20% (WWF, 2006).

É no ambiente marinho que se encontra a maior diversidade de organismos em termos de linhagens filogenéticas (JOLY et al., 2011). Dos 35 filos de animais conhecidos, apenas um não é encontrado no ambiente marinho, o constituído pelos vermes *Onychophora* estão integralmente ausente dos oceanos (BALDAUF, 2003). No entanto, o número de espécies marinhas conhecidas é moderadamente baixo, em torno de 200 mil, independentemente de o número de estudos acerca da biodiversidade tenha aumentado de modo significativo, durante as últimas duas décadas, somente uma pequena fração refere-se ao ambiente marinho (RADULOVICI et al., 2010).

A costa brasileira possui cerca de 9.198 km de extensão, sem contabilizar as diversas ilhas e arquipélagos, e ainda aproximadamente 800 mil km² de plataforma continental (AB'SÁBER, 2001). O conhecimento da biodiversidade no ambiente marinho ainda é muito limitado no Brasil, especialmente em regiões mais profundas. Este ambiente apresenta uma grande reserva de biodiversidade que pode vir a ser explorada de forma sustentável, como fonte de recursos renováveis, incluindo fonte de diversos fármacos, alimentos e produtos naturais (JOLY et al., 2011).

Mesmo a biologia marinha tenha se tornado uma nova fronteira de estudos com implicações globais, esta biodiversidade tem sofrido diversas ameaças, como superexploração do pescado, degradação de habitats, poluição, aquecimento global, organismos invasores, entre outros (LOPES, 2009; JOLY et al., 2011). Para Joly et al. (2011), a região costeira tem sido demasiadamente atingida pelas intervenções humanas, com destaque para a ocupação costeira sem planejamento e infraestrutura e também um turismo não sustentado. Outras intervenções humanas têm exercido impactos profundos em habitats marinhos, como a deterioração de mangues e de recifes de coral, impactando diretamente a pesca local.

A pesquisa sobre a biodiversidade marinha brasileira é principalmente relacionada com inventários, taxonomia e ecologia, contudo existem pesquisas em diversas frentes que incluem: estoques pesqueiros, bioprospecção, modelagem e genética. Os estudos com a biodiversidade marinha vêm crescendo gradativamente, necessitando com que haja o uso de ferramentas moleculares para auxiliar na identificação das espécies (STOKSTAD, 2010). Contudo, segundo a base de dados do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) quanto aos grupos de pesquisa relacionados com a biodiversidade marinha:

...existem cerca de 114 grupos trabalhando em áreas relacionadas à biodiversidade marinha no Brasil, incluindo principalmente taxonomia e ecologia, mas também existem grupos trabalhando com genética, bioprospecção e ecotoxicologia, entre outros. Esses grupos obviamente se concentram nos estados localizados na região da costa da seguinte forma: 48,4% no Sudeste (sendo 28% no Rio de Janeiro e 20,4% em São Paulo); 30% no Nordeste; 18% no Sul e 3,6% no Norte. (JOLY et al., 2011, p. 124)

A biodiversidade marinha é de suma importância para a vida no planeta, é ela quem suporta o ambiente em que vivemos e do qual todos os organismos existentes dependem. Através da biodiversidade marinha é possível obter alimentos, vestimentas, moradia, medicamentos, energia, transporte e muito mais. Logo, é imprescindível que haja a conservação dessa biodiversidade e para tanto, é de extrema necessidade um conhecimento prévio das espécies existentes e suas características em todos os habitats possíveis (VIANA, 2015).

Mesmo vivenciando a degradação que afeta a biodiversidade brasileira e mundial, ainda é possível encontrar lugares onde há remanescentes de vegetação nativa bem conservada, a qual proteja a costa litorânea, como é o caso do litoral do Estado do Paraná. O mesmo está inserido em um dos 34 *hotspots* mundiais de biodiversidade prioritários para a conservação global, o Bioma Mata Atlântica (MYERS et al. 2000; MITTERMEIER et al. 2004). O litoral paranaense apresenta um dos últimos remanescentes de Mata Atlântica costeira brasileira, ainda preservadas (TIEPOLO, 2015). O litoral paranaense é composto por sete municípios (Guaraqueçaba, Antonina, Morretes, Paranaguá, Pontal do Paraná, Matinhos e Guaratuba), totalizando aproximadamente 6.058,043 km², apresentando uma diversidade de usos e ocupações de seu território como: atividades portuárias, pesqueiras, turismo e conservação da natureza (SANTOS e QUADROS, 2016).

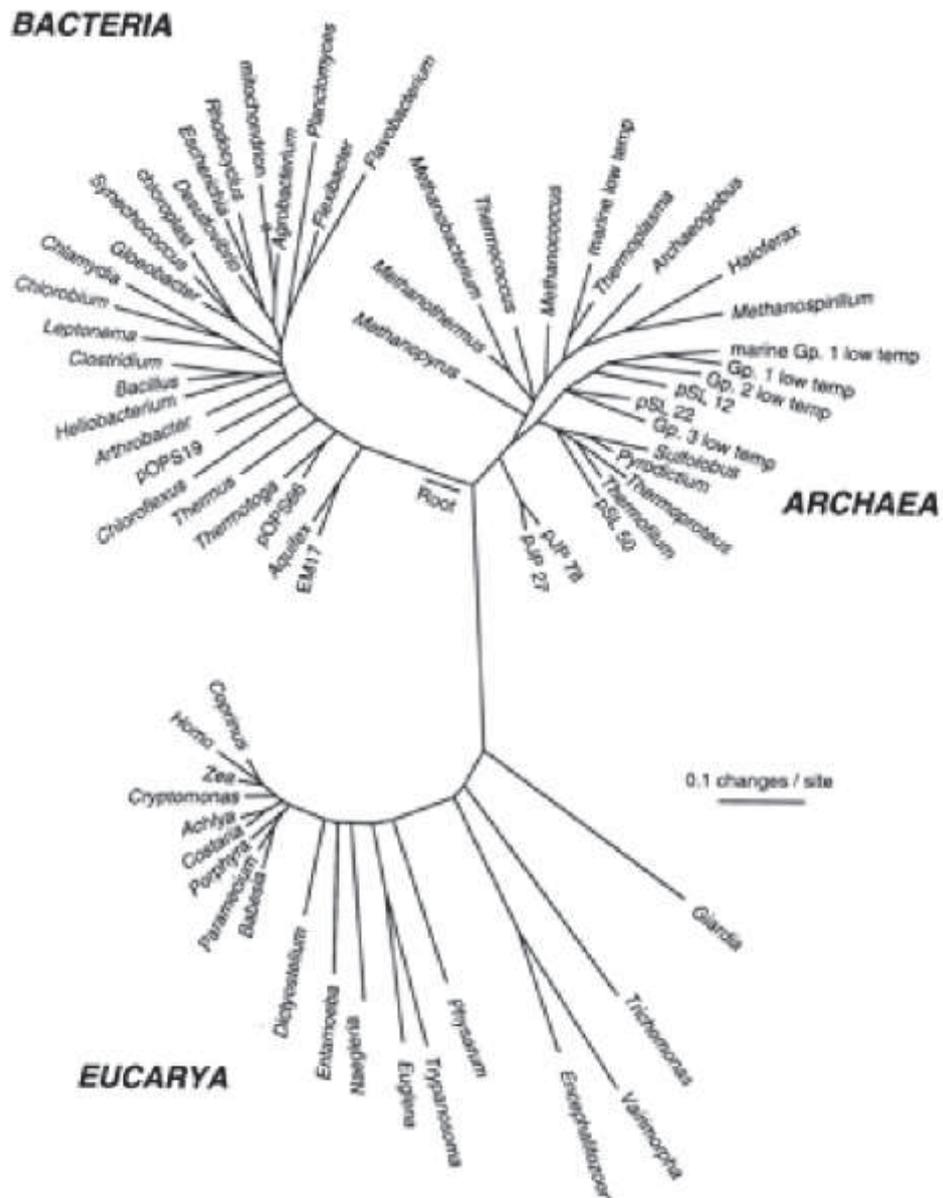
O Estado do Paraná possui uma das menores costas brasileira, e apresenta uma certa escassez de habitats consolidados (SILVA, 2001), porém o litoral paranaense apresenta um ecossistema marinho responsável por incrementar e suportar uma grande biodiversidade (DAJOZ, 1983). Contudo, os povos tradicionais que habitam na sua costa sofrem com o não reconhecimento de suas tradições como a pesca artesanal, invasão de espécies exóticas, desastres ambientais como derrames de óleo e ainda sofrem com a pesca industrial de outros estados, comprovando com isso, uma política de abandono premeditado estabelecido nesta localidade da costa brasileira.

Monteiro (2014), declara que uma das modalidades de atribuir valor econômico à biodiversidade é a bioprospecção, a qual almeja a busca por organismos, enzimas, genes, compostos, partes provenientes da diversidade biológica e processos, que possam vir a ter algum potencial econômico, podendo trazer com sua utilização o desenvolvimento de um produto que possa ser possuída pela população. A partir do instante em que o processo de agregar um valor justo a biodiversidade, através da importância da sua utilidade, desencadeará um apreço e incentivo à conservação do meio ambiente. Tornando assim, o levantamento da biodiversidade de um determinado habitat de suma importância, despertando a importância de destacar formas de trazer o desenvolvimento sustentável em torno da construção de novos fármacos e biotecnologias provenientes da diversidade local, trazendo consigo o almejo do ecodesenvolvimento, ou seja, trazendo níveis mínimos de degradação ao meio ambiente, respeitando os limites de regeneração e reprodução dos espécimes existentes nesta localidade, gerando dessa forma o mínimo de impacto para a população atual e para as gerações futuras.

2.3 MICROBIOLOGIA MARINHA

A microbiologia é a ciência que estuda os organismos que não são possíveis de serem vistos a olho nu, os então chamados microrganismos entre eles estão eucariontes unicelulares e procariontes, tais como as bactérias, fungos e vírus (WOESE, 1994). Os microrganismos estão representados nos três grandes grupos da árvore da vida: *Archaea*, *Bacteria* e *Eucarya*. (FIGURA 1)

FIGURA 1- ÁRVORE FILOGENÉTICA UNIVERSAL



FONTE: Adaptado de PACE (1997).

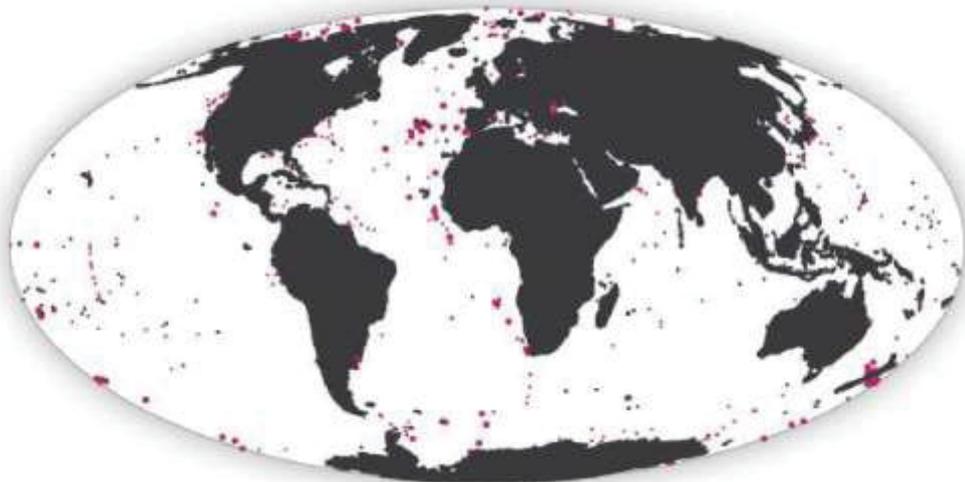
LEGENDA: Árvore filogenética universal baseada nas sequências de 16S e 18S rRNA, mostrando 64 sequências de rRNA de todos os domínios filogenéticos conhecidos.

Em 1990, Carl Woese propôs um esquema classificativo, denominado de “Sistema dos Três Domínios”, designado para diferenciar os reinos taxonomicamente através de três grandes clados chamados então por domínios. O domínio Archaea, abarca os seres vivos unicelulares morfológicamente semelhantes às bactérias, contudo que possuem genética e bioquímica tão distante destas como dos eucariontes (TAUER e BENNER, 1997; SCHLEIFER, 2009). O domínio *Bacteria*, é considerado a primeira forma de vida a surgir na Terra (MARGULIS e SAGAN, 2002, p. 91) e estão presentes em praticamente todos os habitats, possuem apenas alguns micrômetros de comprimento e formas variadas que vão desde esferas e espirais a bastões (CARVALHO, 2010). Tanto o domínio Archaea quanto o

Bacteria, possuem organismos procariotos (i.e. que apresentam parede celular rígida e sem a presença de uma membrana nucleica para limitar o DNA) (CARVALHO, 2010). Por último, o domínio Eucarya, representa todos os seres vivos com células eucarióticas (i.e. com um núcleo celular rodeado por uma membrana onde o material genético é compartimentado, separado do citoplasma e com diversas organelas em sua volta), nesse grupo estão incluídos organismos como as algas unicelulares, fungos, protistas flagelados e ciliados, plantas e animais (ALMEIDA, 2009).

Os microrganismos são considerados os seres com maior diversidade genética existente entre os seres vivos, mas, apesar disso, a maior parte das espécies permanece desconhecida e, além de abundantes, também são capazes de se adaptar a muitos ambientes extremos no oceano (WHITMAN et al., 1998; ROSSELLÓ-MORA e AMANN, 2001; KIRCHMAN, 2008). O ambiente mais estudado quando se trata de microrganismos é o terrestre, devido à facilidade de acesso ao mesmo e quanto os ambientes marinhos que ocupam grande parte da superfície terrestre, e que são responsáveis por diversos processos ambientais globais, tais como: os ciclos geoquímicos do carbono, nitrogênio, enxofre, ferro etc. (MADIGAN et al., 2010) são relativamente bem menos estudados (FIGURA 2).

FIGURA 2 - QUANTIDADE DE ESTUDOS COM MICRORGANISMOS MARINHOS NO MUNDO



FONTE: Adaptado de Census of Marine Life (2020).

Segundo Ferreira (2014), estima-se que existam cerca de 1.000.000 de macrorganismos e dezenas de milhões de microrganismos nos mares e oceanos. O Censo Internacional de Micróbios Marinhos (ICoMM) descobriu, ao analisar amostras coletadas em todo mundo, que a diversidade microbiana no oceano pode chegar a exceder todas as

estimativas anteriores em pelo menos uma ou duas ordens de grandeza. Um único litro de água do mar pode conter 20.000 espécies de bactérias e um grama de areia marinha pode conter entre 5.000 e 19.000 espécies (Census Of Marine Life, 2020). Com essa elevada abundância e diversidade química encontrada no ecossistema marinho, pode-se enfatizar a grande importância deste ambiente para a prospecção de novos compostos para a elaboração de novos fármacos (LEAL et al. 2012).

