

**Francielli Vilela Peres**

**DIVERSIDADE E CONECTIVIDADE DE COMUNIDADES  
BACTERIANAS EM SUBSTRATOS SINTÉTICOS E  
ORGÂNICOS NO ATLÂNTICO SUDOESTE PROFUNDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2016

**Francielli Vilela Peres**

**DIVERSIDADE E CONECTIVIDADE DE COMUNIDADES  
BACTERIANAS EM SUBSTRATOS SINTÉTICOS E  
ORGÂNICOS NO ATLÂNTICO SUDOESTE PROFUNDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Vivian Helena Pellizari

Versão Corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível no ICB e na Biblioteca Digital de Dissertação e Teses da USP;

São Paulo  
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Peres, Francieli Vilela.

Diversidade e conectividade de comunidades bacterianas em substratos sintéticos e orgânicos no Atlântico sudoeste profundo / Francieli Vilela Peres. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Vivian Helena Pellizari.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Microbiologia marinha.

Versão do título para o inglês: Diversity and connectivity of bacterial communities in synthetic and organic substrates in the deep southwest Atlantic.

1. Biofilme 2. Oceano Atlântico 3. Mar profundo 4. Baleia afundada  
5. Microrganismos 6. Quimiossíntese I. Pellizari, Vivian Helena II.  
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB083/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Francielli Vilela Peres.

Título da Diversidade e conectividade de comunidades bacterianas em substratos sintéticos e orgânicos no Atlântico sudoeste profundo.

Orientador(a): Vivian Helena Pellizari.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

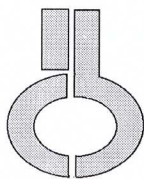
**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **623/13** referente ao projeto intitulado: “*Biodiversidade e conectividade de comunidades procarióticas em sedimentos associados a substratos orgânicos no atlântico sudoeste profundo*” sob a responsabilidade de **Francieli Vilela Peres**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 23 de outubro de 2013.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO  
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

***Dedico...***

***Aos meus pais Evaristo e Valdirene.***

***Aos meus irmãos Alessandro e Daniele.***

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Vivian Helena Pellizari pela orientação, pelas oportunidades e por proporcionar a realização deste sonho.

À querida Rosa Gamba por ser uma mãe para todos nós do LECOM.

Aos Drs. Rubens Duarte, Douglas Galante e Fabio Rodrigues por me aconselharem e me incentivarem a ir atrás desta conquista.

Aos meus amigos de laboratório: André Rosch, Adriana Maria, Amanda Bendia, Camila Signori, Célio Jonck, Diego Castillo, Felipe Nobrega, Juliana Bomjardim, Luana Agostini, Luciano Queiroz, Marina Bruza, Mauricio Shimabukuro, Natascha Bergo, Renato Gamba e Vitor Vital pelo apoio, ensinamento, paciência e pelos momentos de descontração.

À Marinha do Brasil pelo apoio nas coletas, sem o qual este projeto não se realizaria e a toda equipe do embarque, em especial à Dra. Cristina Nakayama e ao Dr. Paulo Sumida.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo e à FAPESP pelo financiamento do projeto no qual este está inserido.

Aos meus queridos amigos: Alexandre Ferraro, Guilherme Dornelles, Naiara Machado, Patricia Shibuya, Ramon Peres, Renan Olivier e Thiago Matheus pela amizade, apoio, incentivo e por tornarem meus dias melhores.

Aos meus amigos da república por ficarem na torcida e por me darem o apoio que tanto precisei nesta etapa final do trabalho.

À minha família pelo amor, incentivo, exemplo e total apoio para que eu realizasse mais este sonho. Sou eternamente grata.

E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir esta etapa.

Muito obrigada!