2.4 AMBIENTES RECIFAIS E RECIFES ARTIFICIAIS MARINHOS

O ambiente marinho é considerado o maior habitat contíguo à Terra, abrigando diversos outros ecossistemas singulares e riquíssimos em biodiversidade (HARPER e HAWKSWORTH, 1995). Contudo, mesmo não havendo barreiras evidentes no ambiente marinho, o oceano é um mosaico de habitats que vão desde locais abertos como grandes conjuntos de corais até locais menores como manguezais, sendo todos mantidos pelas interações das escalas globais entre a atmosfera e o oceano (LONGHURST, 1998). Os ambientes recifais são considerados berçários naturais de diversas espécies marinhas, logo estão entre os ecossistemas biologicamente mais diversos, complexos e economicamente valiosos para a humanidade, apoiando a pesca, protegendo as costas litorâneas, criando empregos e são ainda fontes de novos fármacos (REAKA-KUDLA, 1996). Contudo, eles sofrem diversas degradações advindas do homem tais como: sedimentação, poluição e exploração de recursos, e ainda as ações naturais como aquecimento e acidificação dos oceanos (ALBRIGHT et al. 2002). Grande parte da diversidade encontrada nesses ambientes ainda não foi identificada e/ou descrita e considerando a perda de diversidade em curso, grande parte nunca será. Considerando os recifes coralíneos como exemplo, estima-se uma perda de 19 a 61% da cobertura dos recifes já tenha sido perdida nas últimas décadas, e esses números só tendem a aumentar com o crescimento populacional e o desenvolvimento desenfreado nas grandes metrópoles nas costas litorâneas (CARPENTER, 2008).

O Estado do Paraná possui uma das menores costas do Brasil, e possui escassos ambientes recifais rochosos, as únicas formações de substrato consolidado que emergem em uma plataforma areno-lodosa extensa nessa região são: Ilha da Figueira, Ilha de Currais e Ilha de Itacolomis (SILVA, 2001). Devido à escassez de ambientes com substratos consolidados no litoral do Paraná, ocorreu a implantação de um sistema de recifes artificiais marinhos (RAM), essas estruturas artificiais têm sido utilizadas para manter a biodiversidade, podendo

funcionar, quando empregada corretamente, como uma ferramenta importante na recuperação de áreas degradadas e no desenvolvimento sustentável das regiões costeiras (MONTEIRO e CARVALHO, 1989; SEAMAN, 2000). Em diversos países do mundo, está sendo implantados Recifes Artificiais Marinhos (RAM) com a finalidade de viabilizar o aumento do pescado para os pescadores artesanais, mitigar as perdas de recursos naturais por meio do incremento do aumento de peixes, atenuar os processos erosivos, estimular o turismo subaquático, diminuir a degradação causada pela pesca de arrasto, dentro diversos outros fatores (SINIS et al. 2000). No Brasil, outros estados já adotaram estes materiais em sua costa, como é o caso do Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Sergipe, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. Estes estados desenvolvem programas de instalação de recifes artificiais marinhos através de parcerias com universidades e organizações não governamentais, usufruindo de estruturas que vão desde pneus, cascos de embarcações e estruturas que simulam rochas (SANTOS e PASSAVANTE, 2007; ALENCAR et al. 2003).

Os recifes artificiais marinhos, também chamados de RAM, podem ser definidos como estruturas inseridas no meio aquático acidental ou propositalmente, com a finalidade de fornecer substrato consolidado que permita a fixação de espécies sésseis, ou seja, sem nenhum tipo de locomoção, criando dessa forma a oportunidade do surgimento de toda uma comunidade biológica a partir da incrustação de produtores primários (CASTANHARI et al. 2012). Os RAMs, quando dispostos no ambiente marinho, fornecem substrato para a colonização de diversos organismos, criando um ambiente artificial similar aos recifes naturais (SALE, 2005).

De acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) do Ministério do Meio Ambiente (MMA) do Brasil, recifes artificiais são definidos como qualquer estrutura construída ou preparada para instalação em ambiente subaquático que simulam as propriedades de recifes naturais, tendo como principais finalidades: conservação, manejo e pesquisa; e exploração e o aproveitamento sustentável dos recursos do mar (CASTANHARI et al. 2012). Os recifes artificiais são considerados uma poderosa ferramenta na promoção do gerenciamento costeiro e no incremento de estoques pesqueiros, a popularização de seu uso nas atividades pesqueiras abriu novos caminhos para sua utilização (POLOVINA, 1991).

Os RAMs podem funcionar, como ferramentas de mitigação de áreas degradadas e como atrativos para áreas utilizadas por mergulhadores recreativos (SANTOS et al. 2010). Seu uso pode auxiliar na contenção da pesca de arrasto, em locais onde estas práticas são

proibidas, pois inviabiliza o uso da rede no local, causando danos à propriedade do infrator (WHITMARSH et al. 2008).

2.5 RECIFES ARTIFICIAIS MARINHOS NO LITORAL PARANAENSE

Os recifes artificiais foram instalados pela primeira vez no litoral paranaense através do "Projeto Recifes Artificiais Marinhos: uma Proposta de Conservação da Biodiversidade e Desenvolvimento da Pesca Artesanal através da Criação de um Parque Marinho na Costa do Estado do Paraná", esse processo ocorreu de 1998 a 2002, devido a experiência dos pesquisadores Dr. Frederico Pereira Brandini, que em 1996 coordenava o laboratório de fitoplânctons do CEM/UFPR e pelo Dr. Ariel Scheffer da Silva, com experiências em projetos de recifes artificiais no Canadá, durante seu mestrado na Simon Frase University. O projeto foi concretizado pela Organização Não Governamental (ONG) Instituto ECOPLAN e pelo Centro de Estudos do Mar (CEM) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), através do financiamento do Ministério da Ciência e Tecnologia mediante o Edital III do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) e do Fundo Paraná 12 meses, do governo estadual. Segundo Arten (2012), foram realizados doze lançamentos que incluíram 1.788 recifes de concreto (dos tipos quadriláteros, Reef Balls, Lindberg, cones, troncos de pirâmide), 63 unidades anti arrasto (UAA) e duas barcaças de grande porte. Esta ação foi realizada na orla próximo aos municípios de Pontal do Paraná e Matinhos.

Segundo Brandini (2003) o objetivo deste projeto era “redirecionar o uso dos recursos pesqueiros com a proteção do assoalho marinho contra a pesca de arrasto em áreas ilegais e através da criação de áreas de exclusão de pesca e de núcleos de biodiversidade de fundos rochosos”. Seguindo esse objetivo, após alguns anos do início da instalação dos primeiros recifes artificiais, surgiu o “Programa de Recuperação da Biodiversidade Marinha (REBIMAR)”, iniciando suas atividades em 2004.

2.6 PROGRAMA DE RECUPERAÇÃO DA BIODIVERSIDADE MARINHA – REBIMAR

O Programa de Recuperação da Biodiversidade Marinha (REBIMAR) é realizado pela Associação MarBrasil, com o patrocínio da Petrobras, por meio do Programa Petrobras

Socioambiental. O REBIMAR é uma ação coparticipativa entre o governo estadual e federal, universidades, colônias de pescadores, IBAMA, IAP, Marinha do Brasil e organizações do terceiro setor para tornar a pesca artesanal uma atividade sustentável no litoral paranaense (REBIMAR, 2014). A fundação da Associação MarBrasil em agosto de 2004 foi uma consequência da experiência e pioneirismo na construção e instalação de recifes artificiais em larga escala no Brasil, para conservação marinha. Entre 2004 e 2008 foi desenvolvido o licenciamento ambiental e nos anos seguintes foi operacionalizada a logística e o executado o monitoramento ambiental do Programa, que obteve uma nova licença no ano de 2012 (REBIMAR, 2014).

Os Recifes Artificiais Marinhos do Programa REBIMAR foram instalados em 10 pontos longitudinais à linha da costa (FIGURA 3). Foi lançado um total de 3.480 blocos de concretos, onde cada agrupamento continha entre 300 e 400 blocos. As operações de lançamento dos recifes começaram em 2010 e terminaram em dezembro de 2012. O objetivo geral do Programa REBIMAR é contribuir para a conservação e recuperação de espécies ameaçadas da biodiversidade marinha e seus habitats na extensão entre a plataforma rasa dos estados do Paraná e São Paulo, por meio de levantamento de informações sobre habitats e espécies marinhas ameaçadas, e proposição de áreas prioritárias para a conservação e de exclusão da pesca.

FIGURA 3 - LOCALIZAÇÃO DOS RECIFES ARTIFICIAIS MARINHOS DO PROGRAMA



FONTE: REBIMAR (Programa de Recuperação da Biodiversidade Marinha).

LEGENDA: Localização com dez pontos de distribuição dos blocos para a formação dos Recifes Artificiais, cada ponto foi alocado com 300 à 350 blocos de concreto.

2.7 MÉTODOS DE ESTUDO DA MICROBIOTA DO PARNAMAR DAS ILHA DOS CURRAIS E CONJUNTO RAM

2.7.1 ANÁLISES MOLECULARES DE COMUNIDADES MICROBIANAS

Estudos relacionados com o levantamento de diversidade (identificação e classificação) de microrganismos são de suma importância nos estudos da ecologia microbiana (RADEMAKER e SAVELKOUL, 2004). Pouco se sabe sobre a função das bactérias nos ecossistemas, pois grande partes destas não foram identificadas ou ainda não podem ser estudadas adequadamente, devido ao fato de não haver metodologia própria para o cultivo em laboratório, ou seja, menos de 1% dos microrganismos encontrados em ambientes aquáticos, sedimentos e solos são recuperados através de métodos de cultivos já desenvolvidos (AMANN et al. 1995).

Logo o desenvolvimento de novas técnicas se fez necessário. A microbiologia ambiental obteve grandes avanços nas técnicas moleculares, que proporcionaram a identificação de uma gama de microrganismos até então não identificados através de métodos tradicionais de cultivo existentes (PACE, 1997; ZINDER e SALYERS, 2005). Outros métodos moleculares baseados em ácido nucleicos e PCR (genotípicos) estão sendo utilizados de forma confiável, simples e de baixo custo para identificar e classificar os microrganismos. Segundo Rademaker et al. (2004), estes novos métodos desperdiçam menos tempo que as extensas análises fenotípicas, além de proporcionar resultados extremamente satisfatórios e mais reprodutíveis.

Com a evolução e o conhecimento das técnicas moleculares, foi possível proporcionar uma forma totalmente nova e diferente de compreender os organismos vivos. Este conjunto de técnicas e análises, construído ao longo das últimas décadas, levou a novas possibilidades de pesquisas, aumentando o conhecimento sobre a organização e a regulação genética dos organismos e propiciou avanços tecnológicos importantes em diferentes áreas (PACE, 1997). A utilização dessas novas técnicas é importante nos estudos de diversidade microbiana, principalmente, por permitir a análise de maneira independente do cultivo das bactérias presentes nas amostras, o que exclui todos os problemas e limitações devido à baixa culturabilidade das comunidades bacterianas, logo métodos baseados em abordagens metagenômicas são de grande importância para estudos relacionados com diversidade (ANDREOTE, 2007).

Para Smalla (2004), o desenvolvimento de técnicas de extração direta de DNA de amostras ambientais, DNA metagenômico, abre-se uma nova dimensão para estudos relacionados com comunidades microbianas, podendo oferecer informações da diversidade estrutural de amostras ambientais ou dos microrganismos introduzidos em diversos ambientes.

2.7.2 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 16S rDNA PELA REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE – PCR

Com o surgimento de novas técnicas moleculares, foi possível verificar um número crescente de novos microrganismos (WARD et al. 1990; DELONG, 2001), estudos revelam a existência de uma maior diversidade microbiana do que se esperava em praticamente todos os

ecossistemas existentes. Uma das técnicas básicas utilizadas para o sequenciamento do gene 16S rDNA é a Amplificação pela Reação em Cadeia Polimerase (PCR – *Polimerase Chain Reaction*), um dos métodos mais utilizados para estudos de microbiota, se beneficiando de fragmentos de DNA extraídos de amostras ambientais (PACE, 1997; SAMBO et al. 2017).

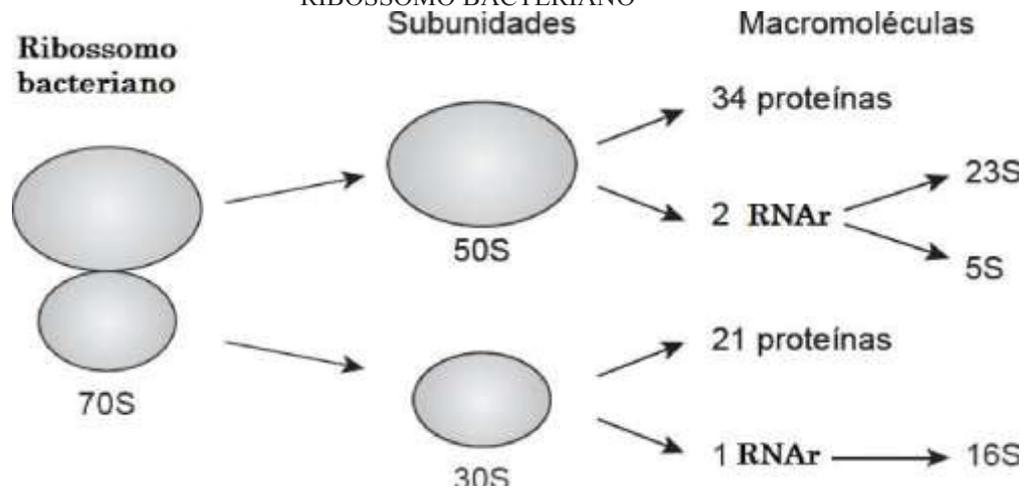
A PCR revolucionou as metodologias de *fingerprinting* (quer dizer impressão digital do DNA, isto é, a partir da análise do DNA de um organismo este pode ser identificado ao nível de espécie). Além de poder ser empregado em quaisquer materiais biológicos de indivíduos eucarióticos e procarióticos (PECCIA e HERNANDEZ, 2006).

Os *fingerprinting* baseados em PCR possuem diversas vantagens sobre outros métodos moleculares em amostras marinhas, pois proporciona simplicidade, necessitando de uma baixa demanda de instrumentos sofisticados. Com iniciadores pertinentes, todo o genoma pode ser analisado aleatória e uniformemente, elaborando *fingerprinting* robustos (WONG e LIN, 2001; SYAFINAZ et al. 2013). As técnicas baseadas em PCR aplicam iniciadores que são complementares ao DNA que se encontra no genoma microbiano, as sequências com 35-40 pb (pares de base) são denominadas de *Repetitive Extragenic Palindromic* (REP), são uma classe distinta de repetições abundantes importantes na regulação de certas funções bacterianas.

É possível observar que com as limitações impostas pelos métodos tradicionais, ocorreu uma grande evolução tecnológica na área da microbiologia molecular (VAN ELSAS et al. 1998), possibilitando o avanço dos conhecimentos sobre a variabilidade genética de diversos microrganismos, dentre as técnicas utilizadas destacam-se aquelas que utilizam o gene 16S do RNA ribossomal (16S rDNA). As técnicas moleculares quando utilizadas em análises microbianas, se baseiam na diferença da sequência dos genes ribossomais. Em procariotos, o gene alvo 16S rDNA é o mais utilizado, sendo apontado como uma das mais importantes para estudos de diversidade microbiana (LOUWS et al. 1999).

No início da década de 70, Carl Woese considerou o gene 16S rDNA como marcador filogenético molecular para procariotos (OLSEN e WOESE, 1993). A massa contida em um ribossomo bacteriano é de $2,5 \times 10^6$ Da (Dalton) e possui um coeficiente de sedimentação de 70S (Svedberg), a qual se desdobra em duas subunidades, a subunidade maior (50S) e a subunidade menor (30S). Segundo Rodicio e Mendonza (2004), a subunidade maior (50S) possui o 5S rRNA e o 23S rRNA juntamente com 31 diferentes proteínas, já a subunidade menor (30S) possui o 16S rRNA e mais 21 proteínas diferentes (FIGURA 4).

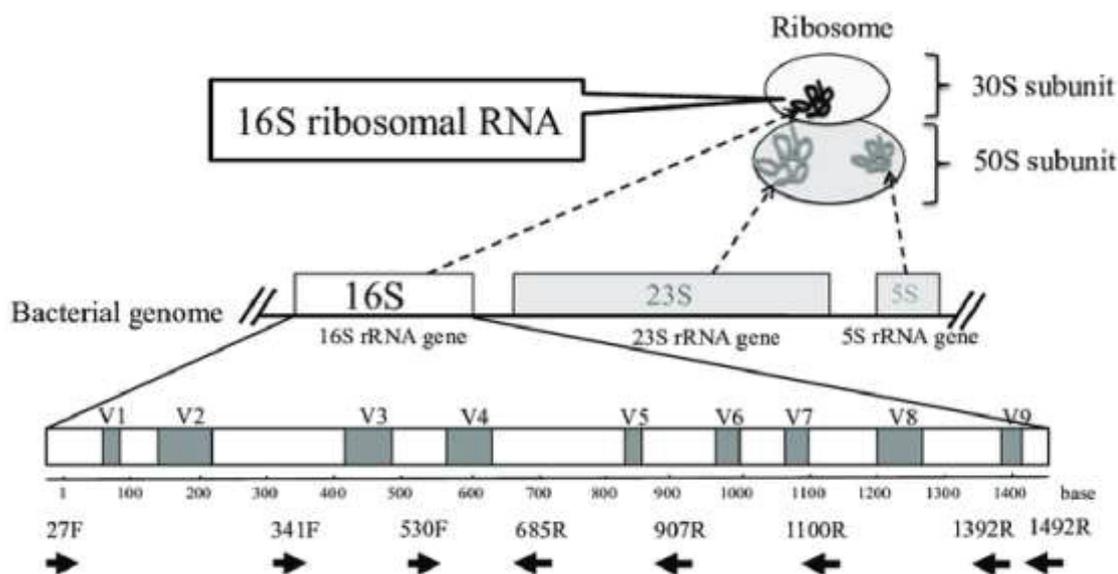
FIGURA 4- ESTRUTURA E INDICAÇÃO DAS SUBUNIDADES E MACROMOLÉCULAS DO RIBOSSOMO BACTERIANO



FONTE: Adaptado de Rodicio e Mendoza (2004).

O RNA ribossomal é um excelente marcador molecular para a reconstrução de grande parte das relações filogenéticas. Isso se deve ao fato da estrutura primária do 16S rRNA ser composta por regiões alternadas que vão de alta a baixa variabilidade (FRY et al., 1991). Região que possui sequência variável (9 regiões) contém informações de baixo nível filogenético, já regiões com sequências conservadas (10 regiões) contém informações de eventos evolutivos da espécie (FIGURA 5). Para a amplificação do gene 16S do RNA ribossomal, se utiliza as regiões conservadas e iniciadores com base nas sequências conservadas próximas às extremidades 5' e 3' do gene, produzindo fragmentos amplificados com aproximadamente 1500 pb, mesmo existindo informações filogenéticas o longo de todo o gene, as 500 primeiras bases nucleotídicas concentram as maiores variabilidades à extremidade 5' (PATEL et al. 2000; FUKUDA et al. 2016).

FIGURA 5- O ESQUEMA DO COMPLEXO RIBOSSÔMICO E DO GENE 16S rRNA



Fonte: Adaptado de Fukuda et al. (2016).

LEGENDA: As caixas brancas e cinza indicam regiões conservadas e regiões variáveis (V1-V9), respectivamente. As setas em negrito são mostradas posições aproximadas dos iniciadores universais na sequência do gene 16S rRNA de *Escherichia coli*.

A técnica molecular 16S rDNA foi utilizada em diversos ambientes, revelando um elevado número para a diversidade bacteriana e comparando a gama de espécies que deixam de ser identificadas quando se utiliza apenas métodos tradicionais de cultivo (HEAD et al. 1998). Segundo Sogin et al. (2006), a utilização de técnicas independentes de cultivo baseada em sequências do gene 16S rDNA foi possível descrever a comunidade bacteriana do oceano, estimando valores próximos de 21.000 sequências diferentes compondo esta comunidade.

As técnicas moleculares estão sendo usadas mundialmente para estudos relacionados com a diversidade bacteriana, onde são comparados em bibliotecas de genes 16S rDNA, os quais são obtidos de bactérias usando PCR com sequências de genes universais de bactérias ou sequências de genes universais de 16S rDNA (DELONG et al. 1993; FUHRMAN et al. 1993; GIOVANNONI e RAPPÉ, 2000).

2.7.3 METAGENÔMICA

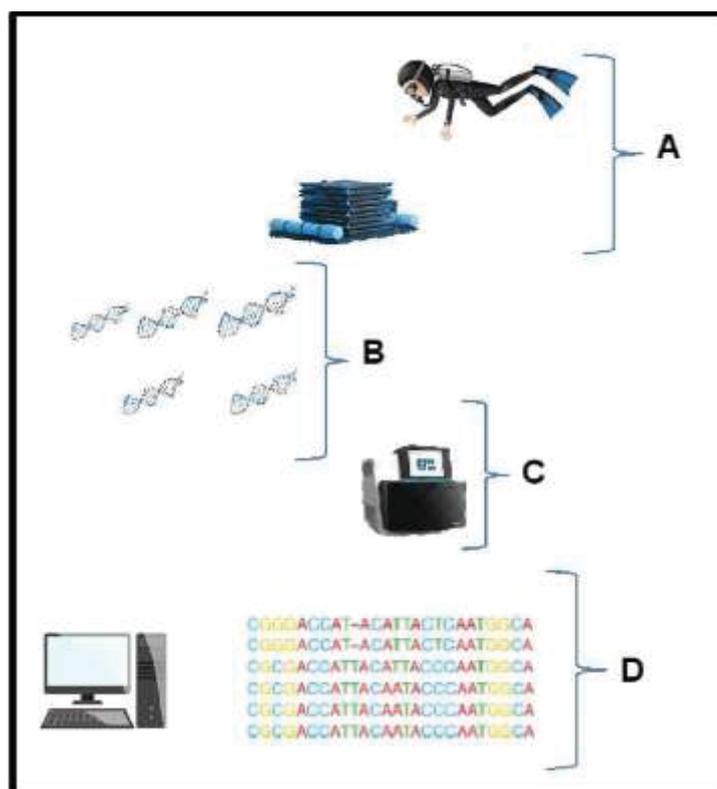
A metagenômica é o estudo de metagenomas, ou seja, do material genético retirado diretamente de amostras ambientais (ALMEIDA, 2009). Essa técnica molecular surgiu como um instrumento importante para a realização de análises das comunidades microbianas, independentemente da capacidade de serem cultivadas em laboratório (COLWELL, 2006).

Em 1998, o termo "metagenômico" foi aplicado pela primeira vez referindo-se à recuperação de DNA de bactérias cultiváveis e não cultiváveis, a partir de amostras de solo (HANDELSMAN et al. 1998). Através das análises de metagenômica é possível obter uma melhor compreensão da diversidade microbiana, e pesquisadores podem assim ampliar seus conhecimentos sobre a diversidade genética, a organização das populações e as funções ecológicas desses microrganismos no meio ambiente (SMITH e BRYANT, 1975; COUGHLAN et al. 2015; STALEY e SADOWSKY, 2018).

Através de estudos com genoma é possível descobrir novos genes e vias metabólicas, além de proporcionar a compreensão das relações existentes quanto aos ciclos biogeoquímicos e ainda possibilita a prospecção de enzimas com potencial biotecnológico (AIRA et al. 2016; JOVEL et al. 2016). Uma vez não havendo mais a restrição da identificação de microrganismos por meio de cultivo em laboratório, sendo este dispendioso e por vezes com resultados insuficientes (PACE et al. 1985), através da metagenômica foi possível sequenciar uma diversidade de ambientes, como solos, oceanos e o trato intestinal humano (GOLL et al. 2010). A metagenômica passou a ser utilizada para a área da saúde, após o Projeto Microbioma Humano em 2009, o qual pretende ainda mapear as comunidades microbianas associadas ao intestino, à boca, a pele e a vagina humana (PETERSON et al. 2009). E a utilização da metagenômica na área médica permanece crescendo gradativamente.

Com o melhoramento das técnicas de isolamento de material genético, estratégias de clonagem e técnicas de sequenciamento foi possível acessar e explorar microbiotas de ambientes extremos e inóspitos, como gêiseres ricos em elementos sulfatados, lagos hipersalinos e geleiras (SIMON e DANIEL, 2009). A metagenômica baseia-se na amostragem e coleta dos dados, seguido do isolamento do material genético, cópia e fragmentação do DNA. Após essa etapa, ocorre o sequenciamento dos fragmentos e o processamento das sequências dos fragmentos *in silico*, as sequências obtidas são montadas (FIGURA8). Ao fim dessas sequências os genomas podem ser adicionados em bancos de dados online, permitindo que outros pesquisadores possam ter conhecimento desses dados (STREIT e SCHMITZ, 2004).

FIGURA 6- PROCESSAMENTO DA METAGENÔMICA DO GENOMA DE UMA COMUNIDADE INTEIRA DE MICROORGANISMOS



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Método de processamento da metagenômica de amostras ambientais: (A) Amostras de microorganismos obtidos do ambiente. (B) Extração, cópia e fragmentação do DNA das amostras. (C) Sequenciamento dos fragmentos de DNA. (D) Montagem, no computador, das sequências dos fragmentos, obtendo-se as sequências das moléculas de DNA.

A utilização do método metagenômico, foi possível realizar pesquisas em diversos ambientes o que trouxe sequências de DNA nunca antes descritas (VENTER et al. 2004). Logo, espera-se que novos estudos sejam realizados para investigar o mundo microbiano e sua evolução em grande escala e que haja o desenvolvimento de novas ferramentas de bioinformática para facilitar a análise de todas as informações que possam vir a serem descobertas através do método metagenômico.

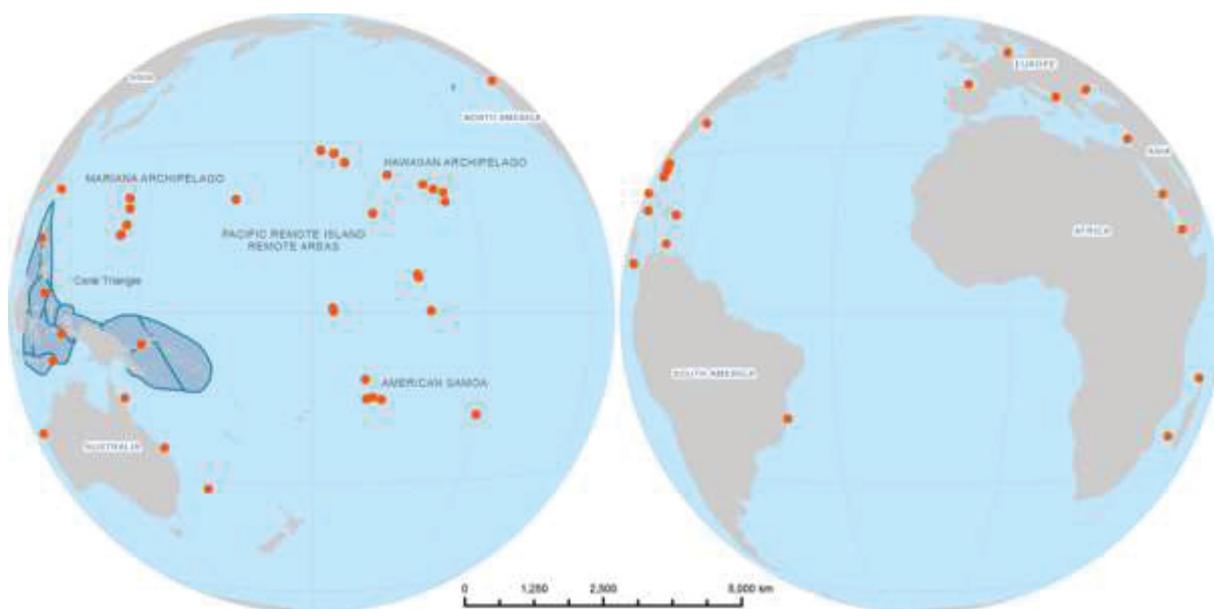
2.7.4 ARMS - AUTONOMOUS REEF MONITORING STRUCTURES

As estruturas de monitoramento autônomo de recifes (ARMS) são pequenos dispositivos de coleta à longo prazo projetados para imitar a complexidade estrutural de um recife de coral e atrair invertebrados colonizadores. Essas estruturas servem como coletores passivos utilizados para amostrar a criptofauna marinha pouco estudada. A principal inovação do ARMS é a capacidade de amostrar comunidades marinhas precisamente na mesma área e

da mesma maneira, fornecendo uma medida de biodiversidade padronizada e quantificável e ainda sem danificar as estruturas de recifes os quais levam diversos anos para alcançar seu ápice em desenvolvimento e diversidade. Esta repetibilidade da amostragem é um grande trunfo para responder a várias questões de pesquisa: monitoramento da diversidade ao longo do tempo, exploração dos efeitos das áreas marinhas protegidas na recuperação da biodiversidade ou quantificação dos impactos humanos e atualmente diversidade microbiana (CENSUS OF MARINE LIFE, 2020).

A elaboração do ARMS foi uma iniciativa internacional da *Smithsonian Institution*, a qual se encontra no Museu Nacional de História Natural em Washington, criando assim o Programa Global ARMS, que centraliza e disponibiliza informações e documentação sobre o ARMS e protocolos de processamento padronizados. Buscando aumentar a compreensão global da biodiversidade taxonomicamente diversificada dos ecossistemas de recifes de coral, aumentar o conhecimento taxonômico tropical, aumentar o acesso e troca de dados de recifes de coral dispersos em todo o mundo e desenvolver novos protocolos universais que padronizariam uma abordagem ao estudo da biodiversidade marinha. O programa possui ainda uma curadoria de um banco de dados de implantações de ARMS em todo o mundo que podem ser pesquisadas livremente. Desde sua criação, o projeto ARMS se expandiu em escala global (FIGURA 7) e o ARMS foi adotado como uma ferramenta-chave de avaliação da biodiversidade pelo Programa Nacional de Monitoramento de Recifes de Coral da NOAA (NCRMP) e pelas estações de monitoramento climático do Programa de Acidificação do Oceano no Pacífico (CENSUS OF MARINE LIFE, 2020).