*“O mar não é um obstáculo: é um caminho.”  
(Amyr Klink)*



## Resumo

PERES, F. V. **Diversidade e Conectividade de Comunidades Bacterianas em Substratos Sintéticos e Orgânicos no Atlântico Sudoeste Profundo**, 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O ambiente marinho ocupa cerca de 70% da superfície do planeta e é responsável pelas maiores regiões potencialmente habitáveis da Terra. Organismos que vivem nestas regiões encontram limitações na disponibilidade de alimentos e exploram enriquecimentos orgânicos esporádicos, como: parcelas de madeira e carcaças de animais que afundam até o assoalho oceânico, constituindo fontes de carbono localmente e temporalmente restritas. Estudar a ecologia microbiana nesses *habitats* localmente ativos é de grande importância para melhor compreensão da diversidade microbiana, ciclos biogeoquímicos e regeneração de nutrientes. O objetivo deste trabalho foi descrever a diversidade das comunidades bacterianas associadas à parcelas sintéticas e em biofilmes associados à parcelas orgânicas (vértebras de baleia e blocos de madeira) em três sítios de fundeio: Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, em isóbatas de 3.300 m de profundidade, avaliando a influência dos substratos e da localização geográfica sob essas comunidades. Foram utilizados métodos de ecologia molecular baseados na extração de DNA e amplificação do gene RNAr 16S. As amostras foram sequenciadas na plataforma Illumina Miseq e as análises de bioinformática realizadas com o programa Qiime. As classes dominantes nos substratos sintéticos foram Alphaproteobacteria, Flavobacteriia e Gammaproteobacteria. Nas amostras de biofilme das madeiras, encontramos como dominante as classes Alphaproteobacteria, Flavobacteriia e Epsilonproteobacteria. Nos biofilmes das vértebras as classes mais abundantes foram Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria e Bacteroidia. A composição das comunidades bacterianas foi fortemente influenciada pela composição do substrato e a localização geográfica foi um fator influente apenas para as amostras de material sintético e para as vértebras de baleia.

**Palavras-chave:** Biofilme. Oceano Atlântico. Mar profundo.

## Abstract

PERES, F. V. **Diversity and Connectivity of Bacterial Communities in Synthetic and Organic Substrates in the Deep Southwest Atlantic**, 2016. 95 p. Master Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The marine environment occupies about 70% of the planet's surface and is responsible for the largest potentially inhabitable regions on Earth. Organisms living in these regions find limitations on food availability and exploit sporadic organic enrichments such as: wood plots and animal carcasses that sink to the ocean floor, constituting carbon sources locally and temporarily restricted. Studying microbial ecology in these locally active habitats is of great importance for a better understanding of microbial diversity, biogeochemical cycles and nutrient regeneration. The objective of this work was to describe the diversity of bacterial communities associated with synthetic plots and biofilms associated with organic plots (whale vertebrae and wood blocks) at three sites of Espírito Santo, Rio de Janeiro and São Paulo, in isobaths of 3,300 m depth, evaluating the influence of substrates and geographic location under these communities. Molecular ecology methods based on DNA extraction and amplification of the 16S rRNA gene were used. The samples were sequenced on the Illumina Miseq platform and bioinformatic analysis was performed by the software QIIME. The dominant classes in the synthetic substrates were Alphaproteobacteria, Flavobacteriia and Gammaproteobacteria. In the wood biofilm samples, we found the classes Alphaproteobacteria, Flavobacteriia and Epsilonproteobacteria as dominant. In the biofilms of the vertebrae the most abundant classes were Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria and Bacteroidia. The composition of the bacterial communities was strongly influenced by the composition of the substrate and the geographic location was an influential factor only for the samples of synthetic material and for the whale vertebrae.