FIGURA 7: EXPANSÃO EM ESCALA GLOBAL DO PROJETO ARMS.



FONTE: CENSUS OF MARINE LIFE, 2020.
 LEGENDA: Locais de implantações ARMS atuais.

Logo, o conhecimento dos organismos menos conhecidos e da diversidade geral do recife é de suma importância para responder com eficácia aos fatores estressantes nos recifes de coral e habitats complexos. Na presença de ameaças globais aos recifes, tais como a mudança climática e acidificação, há a preocupação com o fato de que grande parte da biodiversidade complexa e residente de recifes e/ou ambientes recifais possam ser perdidas antes mesmo de serem documentadas.

3 METODOLOGIA

3.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL

O litoral paranaense inicia-se a partir da Vila do Ararapira ($25^{\circ}12'44''$ S; $48^{\circ}01'15''$ W) estendendo-se até a barra do Rio Saí-Guaçu ($25^{\circ}58'38''$ S; $48^{\circ}35'26''$ W), totalizando 105 km de comprimento e uma grande diversidade de ambientes costeiros (BORZONE, 1994). Segundo Merlin (2016), essa região é caracterizada por possuir uma grande faixa da plataforma continental, que em sua maior parte é coberta de areias, lamas e argilas. A existência de três formações rochosas no litoral paranaense próximas umas das outras chama atenção de turistas, pescadores, mergulhadores e pesquisadores de biodiversidade marinha, estas se chamam Ilha da Figueira, Ilha de Currais e Ilha de Itacolomis (BIGARELLA, 1946).

O arquipélago das Ilhas de Currais está localizado no litoral paranaense a aproximadamente seis milhas náuticas do balneário de Praia de Leste, no município de Pontal do Paraná. É constituído por três ilhas, que apresentam rochas cristalinas ígneas e metamórficas, do embasamento cristalino de idade pré-cambriana (SANTOS, 2013). Este arquipélago possui uma incontestável importância ecológica, devido ao fato de ser um dos poucos afloramentos naturais no estado que oferece a disponibilidade de habitats apropriados ao desenvolvimento de comunidades de características recifais (PINHEIRO, 2002).

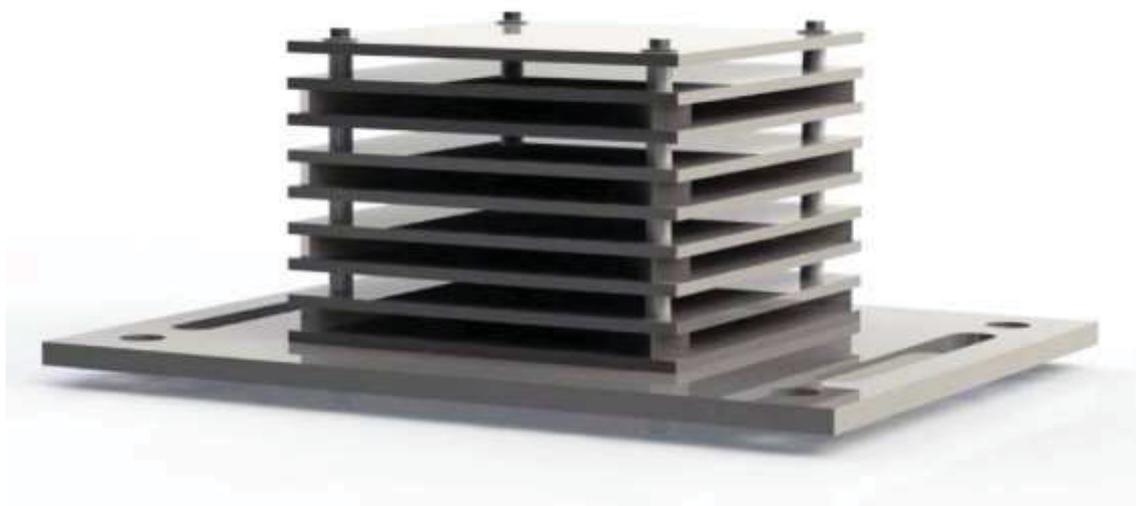
Por possuir todas essas características de diversidade e ambiente adverso, em 21 de maio de 2013 foram sancionadas a Lei 12.829 que criava o “PARNAMAR (Parque Nacional Marinho) das Ilhas de Currais”. Este é o primeiro da categoria no Estado do Paraná e o terceiro do país (os outros dois são Abrolhos e Fernando de Noronha, ambos localizados no nordeste brasileiro) (BUMBEER et al. 2016). O PARNAMAR das Ilhas dos Currais possui uma área de aproximadamente 1.400 hectares, que inclui três ilhas e a porção marinha adjacente com quatro grupos de Recifes Artificiais Marinhos situados nas suas proximidades (ICMBIO, 2016). O PARNAMAR das Ilhas de Currais está situado em uma área de grande importância para a economia e ecologia, devido ao fato de estar na rota de um grande porto comercial com tráfego internacional de navios porta-contêineres e petroleiros e por estar localizado nas proximidades do extenso sistema de estuários com manguezais (BUMBEER et al. 2016).

3.1.1 UTILIZAÇÃO DE AUTONOMOUS REEF MONITORING STRUCTURES (ARMS) PARA OBTENÇÃO DE AMOSTRAS AMBIENTAIS MARINHAS DE MICRORGANISMOS

Os ARMS são dispositivos coletores de longo prazo que imitam em certa medida a complexidade estrutural dos recifes. A principal inovação do método ARMS é que a biodiversidade é amostrada viva em sua totalidade para o processamento posterior em laboratório. Assim, o uso do ARMS é um método sistemático, consistente e comparável para monitorar a comunidade de críptica marinha – aquela normalmente não amostrada por métodos tradicionais ao longo do tempo. Cada ARMS é composto de nove placas de PVC (23x23 cm, com 1 cm de espessura) parafusados em uma base (35x45 cm). Adesivos vinílicos na cor cinza com acabamento acetinado foram colocados em todas as faces das placas, padronizando a cor e textura das superfícies (FIGURA 9). Estas placas ficam afastadas cerca

de 1,5 cm entre si por meio de espaçadores e são arranjadas em camadas abertas e obstruídas alternadas, proporcionando diferentes micro-habitat para colonização. O ARMS foi fixado ao bloco de recife artificial por meio de cabos e presilhas.

FIGURA 8- ARMS (AUTONOMOUS REEF MONITORING STRUCTURES)



FONTE: NOAA (2016).

3.1.2 PERÍODOS DE AMOSTRAGEM E PONTO DE COLETA DE AMOSTRA MICROBIANA MARINHA NO CONJUNTO DE RECIFES ARTIFICIAIS MARINHOS (RAM)

Em novembro de 2017, ocorreu a implantação de uma unidade ARMS (Autonomous Reef Monitoring Structures) no conjunto de Recifes Artificiais Marinhos (RAM), esta estrutura foi instalada por meio de mergulho autônomo, a qual permaneceu no ponto denominado “RAM” (Lat. 25° 45' 8.64"S, Long. 48° 20' 14.88"W), a dezoito metros de profundidade, até o dia 09 de fevereiro de 2019, totalizando 15 (quinze) meses de submersão. O ponto “RAM” está a aproximadamente 3,92 km de distância do arquipélago das Ilhas dos Currais, situando-se dentro dos limites do PARNAMAR das Ilhas dos Currais (FIGURA 7).

FIGURA 9- LOCALIZAÇÃO DO “PONTO DE COLETA RAM” DENTRO DO PARNAMAR DAS ILHAS DOS CURRAIS



FONTE: Elaborado pela autora, com participação de Gustavo Elster (2020).

LEGENDA: Localização do Ponto de coleta RAM ▲

3.1.3 PERÍODOS DE AMOSTRAGEM E PONTO DE COLETA DE AMOSTRA MICROBIANA MARINHA NO INTERIOR DO PARNAMAR DAS ILHAS DOS CURRAIS

O arquipélago das Ilhas dos Currais está localizado no litoral paranaense a aproximadamente seis milhas náuticas do Balneário de Praia de Leste, no município de Pontal do Paraná. O PARNAMAR das Ilhas dos Currais possui uma área de aproximadamente 1.400 hectares, que inclui três ilhas e a porção marinha adjacente com quatro grupos de Recifes Artificiais Marinhos situados nas suas proximidades (ICMBIO, 2016).

Em junho de 2019, foi realizada a retirada de três triplicatas de ARMS no ponto denominado "Currais" (FIGURA 8). Estes materiais de coleta passiva estavam submersos entre 7 a 9 metros de profundidade, permaneceram neste ponto por 14 meses. O ponto de coleta Currais está a aproximadamente 3,92 km de distância do conjunto de Recifes Artificiais instalados nas proximidades das Ilhas de Currais.

FIGURA 10: LOCALIZAÇÃO DO “PONTO DE COLETA CURRAIS” NO INTERIOR DO PARNAMAR DAS ILHAS DOS CURRAIS



FONTE: Elaborado pela autora, com participação de Gustavo Elster (2020).

LEGENDA: Localização do Ponto de coleta Currais ▲

3.2 MÉTODOS DE COLETA

3.2.1 PROCESSAMENTO DO ARMS PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS MICROBIANAS, DOS RECIFES ARTIFICIAIS DO PARNAMAR DAS ILHAS DOS CURRAIS

Os ARMS foram instalados, por meio de um mergulho autônomo realizado pela equipe do Programa REBIMAR, localizado no PARNAMAR das Ilhas dos Currais. Foram fixados 3 exemplares dos dispositivos coletores, por um período de 12 meses (1 ano), sendo vistoriado a cada 4 meses para que os mesmos não fossem arrastados pela força das correntes marítimas e/ou quaisquer outras avarias ao material de coleta e ainda acompanhar o processo de sucessão ecológica nesses dispositivos (FIGURA 10).

FIGURA 11: - PREPARAÇÃO PARA INSTALAÇÃO DOS ARMS JUNTO AO RAM, NO PARNAMAR DAS ILHAS DOS CURRAIS.



LEGENDA: **A:** Preparação dos ARMS e equipamento para o mergulho; **B:** Preparação dos ARMS para submersão; **C e D:** Mergulhadores descendo com o ARMS; **E:** Mergulhador/Pesquisador fixando ARMS junto ao leito marinho; **F:** ARMS instalado junto ao solo marinho.

Para retirar o ARMS, a unidade é encapsulada ainda no leito marinho em uma caixa plástica, para prevenir a fuga de quaisquer organismos vágéis, e é mantida em recipiente esterilizado, com água filtrada (40mc) e aerada do local de coleta até o processamento em terra. As unidades são desmontadas placa por placa dentro do recipiente e as duas superfícies de cada placa são fotografadas para as análises de cobertura da biota sésil pelo grupo de pesquisas de macrorganismos (FIGURA 11). Ressalta-se, que em todo o manuseio do ARMS e suas respectivas placas, após desmonte são realizadas utilizando equipamentos estéreis prevenindo assim contaminação do material que será extraído material genético.

FIGUR 12: MÉTODO DE COLETA UTILIZANDO ARMS.



LEGENDA: **A:** ARMS armazenado em caixa plástica, a qual continha água do local de coleta para manter a macro e microfauna; **B:** Pesquisadores iniciando o processo de desmontagem dos ARMS, placa a placa; **C:** ARMS sendo desmontado placa a placa, para análise da macrofauna; **D:** Equipe de macrofauna analisando placa a placa.

Estes organismos são também processados para análises taxonômicas e genéticas. Toda a água do recipiente juntamente com a fauna vágil presente é então filtrada em peneiras sequenciais com malhas de 2 mm, 50 micras e 100 micras para obtenção de três frações de tamanhos para posterior análises taxonômicas e genéticas da macrofauna vágil. Todas as placas são então raspadas usando espátulas em uma bandeja esterilizada. Todo o material raspado é então colocado em um triturador/homogeneizador por ao menos um minuto, com água do mar se for necessário. O material homogeneizado foi filtrado em malha de 40 micras com adição de água do mar. Posteriormente a trituração, a amostra foi acondicionada em tubos Falcon contendo 10g do material sólido retido nas malhas feita triplicatas do material, sendo alocados em caixas térmicas com gelo e levados ao laboratório de microbiologia para extração do material genético (FIGURA 12).

FIGURA 13: PREPARAÇÃO DA AMOSTRA MARINHA PARA ANÁLISES 16S RDNA.



LEGENDA: **A:** Placa sendo raspada para a retirada de toda sua biomassa; **B:** Biomassa sendo acondicionada em processador/liquidificador para processo de trituração; **C:** Biomassa triturada sendo filtrada em malha 40 micras; **D:** Biomassa triturada e drenada sendo armazenada em tubos Falcon para posterior análise.

3.2.2 EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO (ARMS)

A extração do DNA total das amostras marinhas foi realizada utilizando-se o kit "*Power Soil DNA Kit*" da MOBIO Laboratories, Inc. seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, a qualidade do material genético foi determinada por eletroforese em gel de agarose e a quantidade foi determinada pelo kit dsDNA Qubit HS (Thermo). Para o protocolo da PCR utilizado para reação de amplificação, código de barras (sequências curtas de DNA, amplificadas por PCR e sequenciadas, que evoluem em taxas que permitem a diferenciação entre espécies) e o sequenciamento Illumina foram executado conforme descrito (CAPOROSO et al., 2012). Resumidamente, o gene 16S foi amplificado por PCR em reações de 10 µl usando: 20 ng de DNA molde; Iniciador 515F de 1 µM; 1 µM iniciador 806R (que inclui o código de barras para cada amostra); e 5 µl KlenTaq DV ReadyMix (Sigma-Aldrich). Os ciclos de PCR foram 94°C 3 min., 18x (94°C 45s; 50°C 30s; 68°C 1 min.), 72°C 10 min. Foi realizadas três réplicas de PCR para a amostra total proveniente do material sólido. Os amplicons foram quantificados por qPCR com o kit de quantificação Kapa NGS (Roche) e a qualidade avaliada usando um Bioanalyzer 2100 (Agilent), e as quantidades equimolares das réplicas técnicas foram misturadas. Duas reações de sequenciamento de replicação técnica

foram realizadas para cada amostra usando uma plataforma MiSeq e MiSeq 500v2 Reagent Kit (Illumina) em pares de leituras (2x de 250 pb) no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR (*Campus* Centro Politécnico – Curitiba), na responsabilidade do técnico Valter Antonio de Baura.

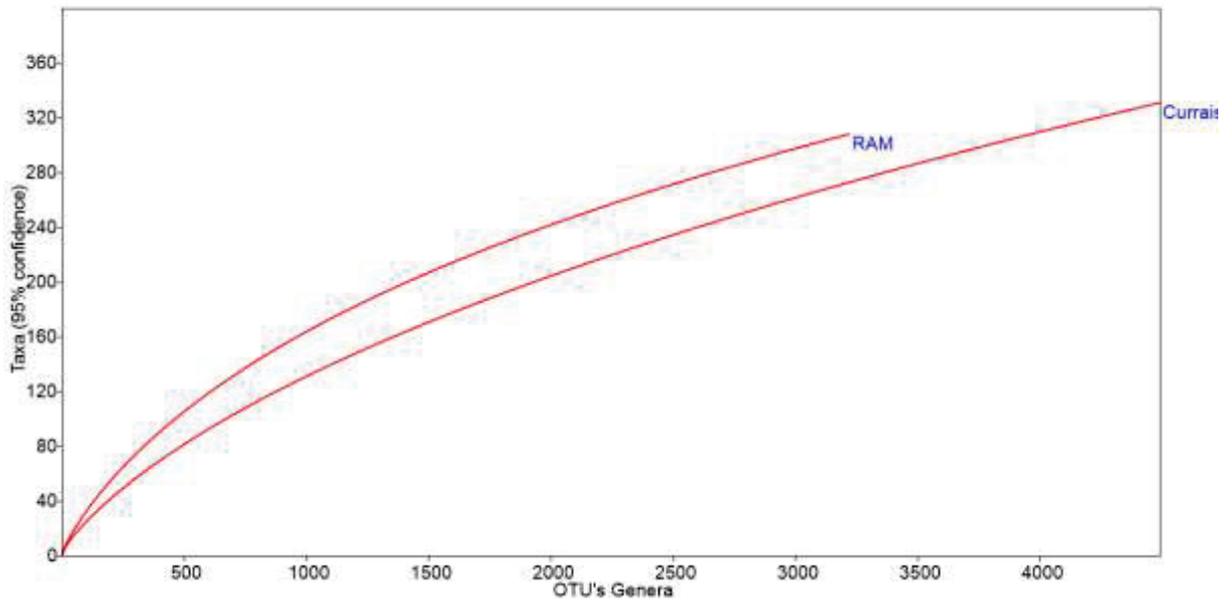
As sequências foram analisadas e editadas usando a ferramenta FASTQC. As sequências diretas das duas réplicas técnicas de sequenciamento de DNA foram unidas e processadas usando QUIIME 1.9 (KUCZYNSKI et al., 2012). As leituras foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e taxonomia atribuída usando o 16S SILVA 132 (QUAST et al., 2013). Sequências mitocondriais e cloroplásticas foram removidas. As análises estatísticas foram realizadas usando amostras normalizadas pelo número de leituras. As análises quantitativas e estatísticas foram realizadas usando o Programa *Past versão 4.03*.

4 RESULTADOS

Um total de 179.151 leituras com 250 pb foram obtidas pelo sequenciamento da amostra marinha no ponto Currais. Já no ponto RAM foi possível obter um total de 206.493 leituras com 250 pb.

A curva de rarefação foi realizada para todos níveis de classificação taxonômica, porém somente a curva do nível de gênero será apresentada e discutida neste trabalho (FIGURA 13), devido ao fato de a mesma ter mostrado dados relevantes para a continuação da pesquisa nesta área.

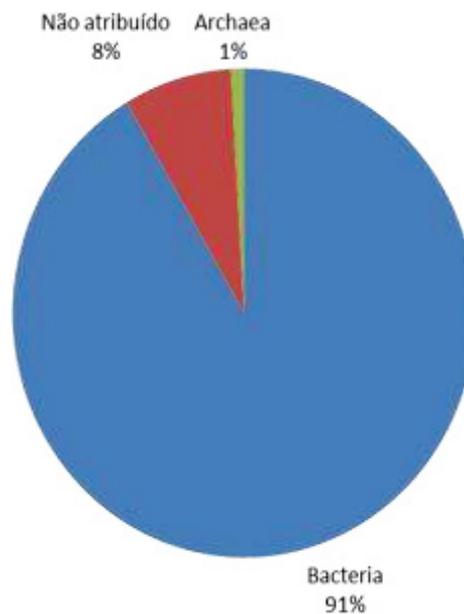
FIGURA 14: ANÁLISE DE RAREFAÇÃO DA AMOSTRA TOTAL DO PONTO DE COLETA CURRAIS E RAM, NO PARNAMAR DAS ILHAS DOS CURRAIS.



LEGENDA: Análises de rarefação construídas a partir do material genético de amostras marinhas, com nível de similaridade taxonômica de 97%. As análises são baseadas em sequências do gene 16S rRNA. O intervalo de confiança foi de 95%.

As OTUs agrupadas com 97% de identidade foram classificadas taxonomicamente pelo Banco de dados SILVA 132. A amostra do ponto RAM, revelou que 91% da amostra total pertencente ao Reino *Bacteria*, 8% não foi identificado sendo considerado como "Não atribuído" e apenas 1% pertencente ao Reino *Archaea* (FIGURA 14). Já no ponto de coleta Currais ocorreu a prevalência de 100% das amostras serem pertencentes ao Reino *Bacteria*.

FIGURA 15: FREQUÊNCIA RELATIVA EM NÍVEL DE DOMÍNIO DOS ORGANISMOS PROCARIOTOS IDENTIFICADOS NO PONTO DE COLETA RAM



LEGENDA: Distribuição da presença de membros dos domínios *Bacteria* e *Archaea*, através do gene 16S rDNA na amostra marinha encontrada no Ponto RAM.

Foram identificados 36 diferentes tipos de filos, 74 classes e 309 gêneros na amostra total do ponto de coleta RAM. Já no ponto de coleta Currais, foi obtido 34 diferentes filos, 77 classes e 33 gêneros (TABELA 1), representando os 50 principais de cada nível taxonômico estudado.

TABELA 1: OS DIFERENTES FILOS, CLASSES E GÊNEROS ENCONTRADOS NA AMOSTRA TOTAL DOS PONTOS RAM E CURRAIS

FILOS	RAM	CURRAIS	FILOS	RAM	CURRAIS
Proteobacteria	1632	1518	Hydrogenedentes	5	5
Bacteroidetes	356	325	Kiritimatiellaeota	6	5
Planctomycetes	342	312	Calditrichaeota	3	3
Acidobacteria	128	114	Nitrospirae	5	3
Verrucomicrobia	96	89	Spirochaetes	4	3
Chloroflexi	93	88	Armatimonadetes	2	2
Actinobacteria	93	86	Fusobacteria	0	2
Não atribuído	250	70	Lentisphaerae	0	2
Firmicutes	30	28	Nitrospinae	2	2
Gemmatimonadetes	23	22	Schekmanbacteria	2	2
Chlamydiae	14	18	BRC1	1	1
Latescibacteria	16	13	Elusimicrobia	0*	1
Patescibacteria	12	13	Synergistetes	1	1
Dadabacteria	10	11	WPS-2	1	1
Deinococcus-Thermus	9	10	WS2	1	1
Tenericutes	9	9	Altiarchaeota	1	0
Dependentiae	8	7	Crenarchaeota	4	0
Entotheonellaeota	6	5	Cyanobacteria	36	0
Epsilonbacteraeota	5	5	Euryarchaeota	1	0
			Thaumarchaeota	24	0

CLASSES	RAM	CURRAIS	CLASSES	RAM	CURRAIS
028H05-P-BN-P5	0	1	B-11 terrestrialGroup	8	7
Gammaproteobacteria	696	719	Bacilli	7	7
Alphaproteobacteria	571	438	Ignavibacteria	6	7

Deltaproteobacteria	365	343	K-96	7	7
Bacteroidia	336	305	Subgroup 9	14	7
Planctomycetacia	230	198	Kiritimatiellae	6	6
Não atribuído	254	93	Subgroup 26	6	6
Verrucomicrobiae	96	89	uncultured bacterium	17	6
Acidimicrobia	78	73	AT-s3-28	6	5
Anaerolineae	69	72	Campylobacteria	5	5
OM190	59	57	Entotheonellia	6	5
Thermoanaerobaculia	52	48	Hydrogenedentia	5	5
Phycisphaerae	43	43	Pla3 lineage	2	5
Clostridia	19	19	Subgroup 17	6	5
Subgroup 22	18	19	Subgroup 6	6	5
Chlamydiae	14	18	Parcubacteria	2	4
Rhodothermia	14	13	Acidobacteriia	3	3
Dadabacteriia	10	11	Actinobacteria	5	3
Blastocatellia (Subgroup 4)	11	10	Calditrichia	3	3
Deinococci	9	10	Dehalococcoidia	14	3
PAUC43fMarine benthicGroup	12	10	Gemmatimonadetes	3	3
Babeliae	8	9	Nitrospira	5	3
Gracilibacteria	10	9	Subgroup 21	3	3
Mollicutes	9	9	uncultured organismo	1	3
Thermoleophilia	10	9	Aminicenantia	1	2

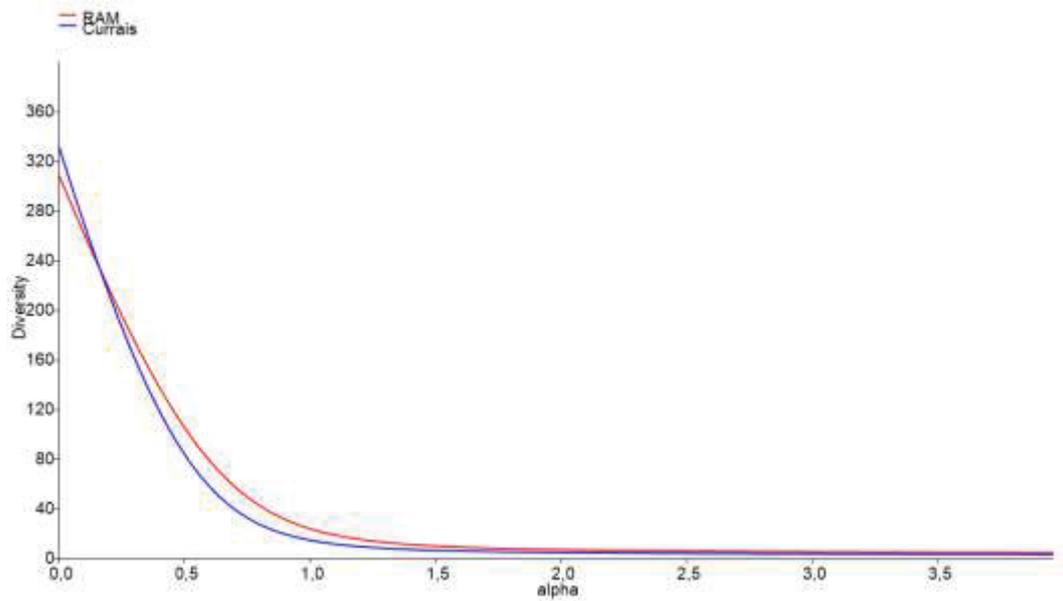
GÊNEROS	RAM	CURRAIS	GÊNEROS	RAM	CURRAIS
Não atribuído	905	2605	Pirellula	13	10
uncultured	553	448	Truepera	4	10
uncultured bacterium	525	278	uncultured marine bacterium	5	10
Ambiguoustaxa	136	129	Halioglobus	24	9
Subgroup 10	0	45	uncultured delta proteobacterium	8	9
Coxiella	39	44	Ascidiimonas	12	8
Blastopirellula	55	42	uncultured deep-sea bacterium	0	8
Rhodopirellula	34	35	Anderseniella	8	7
uncultured organism	17	35	Candidatus Tenderia	8	7
Woeseia	49	31	Peredibacter	6	7

Sva0996 marineGroup	25	22	Planctomicrobium	7	7
Pir4 lineage	32	21	Ruegeria	8	7
Haliangium	21	17	SM1A02	7	7
uncultured proteobacterium	1	16	uncultured actinobacterium	0	7
Bdellovibrio	17	15	Bythopirellula	4	6
Aquibacter	17	13	Endozoicomonas	8	6
Persicirhabdus	8	13	Erythrobacter	14	6
unculturedGamma proteobacterium	0	13	Muricauda	7	6
Altererythrobacter	10	11	Pseudahrensia	12	6
Filomicrobium	10	11	Rubritalea	8	6
uncultured planctomycete	11	11	uncultured Planctomyces sp.	0	6
B-7 clade	10	10	Urania-1B-19 marine sedimentGroup	6	6
Blastocatella	10	10	Actibacter	1	5
OM60(NOR5) clade	20	10	Candidatus Amoebophilus	5	5
Parahaliaea	6	10	Candidatus Amoebophilus	5	5

0*: Indivíduo ausente na amostragem.

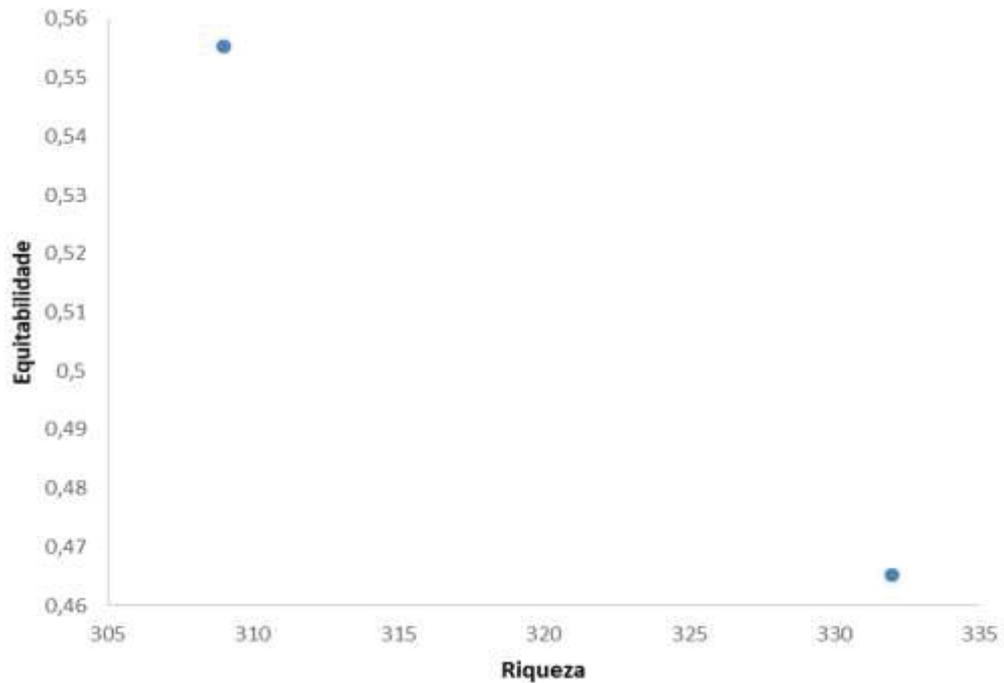
Foi realizada a análise do perfil de diversidade dos pontos estudados no PARNAMAR das Ilhas dos Currais, através do nível taxonômico de Gênero, o qual promoveu assim informações sobre a riqueza e a equitabilidade das espécies nesta área de estudo (FIGURA 15).

FIGURA 16: PERFIL DE DIVERSIDADE PARA ÁREAS AMOSTRADAS EM DOIS PONTOS NO PARQUE NACIONAL MARINHO DAS ILHAS DOS CURRAIS, PARANÁ, BRASIL



Foi possível realizar a análise de dispersão simples, para averiguar se houve relação ou associação entre as amostras do presente estudo (FIGURA 16).