**Keywords:** Biofilm. Atlantic Ocean. Deep-sea.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Tecnologia Illumina .....                                                           | 32 |
| <b>Figura 2</b> - Mapa batimétrico da região de estudo .....                                          | 35 |
| <b>Figura 3</b> - <i>Lander</i> .....                                                                 | 36 |
| <b>Figura 4</b> - Resgate dos <i>landers</i> contendo os substratos sintéticos e orgânicos .....      | 37 |
| <b>Figura 5</b> - Vértex de baleia, blocos de madeira e carpetes sintéticos .....                     | 39 |
| <b>Figura 6</b> - Amostras de DNA extraídas dos biofilmes de vértebras de baleia .....                | 40 |
| <b>Figura 7</b> - Índice de riqueza Chao1 e Ace .....                                                 | 45 |
| <b>Figura 8</b> - Índice de diversidade Simpson e Shannon .....                                       | 47 |
| <b>Figura 9</b> - Gráfico de setores com os treze filos mais abundantes .....                         | 52 |
| <b>Figura 10</b> - Gráfico de barras evidenciando a abundância dos filos mais representativos .....   | 55 |
| <b>Figura 11</b> - Gráfico de barras evidenciando a abundância das classes mais representativas ..... | 55 |
| <b>Figura 12</b> - Gráfico de correlação representando as OTUs compartilhadas .....                   | 61 |
| <b>Figura 13</b> - Análise de Componente Principal (PCoA) .....                                       | 64 |
| <b>Figura 14</b> - Dendrograma .....                                                                  | 66 |
| <b>Figura 15</b> - Gráficos de setores evidenciando as cores dos biofilmes encontrados .....          | 68 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Informações das amostras coletadas nos substratos sintéticos e orgânicos.....     | 38 |
| <b>Tabela 2</b> - Informações do sequenciamento do gene RNAr 16S por Illumina Miseq. ....           | 43 |
| <b>Tabela 3</b> - Valores de riqueza de grupos raros, abundantes e totais.....                      | 46 |
| <b>Tabela 4</b> - Índice de riqueza (Chao1 e Ace) e diversidade (Shannon e Simpson)....             | 48 |
| <b>Tabela 5</b> - Análise de Similaridade (ANOSIM) entre os substratos e os sítios de fundeio. .... | 62 |
| <b>Tabela 6</b> - Análise de Similaridade (ANOSIM) entre os sítios de fundeio.....                  | 67 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|               |                                                                       |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <b>AT</b>     | Água Tropical                                                         |
| <b>ACAS</b>   | Água Central do Atlântico Sul                                         |
| <b>ACI</b>    | Água Circumpolar Inferior                                             |
| <b>ACS</b>    | Água Circumpolar Superior                                             |
| <b>AIA</b>    | Água Intermediária Antártica                                          |
| <b>APAN</b>   | Água Profunda do Atlântico Norte                                      |
| <b>ATP</b>    | <i>AdenosinTriphosphate</i> (Adenosin Trifosfato)                     |
| <b>CB</b>     | Corrente do Brasil                                                    |
| <b>ddNTPs</b> | Dideoxynucleotídeos                                                   |
| <b>DGGE</b>   | Gel de Eletroforese de Gradiente Desnaturante                         |
| <b>DNA</b>    | <i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)             |
| <b>NGS</b>    | Sequenciamento de Nova Geração                                        |
| <b>NPo</b>    | Navio Polar Oceanográfico                                             |
| <b>OTU</b>    | <i>Operational Taxonomic Unit</i> (Unidade Operacional Taxonômica)    |
| <b>pb</b>     | Pares de Base                                                         |
| <b>PCoA</b>   | <i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componente Principal) |
| <b>PCR</b>    | <i>Polymerase Chain Reation</i> (Reação em Cadeia Polimerase)         |
| <b>POC</b>    | <i>Particle Organic Carbon</i>                                        |
| <b>QIIME</b>  | <i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>                   |
| <b>RNA</b>    | <i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)                          |
| <b>RNAr</b>   | RNA ribossomal                                                        |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....                                                                                                                     | <b>14</b> |
| <b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....                                                                                                                 | <b>16</b> |
| 2.1 Objetivos Específicos .....                                                                                                               | 16        |
| <b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....                                                                                                          | <b>16</b> |
| 3.1 Quimiossíntese nos Oceanos.....                                                                                                           | 16        |
| 3.2 Carcaça de baleia como fonte de carbono orgânico .....                                                                                    | 18        |
| 3.3 Madeira como fonte de carbono orgânico .....                                                                                              | 21        |
| 3.4 Biofilmes.....                                                                                                                            | 24        |
| 3.5 Análise da biodiversidade bacteriana através da técnica de sequenciamento do gene rRNA 16S .....                                          | 27        |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                                                                                                            | <b>33</b> |
| 4.1 Área de Estudo.....                                                                                                                       | 33        |
| 4.2 Amostragem .....                                                                                                                          | 34        |
| 4.3 Análise Molecular da diversidade bacteriana .....                                                                                         | 39        |
| 4.3.1 <i>Extração de DNA Total</i> .....                                                                                                      | 39        |
| 4.3.2 <i>Purificação do DNA</i> .....                                                                                                         | 40        |
| 4.3.3 <i>Sequenciamento do gene RNAr 16S por Illumina Miseq</i> .....                                                                         | 40        |
| 4.3.4 <i>Análise das sequências obtidas com o sequenciamento do gene rRNA 16S</i> .....                                                       | 41        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                                                                                                         | <b>43</b> |
| 5.1 Análise do sequenciamento do gene RNAr 16S por Illumina Miseq .....                                                                       | 43        |
| 5.2 Índices de riqueza e diversidade das comunidades bacterianas dos substratos sintéticos e biofilmes dos substratos orgânicos.....          | 45        |
| 5.3 Os filos mais abundantes nas parcelas sintéticas e orgânicas.....                                                                         | 49        |
| 5.4 Composição taxonômica das comunidades bacterianas em cada substrato .....                                                                 | 52        |
| 5.5 Influência da localização geográfica sob as comunidades bacterianas dos substratos sintéticos e os biofilmes das parcelas orgânicas ..... | 62        |
| <b>6 CONCLUSÕES</b> .....                                                                                                                     | <b>69</b> |
| <b>REFERÊNCIAS*</b> .....                                                                                                                     | <b>70</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O ambiente marinho ocupa cerca de 70% da superfície do planeta, sendo responsável pelas maiores regiões potencialmente habitáveis da Terra (ORCUTT et al., 2011). Aproximadamente 97% da água da biosfera está localizada nos oceanos e a maior parte dessa massa de água está abaixo da zona fótica (GAGE; TYLER 1991; WHITMAN et al., 1998). Estima-se que nessas áreas há cerca de  $6.5 \times 10^{28}$  células procarióticas por  $\text{ml}^{-1}$ , enquanto na superfície há cerca de  $10^5$ , representando 55% de todos os procariontes encontrados em *habitats* aquáticos (WHITMAN et al., 1998).