FIGURA 17: DISPERSÃO RIQUEZA VS EQUITABILIDADE, DOS GÊNEROS DA MICROBIOTA ENCONTRADOS NO PARNAMAR DAS ILHAS DOS CURRAIS



5 DISCUSSÃO

A riqueza entre os pontos RAM e Currais, foram comparados utilizando-se curva de rarefação, uma vez que houve uma diferença de menos 454 indivíduos entre o ponto RAM e Currais. A curva de rarefação foi mais íngreme para o ponto Currais, demonstrando que a mesma possui uma distribuição de indivíduos mais uniforme entre as espécies, ou seja, a mesma atingiu uma aparente estabilização da ascendência indicando assim, que o esforço amostral foi suficiente para esse ponto (MAGURRAN, 2005; ROESCH et al. 2007; RAOULT, 2009). Enquanto que no ponto RAM é necessário que haja maiores estudos, até o momento em que essa permaneça estável, devido ao fato de que o número de espécies registrado foi expressivo, entretanto a curva de rarefação não atingiu a assíntota, mostrando que ainda existe a tendência de aumento da riqueza de espécies no ponto RAM.

O presente estudo apresentou resultados para os domínios *Archaea* e *Bacteria*, com uma representatividade de 1% e 91% respectivamente aos presentes domínios no ponto RAM. Demonstrando a necessidade e importância de estudos em ambientes rochosos, destacando ambientes diferenciados como os recifes artificiais marinhos presente no litoral paranaense. Estudos relatam que as archaeas eram características de ambientes extremos como: temperaturas elevadas (Fiala e Stetter, 1986; Blöchl et al., 1997); extremos de pH (Darland et al., 1970); ambientes anóxicos (Zeikus, 1977; Balch et al., 1979) e com alta concentração de salinidade (Brisou et al., 1974). Por mais de uma década as archaeas eram consideradas organismos procariotos exclusivamente encontrados em ambientes extremófilos. Contudo, DeLong et al. (1993), refutaram a ideia de que as archaeas eram organismos restritos a ambientes extremos, através de sondas e ensaios de PCR específicos para o domínio *Archaea*, o qual encontrou sequências de DNA afiliadas ao domínio em comunidades planctônicas marinhas de ambientes com temperaturas medianas, corroborando com o resultado encontrado neste estudo. Porém, 8% da amostra total não foi atribuída a nenhum domínio específico neste ponto, podendo ser artefatos da amostragem. Quanto ao ponto Currais foi observado que 100% da amostra total, pertença ao domínio *Bacteria*, corroborando com o estudo de Almeida (2009) que ao analisar a diversidade de bactérias em amostras de água do mar no Canal de São Sebastião classificou sua amostra total como pertencente ao domínio *Bacteria*.

Pode-se observar, que as amostras do ponto RAM e Currais apresentaram o filo *Proteobacteria* como o de maior participação com 60% e 64% de ocorrência respectivamente. É um grupo de morfologia e metabolismo muito diversificado (MARGULIS e SCHAWARTZ, 1998), compondo o grupo de microrganismos autotróficos e heterotróficos, aeróbios e anaeróbios. Este é um filo composto por bactérias gram-negativas, considerado o

maior e mais versátil filo do domínio *Bacteria* (KERSTERS et al., 2006). Possui diversos tipos de bactérias que incluem fototróficas, quimiolitotróficas e heterotróficas, além de vários táxons que desempenham papéis-chave nos ciclos de carbono, enxofre e nitrogênio em nosso planeta, possuindo mais de 460 gêneros e aproximadamente 1600 espécies identificadas até 2002. Segundo Garrity et al. (2005), no final de 2003 este grupo já possuía 2.279 espécies identificadas, separadas em 512 gêneros. Atualmente, com base em informações de sequência 16S rRNA, essas espécies foram distribuídas em cinco linhagens filogenéticas dentro do filo *Proteobacteria*: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria* (KERSTERS et al., 2006).

Além do filo *Proteobacteria*, os outros filios que apareceram com maiores frequências em ambas as amostras são: *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* e *Acidobacteria*, o que está de acordo com outros estudos realizados com microbiota marinha (ALMEIDA, 2009; FERREIRA, 2014; MEDEIROS, 2016; ARAUJO, 2018).

O filo *Bacteroidetes* realiza diversas funções de grande importância ecológica, como aquelas associadas ao ciclo do carbono, a degradação de matéria orgânica particulada e dissolvida (especialmente sob a forma de polissacarídeos e proteínas). Este filo pode representar entre 6% e 30% das bactérias encontradas nos oceanos, o que está dentro do encontrado no presente trabalho (COTTRELL e KIRCHMAN, 2000b; EILERS et al., 2000).

Já o filo *Planctomycetes*, é um filo de bactérias aquáticas encontradas em água doce, salobra e marinha (GLOCKNER, 2003). Este filo possui estruturas internas mais complexas que as que existem nos procariontes típicos, seu sequenciamento mostra que o filo possui uma relação distante com as demais bactérias e possui grande importância como degradador de polímeros carbônicos sulfatados (BOURNE et al. 2016). Os microrganismos deste filo podem representar um ancestral comum dos atuais metagênicos do domínio *Archaea* e metanotróficos do filo *Proteobacteria*, atribuindo aos *Planctomycetes* um papel de grande importância nas transformações do ciclo do metano (CHISTOSERDOVA et al., 2004).

O filo *Acidobacteria* é encontrado com maior frequência em ambientes com pH ácido (SAIT et al., 2006), organismos desse filo possuem potencial de resistência à dessecação e ainda estão relacionados na produção de biofilmes de proteção (WARD et al., 2009). Apesar de sua grande abundância e diversidade, ainda há poucas informações sobre as atividades reais e ecologia dos membros deste filo, uma lacuna que pode ser atribuída em grande parte às dificuldades de cultivo da maioria das acidobactérias e sua baixa cobertura em coleções de cultura bacteriana (BRYANT et al., 2007 ; LEE et al., 2008 ;da ROCHA et al., 2009 ;

EICHORST et al., 2011 ; NAVARRETE et al., 2013). A identificação desse grupo ressalta a inclusão de novas estratégias de cultivo e enriquecimento, caracterização genômica e análises de DNA metagenômico de amostras ambientais, com essas abordagens teremos uma melhor compreensão de seu papel no meio ambiente, trazendo consigo alguns insights iniciais sobre a ecologia deste importante filo.

As classes bacterianas mais prevalentes foram : *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Bacteroidia*, classes já esperado devido a prevalência do filo *Proteobacteria* que está dividido em cinco linhagens (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria*) das quais três foram identificadas através do gene 16S rRNA na amostra total em ambos os pontos de coleta.

A Classe *Gammaproteobacteria* foi a mais abundante sendo representada por 31% da amostra total, a qual corrobora com Queiroz (2015), obtendo 16% da sua amostra com essa classe ficando entre os primeiros lugares como a mais abundante em sedimento marinho profundo, na região conhecida como Platô de São Paulo, localizado cerca de 260 km da costa dos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro. Queiroz (2015) afirma, que mais estudos devem ser realizados para compreender a composição geoquímica dos sedimentos e do óleo encontrados em seu estudo, para assim explicar como esse fator influencia a estrutura das comunidades microbianas, ressalta-se que este foi o primeiro trabalho de ecologia microbiana desenvolvido em sedimentos de mar profundo do sudoeste do oceano Atlântico Sul, contribuindo para o conhecimento dos padrões de diversidade das comunidades microbianas em ambientes de sedimento influenciados por exsudação de asfalto.

Já a classe *Alphaproteobacteria* foi a segunda mais abundante neste estudo, a mesma pode ser encontrada normalmente em sedimento de mar profundo, porém em pequenas proporções (JAMIESON et al. 2013; ZINGER et al. 2011). Segundo Mason et al. (2014), o aumento da abundância de espécies de *Alphaproteobacteria* em ambientes marinhos é associado a impactos por meio de óleo. Os seres que fazem parte deste grupo possuem uma elevada variedade de formas de vidas, mutualismo com plantas, patógenos de plantas e animais e ainda vida livre. Possui ainda uma gama de estratégias metabólicas, fotossintéticas, fixadoras de nitrogênio, oxidantes de amônia e metilotróficas (DWORKIN et al. 2006; MADIGAN et al. 2010).

A menor classe do filo *Proteobacteria* é denominada de *Deltaproteobacteria*, sendo gram-negativa que inclui bactérias redutoras de sulfato (SRBs), assim chamada devido ao fato

de usarem sulfato como aceitador final de elétrons na cadeia de transporte de elétrons. Podem ainda ser utilizadas na redução de enxofre, para a redução de resíduos tóxicos e radioativos (GARRITY et al., 2005). Já a classe *Bacteroidia*, é composta por uma única ordem de bactérias ambientais, a *Bacteroidales*. Possui o papel de degradar a matéria orgânica, contribuindo assim para a ciclagem de nutrientes no solo (CHAVÉZ-ROMERO et al., 2016).

Os gêneros que podem ser encontrados em ambas as amostras com maior expressividade são: *Blastopirellula*, *Woeseia*, *Coxiella* e *Rhodopirellula*. O gênero *Blastopirellula*, pertence ao filo *Planctomycetes*, o qual obteve 26% da abundância da amostra total marinha do ponto de coleta RAM. Esse gênero se caracteriza por influenciar nos ciclos biogeoquímicos principalmente no ciclo do carbono (SCHLESNER et al. 2004), representado por duas espécies descritas, *Blastopirellula marina* e *Blastopirellula cremea*. A espécie *Blastopirellula marina* é uma renomeação do gênero *Pirellula marina*, sofreu alteração devido à grande diversidade nos níveis genéticos e fenotípicos encontrados neste grupo. Schlesner et al. (2004), isolou sequências obtidas de uma diversidade de habitats aquáticos, incluindo água doce, salobra e marinha. Já a espécie *Blastopirellula cremea*, foi isolada de uma arca de moluscos da espécie *Scapharca broughtonii*, coletado de uma fazenda de moluscos, na região do litoral Sul da Coréia, foi considerada uma nova espécie devido à diferença nas pigmentação das colônias, condições de crescimento e produção de ácidos a partir de substratos (LEE et al., 2013). Araújo (2018), realizou um trabalho no litoral do Estado de São Paulo na região da Baixada Santista (Bertioga) e em uma área em Cananéia, onde obteve um elevado número de isolados pertencentes ao filo *Planctomycetes* através da análise do gene 16S rRNA. Vale ressaltar, que este trabalho ocorreu em quatro áreas de manguezais, sendo 3 localizadas na Baixada Santista (Bertioga) - consideradas áreas contaminadas (2 por petróleo e uma pela proximidade com a cidade) - e uma área em Cananéia, considerada pristina. Araújo (2018) quantificou 889 sequências pertencentes ao filo *Planctomycetes*, estes números indicaram uma maior ocorrência destes organismos em áreas de manguezais, esta observação sugeriu um aumento na frequência destes organismos em áreas contaminadas.

Os membros do gênero *Woeseia* são do tipo cosmopolita em sedimentos marinhos (BIENHOLD et al. 2016). Segundo Mussmann et al. (2017), esses organismos possuem apenas uma via de desnitrificação, ou seja, eles só conseguem reduzir o NO₂ para N₂O. Estudos afirmam que este gênero possui um grande potencial para quimiolitotrofia (é um tipo de metabolismo presente em alguns procariontes, que consiste na produção de

energia a partir da oxidação de compostos inorgânicos. A maioria das bactérias quimiolitotróficas também é capaz de obter o carbono a partir do CO₂, sendo também autotróficas), a qual possivelmente é causada pela oxidação de hidrogênio e compostos inorgânicos de enxofre (MUSSMANN et al. 2017; DU et al. 2016). Estas bactérias quimiolitotróficas podem ser encontradas em ambientes extremos como o mar profundo, pântanos, fumarolas, ambientes anóxicos em geral.

O gênero *Coxiella*, pertence à classe *Gammaproteobacteria* sendo cocobacilar, pleomórfica, gram-negativa e seu principal representante é a *Coxiella burnetii*, é o agente etiológico da doença conhecida como Febre Q, uma zoonose de distribuição mundial (LEMOS et al., 2011). Segundo Duncan et al. (2011), a presença deste microrganismo na área marinha iniciou-se quando encontrada na placenta de lobos-marinhos (*Callorhinus ursinus*) da Ilha de St. Paul no Alasca. Para o autor é necessário mais investigações sobre a epidemiologia da *Coxiella* no ecossistema marinho, principalmente devido ao fato de que esses microrganismos pode causar o declínio da população de mamíferos marinhos como os lobos, a exposição e infecção humana potencial (este padrão de contaminação sugere que a distribuição irregular do organismo pode estar associada à reprodução e distribuição de animais selvagens forrageiros marinhos) e ainda o impacto sobre outros mamíferos marinhos simpátricos ou espécies terrestres. Não há registros desse gênero associado com organismos pertencentes a substratos consolidados marinhos.

O gênero *Rhodopirellula* pertence ao filo *Planctomycetes*, o qual se divide em duas classes, *Planctomycetacia* e *Phycisphaerae*, admitindo uma ordem cada, *Planctomycetales* e *Phycisphaerales*, respectivamente todas encontradas neste estudo. No momento atual, a ordem *Planctomycetales* está dividida em 11 gêneros cultiváveis: *Pirellula*, *Gemmata*, *Plantomyces*, *Isosphaera*, *Blastopirellula*, *Rhodopirellula*, *Shlesneria*, *Singulisphaera*, *Aquisphaera*, *Zavarzinella*, *Phycisphaera* (dos 11 gêneros cultiváveis, foi possível identificar 5 neste estudo); e cinco gêneros não cultiváveis: *Candidatus Brocadia* (bactérias anammox), *Kuenenia*, *Scalindua*, *Anammoxoglobus* e *Jettenia*, nenhum destes foi encontrado no presente estudo, sugerindo que haja mais estudos sobre esse gênero no local da análise (SCHLESNER et al., 2004; WARD et al., 2006; KULICHEVSKAYA et al., 2009; KRIEG et al., 2008; FUKUNAGA et al., 2009; BONDOSO et al., 2011). Alguns dos gêneros desta ordem são regularmente mencionados como clado PRB (*Pirellula*, *Rhodopirellula* e *Blastopirellula*). Desse modo, os *Planctomycetes* são englobados num chamado superfilo PCV (*Planctomycetes*, *Chlamydiae*, *Verrucomicrobia*), que engloba também um aspirante de difícil

isolamento *Candidatus Poribacteria* e *OP3* (IZUMI *et al.*, 2013). O superfilo PCV é frequentemente mencionado como originado ao longo da separação evolutiva entre *Eukarya* e *Bacteria* (FORTERRE, 2011). Retornando ao gênero *Rhodopirellula*, este é composto por apenas uma espécie, *Rhodopirellula baltica*. Estirpes desta bactéria foram frequentemente isoladas do Mar Báltico e em diferentes habitats em todo mundo. Apesar deste gênero ter sido identificado neste estudo, esses microrganismos continuam considerados os menos representados em coleções de culturas microbianas revelando a necessidade de mais estudos e da conservação deste em coleções (WINKELMANN e HARDER, 2009).

Analisando o perfil de diversidade e dispersão simples, percebe-se que as curvas de diversidade se cruzam, ou seja, Currais sempre começa em cima e termina embaixo. Isso ocorre porque em Currais os valores de Dominância sempre são maiores, ou seja, mesmo tendo mais táxons, alguns dominam mais a amostra, enquanto no RAM a dominância por poucos táxons não tão grande. Quanto a dispersão o ponto Currais apresentou maiores riquezas e menores equitabilidades.

6 CONCLUSÃO

Uma das principais dificuldades encontrada para estudar a composição da comunidade microbiana marinha é a pouca quantidade literária acerca desse tema. Os dados obtidos neste estudo exemplificam uma análise bem sucedida utilizando abordagem metagenômica e utilizando ARMS como coletores passivos para obtenção de amostras microbianas. Nossos dados revelam, pela primeira vez, as comunidades microbianas marinhas pertencentes ao Parque Nacional Marinho das Ilhas dos Currais e o Conjunto de Recifes Artificiais Marinhos.

A curva de rarefação mostra que estatisticamente os dados são confiáveis, porém ressalta a necessidade de que haja futuros estudos principalmente no ponto RAM o qual não conseguiu atingir estabilização na curva. Em relação a metodologia utilizada, primeiramente foi observado que os ARMS são importantes ferramentas para análises de microrganismos em ambientes recifais, devido ao fato de serem coletores passivos, utilizados para amostrar a criptofauna marinha, não degradando esse ambiente e nem seus residentes os quais possuem em sua maioria crescimento lento. Essa metodologia é considerada inédita no Estado do Paraná para estudos com microrganismos, logo se ressalta que este trabalho foi bem sucedido quanto sua utilização demonstrando grande eficiência na coleta de amostras microbianas e

fazendo com que haja novos estudos mais detalhados para a melhor utilização dos ARMS na costa paranaense.

A utilização da metodologia 16S rRNA demonstrou grande eficácia na classificação microbiana marinha. Foi possível observar que o ponto Currais sempre apresentou maiores riquezas, porém sua equitabilidade estavam menores, isso ocorre devido ao fato de que em Currais os valores de dominância sempre foram maiores, ou seja, mesmo tendo mais táxons, alguns dominavam mais a amostra, enquanto que no ponto RAM havia pouca riqueza, logo sua dominância por poucos táxons não era tão elevada.

Os filos de maior abundância foram *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Planctomycetes*, sendo que a soma de suas abundâncias corresponde a mais de 80% das sequências. De acordo com outros estudos de ecossistemas marinhos, a classe *Gammaproteobacteria* foi a mais abundante como esperado, seguida por *Alpha* e *Deltaproteobacteria*, sendo essas todas pertencentes ao filo *Proteobacteria*.

Novas técnicas e protocolos de amostragem tecnicamente avançados apropriados para estudos de ecologia microbiana devem ser desenvolvidos, principalmente quanto ao quesito cultura/isolamento. Espera-se que haja novos estudos nesta área, especialmente comparando a microbiota de recifes naturais e artificiais e que esses organismos possam ser analisados minuciosamente, tornando o litoral paranaense tão diverso quanto o mesmo já se encontra. Estudos recentes da diversidade microbiana produziram descobertas espetaculares de microrganismos anteriormente desconhecidos, muitos dos quais têm grandes impactos nos processos oceânicos, se faz necessário à continuidade de estudos sobre a microbiota marinha em um refúgio de vida marinha como o PARNAMAR das Ilhas dos Currais.

REFÊRENCIAS

ABOIM, M. C. R et al. Soil bacterial community structure and soil quality in a slash-and-burn cultivation system in Southeastern Brazil. **Applied soil ecology**, v. 38, n. 2, p. 100-108, 2008.

ADAMS, W. M. et al. Biodiversity conservation and the eradication of poverty. **Science**, v. 306, n. 5699, p. 1146-1149, 2004.

AIRA, M. et al. Characterization of the bacterial communities of casts from *Eisenia andrei* fed with different substrates. **Applied Soil Ecology**, v. 98, p. 103-111, 2016.

ALBRIGHT, R. et al. Reversal of ocean acidification enhances net coral reef calcification. **Nature**, v. 531, n. 7594, p. 362-365, 2016.

ALENCAR, C. A. G.; SILVA, A. S.; CONCEIÇÃO, R. N. L.. Texto básico de nivelamento técnico sobre recifes artificiais marinhos. **Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, Brasília, Brasil, 2003.**

ALMEIDA, B. C. **Diversidade de bactérias em amostras de água do mar no Canal de São Sebastião.** 2009. 198 f. Tese (Doutorado) - Curso de Instituto de Ciências Biomédicas, Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ALVARENGA, D. O. et al. Cyanobacteria in mangrove ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 4, p. 799-817, 2015.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

ANDREOTE, F. D et al. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 417-432, 2009.

ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição na comunidade bacteriana associada às plantas.** 2007. 184 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ARAÚJO, J. E. **Caracterização genômica e metabólica de Planctomycetes isolados de solos de manguezais brasileiros.** 2018. 147 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências, Universidade de São Paulo-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2018.

ARMOUGOM, F.; RAOULT, D. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. **J Comput Sci Syst Biol**, v. 2, n. 1, p. 74-92, 2009.

ARTEN, A.R. **Processo de implantação de recifes artificiais no litoral do paraná: significado para a gestão dos recursos pesqueiros e costeiros.** 2012. 226 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Universidade Federal do Paraná-Centro de Estudos do Mar, Pontal do Paraná, 2012.

BALCH, W. E. et al. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. **Microbiological reviews**, v. 43, n. 2, p. 260, 1979.

BAUMAN, Z. **A ética é possível num mundo de consumidores?:** (tradução de Alexandre Werneck, da versão original de 2008). Londres: Zahar, 2011.

BIENHOLD, C. et al. Diversity and biogeography of bathyal and abyssal seafloor bacteria. **PLoS one**, v. 11, n. 1, p. e0148016, 2016.

BIGARELLA, J. J. Contribuição ao estudo da planície litorânea do Estado do Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, p. 65-110, 2001.

BLÖCHL, E. et al. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 C. **Extremophiles**, v. 1, n. 1, p. 14-21, 1997.

BOFF, L. Sostenibilidad: ¿ adjetivo o sustantivo. **Portal Koinonía. Agenda Latinoamericana**. Disponível em: < <http://www.servicioskoinonia.org/boff/articulo.php>, n. 439, 2011.

BONDOSO, J. et al. *Aquisphaera giovannonii* gen. nov., sp. nov., a planctomycete isolated from a freshwater aquarium. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 61, n. 12, p. 2844-2850, 2011.

BOURNE, D. G.; MORROW, K. M.; WEBSTER, N. S. Insights into the coral microbiome: underpinning the health and resilience of reef ecosystems. **Annual Review of Microbiology**, v. 70, 2016.

BOURNE, D. G.; MUNN, C. B. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. **Environmental microbiology**, v. 7, n. 8, p. 1162-1174, 2005.

BRANDINI, F. Relatório final do projeto recifes artificiais marinhos: uma proposta de conservação da biodiversidade e desenvolvimento da pesca artesanal através da criação de um «Parque» Marinho na Costa do Estado do Paraná. [sl]. **Ministério da Ciência e Tecnologia (padct iii/ciamb)**, 2003.

BRASIL. Lei nº 12.829, de 20 de junho de 2013. Cria o Parque Nacional Marinho das Ilhas dos Currais, no Estado do Paraná, 2013. Disponível online em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato20112014/2013/lei/112829.htm . Acesso em 20 abril de 2020.

BRISOU, J.; COURTOIS, D.; DENIS, F. Microbiology Study of a Hypersaline Lake in French Somaliland. **Applied microbiology**, v. 27, n. 5, p. 819-822, 1974.

BUMBEER, J. et al. Biodiversity of benthic macroinvertebrates on hard substrates in the Currais Marine Protected Area, in southern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 16, n. 4, 2016.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME journal**, v. 6, n. 8, p. 1621-1624, 2012.

CARLOS, C. **Caracterização taxonômica e funcional da comunidade bacteriana associada a corais do Estado de São Paulo**. 2014. 126 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Biologia, Campinas, 2014.

CARPENTER, K. E. et al. One-third of reef-building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts. **Science**, v. 321, n. 5888, p. 560-563, 2008.

CARVALHO, I. T. *Microbiologia básica*. 2016.

CARVALHO-FILHO, A. et al. Peixes Recifais do Brasil, uma síntese. **Anais do XVI Encontro Brasileiro de Ictiologia**, 2005.

CASTANHARI, G.; TOMÁS, A. R. G.; ELLIFF, C. I. Benefícios, prejuízos e considerações relevantes na utilização de sistemas de recifes artificiais e estruturas correlatas. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 12, n. 3, p. 313-322, 2012.

CENSUS OF MARINE LIFE. Vida microbiana. 2020. Disponível em: <http://www.coml.org/> . Acesso em: 04 fev. 2020.

CHÁVEZ-ROMERO, Y. et al. 16S metagenomics reveals changes in the soil bacterial community driven by soil organic C, N-fertilizer and tillage-crop residue management. **Soil and Tillage Research**, v. 159, p. 1-8, 2016.

CHISTOSERDOVA, L. et al. The enigmatic planctomycetes may hold a key to the origins of methanogenesis and methylotrophy. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 7, p. 1234-1241, 2004.

COFFROTH, M. A. Cyclical formation of mucus sheets by 3 coral species. In: **American Zoologist**. 1041 NEW HAMPSHIRE ST, LAWRENCE, KS 66044: AMER SOC ZOOLOGISTS, p. 960-960, 1990.

COLWELL, R.R. **Microbial diversity in the era of genomics**. In: LOGAN, N.A.; LAPPIN-SCOTT, H.M.; OYSTON, P.C.F. (Ed.). *Prokaryotics diversity: mechanisms and significance*. UK: Cambridge University Press. p. 1-18, 2006.

COMELIAU, C.; SACHS, I. **Historie, Culture et Styles de Développement - Brésil et Inde, Esquisse de com parasion**. Paris: Unesco - Cetral, Editions l'Harmattan, 1988.

COTTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low-and high-molecular-weight dissolved organic matter. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1692-1697, 2000.

COUGHLAN, L. M. et al. Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 672, 2015.

DARLAND, G. et al. A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile. **Science**, v. 170, n. 3965, p. 1416-1418, 1970.

DAVIDSON, O. G. **The enchanted braid: Coming to terms with nature on the coral reef**. New York: Wiley, 1998.

DEDYSH, Svetlana N.; IVANOVA, Anastasia O. Abundance, diversity, and depth distribution of Planctomycetes in acidic northern wetlands. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 5, 2012.

DELONG, E. F. Microbial seascapes revisited. **Current opinion in microbiology**, v. 4, n. 3, p. 290-295, 2001.

DELONG, E.F.; FRANKS, D.G.; ALLDREDGE, A. L. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. **Limnology and oceanography**, v. 38, n. 5, p. 924-934, 1993.

DEMATTEIS, G.; GOVERNA, F. (Ed.). **Territorialità, sviluppo locale, sostenibilità: il modello SLoT**. Angeli, 2006.

DIAS, A; C.F et al. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1305-1311, 2009.

SANTOS, D. H.C et al. Recifes artificiais, mergulho e pesca artesanal: alguns aspectos do conflito na costa de Pernambuco–Brasil. **Revista de Gestão Costeira Integrada-Journal of Integrated Coastal Zone Management**, v. 10, n. 1, p. 7-22, 2010.

DU, Z. J. et al. *Woeseia oceani* gen. nov., sp. nov., a chemoheterotrophic member of the order Chromatiales, and proposal of *Woeseiaceae* fam. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 1, p. 107-112, 2016.

DUNCAN, C. et al. *Coxiella burnetii* in northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) placentas from St. Paul Island, Alaska. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 3, p. 192-195, 2012.

DWORKIN, Martin; FALKOW, Stanley. **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: proteobacteria: gamma subclass**. Springer Verlag, p. 919, 2006.

EILERS, H. et al. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 7, p. 3044-3051, 2000.

FERREIRA, E. G. **Diversidade e potencial biotecnológico de actinomicetos recuperados do sedimento marinho coletado no arquipélago São Pedro e São Paulo, Brasil**. 2014. 158 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais - Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

FIALA, G.; STETTER, K. O. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 C. **Archives of Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 56-61, 1986.

FORTERRE, P. A new fusion hypothesis for the origin of Eukarya: better than previous ones, but probably also wrong. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 77-91, 2011.

FRY, N. K. et al. Direct amplification and sequencing of the 16S ribosomal DNA of an intracellular *Legionella* species recovered by amoebal enrichment from the sputum of a patient with pneumonia. **FEMS microbiology letters**, v. 83, n. 2, p. 165-168, 1991.

FUHRMAN, J. A.; MCCALLUM, K.; DAVIS, A. A. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1294-1302, 1993.

FUKUDA, K. et al. Molecular approaches to studying microbial communities: targeting the 16S ribosomal RNA gene. **Journal of UOEH**, v. 38, n. 3, p. 223-232, 2016.

FUKUNAGA, Y. et al. Phycisphaera mikurensis gen. nov., sp. nov., isolated from a marine alga, and proposal of Phycisphaeraceae fam. nov., Phycisphaerales ord. nov. and Phycisphaerae classis nov. in the phylum Planctomycetes. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 55, n. 4, p. 267-275, 2009.

GARRITY, G. M. et al. Systematic bacteriology. **The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, Bergey's Manual Trust, Department of Microbiology and Molecular Genetics**, v. 2, 2005.

GIOVANNONI, S. J. Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. **Microbial ecology of the oceans**, p. 47-84, 2000.

GLÖCKNER, F. O. et al. Complete genome sequence of the marine planctomycete Pirellula sp. strain 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8298-8303, 2003.

GOLL, J. et al. METAREP: JCVI metagenomics reports—an open source tool for high-performance comparative metagenomics. **Bioinformatics**, v. 26, n. 20, p. 2631-2632, 2010.

GONÇALVES, C. W. P. **Os (des) caminhos do meio ambiente**. Editora contexto, 1989.

HANDELSMAN, Jo et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & biology**, v. 5, n. 10, p. R245-R249, 1998.

HARPER, J. L.; HAWKSWORTH, D. L. Preface in biodiversity: measurement and estimation. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 345, p. 5-12, 1995.

HUGHES, J. B. et al. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4399-4406, 2001.

ICMBIO- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **UNIDADES DE CONSERVAÇÃO - Marinho: PARNA MARINHO DAS ILHAS DOS CURRAIS**. 2016. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomas-brasileiros/marinho/unidades-de-conservacao-marinho/4126-parna-marinho-das-ilhas-dos-currais> . Acesso em: 28 set. 2019.

IZUMI, H. et al. Isolation and diversity of planctomycetes from the sponge Niphates sp., seawater, and sediment of Moreton Bay, Australia. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 4, p. 533-546, 2013.