O conhecimento sobre a vida microbiana em mar profundo aumentou nas últimas décadas devido a descobertas de fontes hidrotermais, carcaças de baleia e exsudações frias (ORCUTT et al., 2011), revelando importantes informações sobre o papel desses microrganismos em grandes profundidades (CORLISS; DYMOND, 1979; JANNASCH; WIRSEN, 1979; PAULL et al., 1984; SMITH et al., 1989). Estudos recentes apontaram que os microrganismos dominam esses ecossistemas oceânicos sem luz e influenciam a Terra como um todo (ORCUTT et al., 2011), sendo responsáveis pelo equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos globais (ORCUTT et al., 2011).

Disponibilidade de nutrientes é outra limitação encontrada por organismos que vivem em grandes profundidades (GAGE; TYLER, 1991), dependendo, muitas vezes, da produção primária fotossintética de superfície que é explorada por outros organismos ao longo da coluna de água, chegando apenas 1-20% de matéria orgânica em regiões abaixo de 1.000 metros (SMITH, 2012). Estes organismos podem modificar seu metabolismo, comportamento, taxa de crescimento e reprodução a fim de aproveitar enriquecimentos orgânicos esporádicos, como carcaças de animais, restos de plantas e madeira (HOYOUX et al., 2009). Esses enriquecimentos constituem fontes de carbono localmente e temporalmente restritos, que são rapidamente localizados e consumidos (GAUDRON et al., 2010; TURNER, 1973) formando *hotspots* de diversidade (BACO; SMITH, 2003) em um ambiente oligotrófico (JORGENSEN et al., 2007).

Embora os pesquisadores tenham especulado por longos períodos o destino de resíduos orgânicos, tais como baleias mortas (SMITH; BACO, 2003), foi apenas

recentemente que experimentos desvendaram a verdadeira natureza de tais ambientes. Carcaças de baleia e parcelas de madeira duram um longo período no assoalho oceânico profundo (SMITH; BACO, 2003). O enriquecimento orgânico representado por esses substratos leva ao aumento da atividade heterotrófica microbiana, contribuindo para a formação de nichos anaeróbios. A presença de sulfato, hidrogênio e substratos orgânicos resultantes da degradação da matéria orgânica promove o crescimento de grupos microbianos sulfetogênicos, como as bactérias redutoras de sulfato (SMITH; BACO, 2003).

Essa atividade microbiana estimula e sustenta o crescimento de microorganismos quimiolitotróficos, como as bactérias e arqueias oxidadoras de sulfeto, enxofre e hidrogênio e as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, caracterizando assim a produção quimiossintética (GOFFREDI et al., 2008). Estas ilhas orgânicas atraem ainda centenas de espécies de invertebrados tipicamente encontrados em exsudações frias e fontes hidrotermais e, portanto, podem atuar como “pedras de dispersão” para diversas espécies quimioautotróficas através das profundezas (SMITH; BACO, 2003).

Estudos realizados em regiões profundas do Pacífico Norte mostram que carcaças de baleia podem abrigar comunidades biológicas extraordinárias, com níveis notáveis de diversidade e novidades evolutivas (SMITH; BACO, 2003). Ossos de baleia, em particular, abrigam comunidades quimiossintéticas que podem ter desempenhado um papel importante na evolução e dispersão da fauna de fontes hidrotermais, além de ser o lar de uma biota com histórias e estratégias de vida especializadas (SMITH et al., 2014)

Apesar disto, assembleias de ossos de baleia de mar profundo foram, até recentemente, sistematicamente amostradas apenas em uma única bacia oceânica, o Pacífico Norte. Como consequência disto, os padrões globais e regionais de biodiversidade, as relações filogenéticas e biogeográficas e os impactos regionais da atividade humana (e.g. caça às baleias e desmatamento) nas biotas de carcaças e parcelas de madeira permanecem amplamente inexploradas.