JAMIESON, R. E. et al. Bacterial biodiversity in deep-sea sediments from two regions of contrasting surface water productivity near the Crozet Islands, Southern Ocean. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 75, p. 67-77, 2013.

JOVEL, J. et al. Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 459, 2016.

KELLOGG, C. A. Tropical Archaea: diversity associated with the surface microlayer of corals. **Marine Ecology Progress Series**, v. 273, p. 81-88, 2004.

KERSTERS, K. et al. *The Prokaryotes: A handbook on the biology of Bacteria*. 2006.

KHAN, S. T.; NAKAGAWA, Y.i; HARAYAMA, S. *Fulvibacter tottoriensis* gen. nov., sp. nov., a member of the family Flavobacteriaceae isolated from marine sediment. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. 7, p. 1670-1674, 2008.

KIELAK, A. M. et al. The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 744, 2016.

KIRCHMAN, D. L. (Ed.). **Microbial ecology of the oceans**. John Wiley & Sons, 2010.

KRONEMBERGER, D.. **Desenvolvimento local sustentável: uma abordagem prática**. São Paulo: SENAC, 2011.

KUCZYNSKI, J. et al. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. **Current protocols in microbiology**, v. 27, n. 1, p. 1E. 5.1-1E. 5.20, 2012.

KULICHEVSKAYA, I. S. et al. *Zavarzinella formosa* gen. nov., sp. nov., a novel stalked, Gemmata-like planctomycete from a Siberian peat bog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 357-364, 2009.

LEAL, M. C. et al. Bioprospecting of marine invertebrates for new natural products—A chemical and zoogeographical perspective. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9842-9854, 2012.

LEE, H.W. et al. *Blastopirellula cremea* sp. nov., isolated from a dead ark clam. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2314-2319, 2013.

LEFF, E. **Epistemologia ambiental**. Tradução: Sandra Valenzuela. Revisão técnica: Paulo Freire Vieira. 4. ed. São Paulo: Cortez, 2007.

LEMOS, L. N. et al. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **Journal of microbiological methods**, v. 86, n. 1, p. 42-51, 2011.

LESSER, M. P. et al. Discovery of symbiotic nitrogen-fixing cyanobacteria in corals. **Science**, v. 305, n. 5686, p. 997-1000, 2004.

LONGHURST, A. R. **Ecological geography of the sea**. Elsevier, 2010.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual review of phytopathology**, v. 37, n. 1, p. 81-125, 1999.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock biology of microorganisms**. Upper Saddle River, NJ: Prentice hall, 1997.

MADIGAN, Michael T. et al. **Brock biology of microorganisms 13th edition**. Benjamin Cummings, p. 1152, 2010.

- MAGURRAN, A. E. Biological diversity. **Current Biology**, v. 15, n. 4, p. R116-R118, 2005.
- MARHAVER, K. L.; et al. Forest. Viral communities associated with healthy and bleaching corals. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 9, p. 2277-2286, 2008.
- MASON, O. U. et al. Metagenomics reveals sediment microbial community response to Deepwater Horizon oil spill. **The ISME journal**, v. 8, n. 7, p. 1464-1475, 2014.
- MEDEIROS, A. W. **ANÁLISE DA COMUNIDADE BACTERIANA DE ANIMAIS MARINHOS RECOLHIDOS DO LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL**. 2016. 48 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.
- MERLIN, P. **Caracterização da malacofauna marinha do PARNAMAR (Parque Nacional Marinho) das Ilhas dos Currais**. 2016. 50 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia de Aquicultura, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, 2016.
- MILLENIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT (New York). 2005. **Ecosystems and human well-being: current state and trends**, New York: Island Press, v. 1, p. 1-47, 2005.
- MITTERMEIER, R. A. et al. Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In: **Biodiversity hotspots**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 3-22, 2011.
- MONTEIRO, C. C.; DE CARVALHO, M. P. **Os recifes artificiais como contributo fundamental para o ordenamento das pescarias litorais algarvias**. 1989.
- MUSMANN, M. et al. Genomic repertoire of the Woeseiaceae/JTB255, cosmopolitan and abundant core members of microbial communities in marine sediments. **The ISME journal**, v. 11, n. 5, p. 1276-1281, 2017.
- NAVES, J. G.I; BERNARDES, M. B. A relação histórica Homem/Natureza e sua importância para construção de ambientes saudáveis. **Geosul**, v. 29, n. 57, p. 7-26, 2014.
- NEPSTAD, D et al. The end of deforestation in the Brazilian Amazon. **Science**, v. 326, n. 5958, p. 1350-1351, 2009.
- OLIVEIRA, V. M. et al. A ribosomal RNA gene intergenic spacer based PCR and DGGE fingerprinting method for the analysis of specific rhizobial communities in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, n. 3, p. 366-379, 2006.
- OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **The FASEB journal**, v. 7, n. 1, p. 113-123, 1993.
- PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science** 276: 734–740. 1997.
- PATEL, J. B. et al. Sequence-based identification of Mycobacterium species using the Microseq 500 16S rDNA bacterial identification system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 246-251, 2000.

PECCIA, J.; HERNANDEZ, M. Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: a review. **Atmospheric Environment**, v. 40, n. 21, p. 3941-3961, 2006.

PETERSON, J. et al. The NIH human microbiome project. **Genome research**, v. 19, n. 12, p. 2317-2323, 2009.

PHILIPPOT, L. et al. The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 523-529, 2010.

PINHEIRO, P. C. **Ictiofauna do Arquipélago de Currais (Paraná - Brasil): complexidade estrutural dos costões rochosos e análise comparativa com um módulo recifal artificial**. 2005. 105 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

POLOVINA, J. J. Fisheries applications and biological impacts of artificial habitats. **Artificial habitats for marine and freshwater fisheries**. Academic Press, New York, v. 153176, 1991.

PORTO-GONÇALVES, C. W. **O desafio ambiental**. 1. ed. Rio de Janeiro: Record, 2004. 182 p.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012.

QUEIROZ, L.L. **Padrões de diversidade microbiana em sedimentos marinhos profundos influenciados por uma exsudação de asfalto**. 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, FRANK J.; DE BRUIJN, F. J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. **Molecular microbial ecology manual**, v. 3, n. 3, p. 1-27, 1998.

RADEMAKER, J. L. W.; SAVELKOUL, P. PCR amplification-based microbial typing. **Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice**. ASM Press, Washington, DC, p. 197-221, 2004.

RADEMAKER, J.L.W.; BRUIJN, F.J. Characterization and classification microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. (Ed.). **DNA Markes: protocols, applications and overviews**. p. 151-171, 1997.

REAKA-KUDLA, M. L. The global biodiversity of coral reefs: a comparison with rain forests. **Biodiversity II: Understanding and protecting our biological resources**, v. 2, p. 551, 1997.

REBIMAR – PROGRAMA DE RECUPERAÇÃO DA BIODIVERSIDADE MARINHA (Brasil). **RELATÓRIO TÉCNICO-CIENTÍFICO Licença de Instalação no887/2012**

referente ao lançamento de estruturas de recifes artificiais ao longo do litoral do Estado do Paraná (Processo nº 02017.005865/2005-21). Curitiba: IBAMA. p. 207, 2014.

REIS, A. M. M. et al. Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1378-1387, 2009.

RITCHIE, K. B. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, v. 322, p. 1-14, 2006.

RODICIO, M.R.; MENDOZA, M.C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 22, n. 4, p. 238-245, 2004.

RODRIGUES, A. M. **A questão ambiental: novas práticas e novas matrizes discursivas.** In: SOUZA, M. A. A.; SANTOS, M; SCARLATO, F. C; ARROYO, M. (Orgs). *Natureza e sociedade de hoje: uma leitura geográfica.* 2.ed. São Paulo: HUCITEC/ANPUR, p. 119-126, 1994.

RODRIGUES, D. F. et al. Diversity of hydrocarbon-degrading *Klebsiella* strains isolated from hydrocarbon-contaminated estuaries. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1304-1314, 2009.

RODRIGUES, I. Nr. Desenvolvimento sustentável. **Revista Estudos Avançados**, Caxias do Sul, v. 26, ed. 74, 2012.

ROESCH, L. F.W et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME journal**, v. 1, n. 4, p. 283-290, 2007.

ROHWER, F. et al. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, v. 243, p. 1-10, 2002.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS microbiology reviews**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

SACHS, I. **Caminhos para o desenvolvimento sustentável.** Editora Garamond, 2000.

SAGAN, D.; MARGULIS, L. **O que é vida.** Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 2002.

SAIT, M.; DAVIS, K. E.R; JANSSEN, P. H. Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum Acidobacteria occurring in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1852-1857, 2006.

SALE, P. F. et al. Critical science gaps impede use of no-take fishery reserves. **Trends in ecology & evolution**, v. 20, n. 2, p. 74-80, 2005.

SAMBO, F. et al. Optimizing PCR primers targeting the bacterial 16S ribosomal RNA gene. **BMC bioinformatics**, v. 19, n. 1, p. 343, 2018.

SANTOS, D. H.C; PASSAVANTE, J. Z. O. Recifes artificiais marinhos: modelos e utilizações no Brasil e no Mundo. **Bol. Tec. Cient. CEPENE**, v. 15, n. 1, p. 113-124, 2007.

SANTOS, M. P. **Contribuição para o conhecimento da espongofauna do litoral paranaense**. 2013. f. 38. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Bacharelado em Oceanografia, Universidade Federal do Paraná. Pontal do Paraná, 2013.

SAQUET, M. El desarrollo en una perspectiva territorial multidimensional. **Revista Movimentos Sociais e Dinâmicas Espaciais**, v. 2, n. 1, p. 111-123, 2013.

SCARANO, F. et al. Lead by example. **Nature**, v. 486, n. 7401, p. 25-26, 2012.

SCARANO, F. R. *et al.* A importância da biodiversidade brasileira e os desafios para a conservação, para a ciência e para o setor privado. *In: ROLIM, S. G. et al. Floresta Atlântica de Tabuleiro: Diversidade e Endemismo na Reserva Natural Vale*. Rio de Janeiro: RONA, 2016. cap. PARTE VI – DESAFIOS E OPORTUNIDADES, p. 483-495. ISBN 978-85-62805-63-9.

SCARO, F. et al. O que é Biodiversidade? **Scientific American Brasil**, v.39, (Edição Especial), p. 6-11, 2010.

SCHLEIFER, K. H. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. **Systematic and applied microbiology**, v. 32, n. 8, p. 533-542, 2009.

SCHLESNER, H. et al. Taxonomic heterogeneity within the Planctomycetales as derived by DNA–DNA hybridization, description of *Rhodopirellula baltica* gen. nov., sp. nov., transfer of *Pirellula marina* to the genus *Blastopirellula* gen. nov. as *Blastopirellula marina* comb. nov. and emended description of the genus *Pirellula*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1567-1580, 2004.

SEAMAN, W. (Ed.). **Artificial reef evaluation: with application to natural marine habitats**. CRC press, 2000.

SILVA, A.S. **Estrutura e dinâmica de comunidades epilíticas de habitats artificiais e suas relações com os fatores ambientais na plataforma rasa do Estado do Paraná**. 2001. 166 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

SIMON, C.; DANIEL, R. Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 265-276, 2009.

SINIS, A. I.; CHINTIROGLOU, C. C.; STERGIOU, K. I. Preliminary results from the establishment of experimental artificial reefs in the N. Aegean Sea (Chalkidiki, Greece). **Belg. J. Zool**, v. 130, n. 1437147, p. 1437147, 2000.

SMALLA, K. Culture-independent microbiology. **Microbial Diversity and Bioprospecting**, p. 88-99, 2003.

SMITH, R. J.; BRYANT, R. G. Metal substitutions in carbonic anhydrase: A halide ion probe study. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 66, n. 4, p. 1281-1286, 1975.

- SOGIN, M. L. et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 32, p. 12115-12120, 2006.
- STALEY, C.r; SADOWSKY, M. J. Practical considerations for sampling and data analysis in contemporary metagenomics-based environmental studies. **Journal of microbiological methods**, v. 154, p. 14-18, 2018.
- STORESUND, J. E.; ØVREÅS, L. Diversity of Planctomycetes in iron-hydroxide deposits from the Arctic Mid Ocean Ridge (AMOR) and description of *Bythopirellula goksoyri* gen. nov., sp. nov., a novel Planctomycete from deep sea iron-hydroxide deposits. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 4, p. 569-584, 2013.
- STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A. Metagenomics—the key to the uncultured microbes. **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 5, p. 492-498, 2004.
- SYAFINAZ, A.N.S.; ZUBAIDAH, A.W.; SALASAWATI, H. Fingerprinting of *Mrsa* Using Rep-PCR. USA: **Lap Lambert Academic Publishing**. p. 72, 2013.
- TAUER, A.; BENNER, S. A. The B12-dependent ribonucleotide reductase from the archaeobacterium *Thermoplasma acidophila*: an evolutionary solution to the ribonucleotide reductase conundrum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 1, p. 53-58, 1997.
- VAN ELSAS, J. D. et al. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 2, p. 133-154, 1998.
- VENTER, J. C. et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v. 304, n. 5667, p. 66-74, 2004.
- VIEIRA, P. H. F. Do desenvolvimento local ao ecodesenvolvimento territorial. **Revista Internacional Interdisciplinar INTERthesis**, v. 10, n. 2, p. 119-141, 2013.
- VON DER WEID, Ie et al. Molecular diversity of bacterial communities from subseafloor rock samples in a deep-water production basin in Brazil. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 5-14, 2008.
- WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, v. 345, n. 6270, p. 63-65, 1990.
- WARD, N. et al. The order Planctomycetales including the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera* and the Candidatus genera *Brocadia*, *Kuenenia* and *Scalindua*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes**. 3^a ed. New York: Springer, v. 7, p. 757-793, 2006.
- WHITMAN, W. B. et al. Prokaryotes: a maioria invisível. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 12, p. 6578-6583, 1998.

WHITMARSH, D. et al. Marine habitat modification through artificial reefs off the Algarve (southern Portugal): An economic analysis of the fisheries and the prospects for management. **Ocean & Coastal Management**, v. 51, n. 6, p. 463-468, 2008.

WILKINSON, C. **Status of coral reefs of the world: 2000**. 2000.

WINKELMANN, N.; HARDER, J. An improved isolation method for attached-living Planctomycetes of the genus Rhodopirellula. **Journal of microbiological methods**, v. 77, n. 3, p. 276-284, 2009.

WOESE, C. R. There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 58, n. 1, p. 1-9, 1994.

WONG, H. C.; LIN, C. H. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4233-4240, 2001.

ZEIKUS, J. G. The biology of methanogenic bacteria. **Bacteriological reviews**, v. 41, n. 2, p. 514, 1977.

ZHOURI, A *et al.* **A insustentável leveza da política ambiental: Desenvolvimento e conflitos socioambientais**. 1. ed. Belo Horizonte: Autêntica, 2005. 288 p. ISBN 978-8575261668.

ZINDER, S. H.; SALYERS, A. A. Microbial ecology—new directions, new importance. In: **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. Springer, New York, NY, p. 101-109, 2001.

ZINGER, L. et al. Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. 24570, 2011.