Desta forma, o presente trabalho desenvolvido no âmbito do projeto “Biodiversidade e conectividade de comunidades bênticas em substratos orgânicos (ossos de baleia e parcelas de madeira) no Atlântico Sudoeste profundo” (BIOSUOR) apoiado pela FAPESP sob coordenação do professor Paulo Sumida do



Instituto Oceanográfico da USP (IOUSP) com participação do Laboratório de Ecologia de Microrganismos do IOUSP, apresentou os objetivos a seguir.

## **2 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste estudo foi descrever a estrutura das comunidades bacterianas em substratos sintéticos e em biofilmes de parcelas orgânicas (vértebra de baleia e parcela de madeira), em três sítios de fundeio localizados a 3.300 metros de profundidade na margem continental brasileira.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- I) Qual a diversidade bacteriana nos substratos fundeados?
- II) Há diferença na composição taxonômica das comunidades nos diferentes substrato?
- III) Há diferença na composição taxonômica das comunidades entre os sítios de fundeio?
- IV) As comunidades bacterianas diferem entre os biofilmes do mesmo substrato?

## **3 REVISÃO DA LITERATURA**

### **3.1 Quimiossíntese nos Oceanos**

A quimiossíntese foi observada pela primeira vez no fundo do mar e é o processo no qual ocorre produção de matéria orgânica a partir de fontes inorgânicas de energia (VAN DOVER, 2000). Assim como a fotossíntese, a quimiossíntese necessita de três elementos fundamentais: uma fonte de carbono, um doador de elétron e uma fonte de energia (VAN DOVER, 2000).

A quimiossíntese pode ser aeróbia, utilizando  $O_2$  como acceptor final de elétrons ou anaeróbia, utilizando  $NO_3^-$ ,  $CO_2$ , S e  $SO_4^{2-}$  como aceptores finais (VAN DOVER, 2000). Organismos quimiossintéticos aeróbios geram maior potencial de energia e produzem maior quantidade de ATP do que os organismos anaeróbios, por essa razão são as comunidades dominantes em mar profundo (JANNASCH, 1985; MCCOLLOM; SHOCK, 1997). Na fotossíntese e na quimiossíntese aeróbica o

ciclo de Calvin-Benson é utilizado na conversão de CO<sub>2</sub> em carbono orgânico (VAN DOVER, 2000).

Grande parte dos organismos que vivem na superfície da Terra depende da energia captada do sol, sejam como produtores primários ou consumidores heterotróficos (SMITH, 2002). Acreditava-se que regiões de mar profundo, por não haver penetração de luz solar, eram ambientes fisicamente uniformes e com baixa densidade populacional (FUHRMAN et al., 1992; SOGIN et al., 2006). Muitos organismos que vivem na coluna de água e em grandes profundidades dependem da produção primária da superfície (SMITH, 2012). Essa matéria orgânica produzida é consumida ao longo da coluna de água chegando apenas 1-20% em regiões abaixo de 1.000 metros, região limite para a entrada de luz (SMITH, 2012).

Anteriormente a proposta de existência da quimiossíntese, em 1887 por Winogradsky, os mecanismos de produção de carbono orgânico sem a presença de luz permaneciam desconhecidos (SMITH, 2012). Porém, mesmo após esta descoberta, a quimiossíntese foi considerada insignificante como mecanismos de obtenção de energia (VAN DOVER, 2000).

Apenas em 1977 a primeira fonte hidrotermal foi descoberta revelando um oásis (VAN DOVER et al. 2002) em uma região tida como pouco habitada (SMITH, 2015). Porém, pensava-se que essas comunidades quimiossintéticas de mar profundo estavam restritas a essas estruturas geológicas, na qual concentravam-se compostos químicos reduzidos e oxidados (SMITH, 1992). Nesses locais, bactérias oxidam compostos reduzidos e geram compostos orgânicos que são utilizados como fonte de carbono pela fauna dessas regiões (SMITH, 1992).

As estruturas geológicas de exsudações ocorrem nas margens continentais e nas dorsais meso-oceânicas, o que sugeria que o restante do assoalho marinho não poderia suportar essas comunidades quimiossintéticas e que o fundo oceânico seria um grande “*deserto biológico*” (SMITH, 1992, p 74). No entanto, grandes quantidades de matéria orgânica também podem produzir quantidades substanciais de sulfeto (SMITH, 1992). Em 1987, quando a primeira carcaça de baleia foi encontrada, essa visão de deserto biológico mudou e a carcaça ganhou o interesse de diversos pesquisadores, que observaram tapetes microbianos densos, semelhantes aos já encontrados em fontes hidrotermais (SMITH, 1992).

Microrganismos quimiossintéticos desenvolveram relações simbióticas altamente produtivas com diversos invertebrados (VAN DOVER, 2000). Em regiões como fontes hidrotermais ou exsudações frias, essa relação proporcionou uma enorme vantagem para os microrganismos, principalmente aeróbios (DUBILIER et al., 2008). Considerando a dimensão desses microrganismos é clara a dificuldade dessas comunidades de se estabelecerem no limite entre o fluído anóxico, rico em sulfeto ou metano e a água do mar, contendo  $O_2$  (DUBILIER et al., 2008). Já os animais aos quais esses microrganismos estão associados conseguem facilmente atravessar esse gradiente químico, devido ao seu tamanho e motilidade (DUBILIER et al., 2008). Assim, esses microrganismos simbiontes dispõem de um ambiente estável, com fluxo contínuo de  $O_2$ , metano e sulfeto enquanto fornecem carbono orgânico para seu hospedeiro (DUBILIER et al., 2008).

Tais processos colocaram em evidência a capacidade dos microrganismos quimiossintéticos de sustentar grandes comunidades através da produção primária nessas regiões (DUBILIER et al., 2008), principalmente em ambientes como fontes hidrotermais, exsudações frias e depósitos de matéria orgânica como carcaças de baleia e parcelas de madeira (SMITH et al., 1989; SMITH, 2012). A descoberta da quimiossíntese e das fontes hidrotermais, possivelmente, foram as descobertas biológicas mais significativas do final do século XX (SMITH, 2012).

### **3.2 Carcaça de baleia como fonte de carbono orgânico**

Em 1854, WOODWARD sugeriu pela primeira vez na literatura científica que carcaças de baleias, após chegarem ao assoalho marinho, atuam como fonte de alimento e abrigo para diversos animais. O destino dessas carcaças voltou a ser especulado em 1934 por KROGH, porém, apenas em 1987, na Bacia de Santa Catalina na Califórnia, uma baleia em decomposição a 1.240 metros de profundidade foi descoberta durante uma expedição liderada pelo pesquisador da Universidade do Havaí, Craig Smith (SMITH et al., 1989).

Inesperadamente, a fauna encontrada nessas carcaças assemelhava-se às comunidades já descritas em fontes hidrotermais e exsudações frias (CORLISS; DYMOND, 1979). Essa descoberta incentivou as primeiras introduções artificiais de carcaças de baleias na Califórnia, a fim de verificar a ecologia e filogenia da fauna associada (SMITH, 1992; SMITH et al., 2002).

No século XIX e XX a intensa caça as baleias provocou uma variação significativa na frequência de depósito das carcaças de baleia no assoalho marinho (SMITH, 2006). Essa variação pode ter influenciado a distribuição e disponibilidade desses habitats, alterando a diversidade e biogeografia das comunidades especializadas e levando à extinção de algumas espécies, podendo ser a primeira extinção antropogênica em mar profundo (BUTMAN et al., 1995; SMITH, 2006).

Cetáceos que sofrem morte natural afundam até o assoalho marinho fornecendo uma grande quantidade de matéria orgânica, servindo também como habitat para vários organismos (SMITH, 2006). Apesar de compreender apenas 0,1% do fluxo total de partículas de carbono orgânico (POC) de fundo, localmente, essa queda representa o equivalente a 2.000 anos de fluxo POC (SMITH, 2006). Durante a decomposição dessas carcaças, os sedimentos abaixo e em torno ficam progressivamente enriquecidos com compostos orgânicos (SMITH et al., 1998), criando um ambiente anóxico devido ao consumo de oxigênio pelas comunidades microbianas e favorecendo a colonização por microrganismos anaeróbios (e.g. metanogênicas e redutores de sulfato) (GOFFREDI et al., 2008).

A importância da presença de microrganismos foi reconhecida no início das pesquisas com carcaças (ALLISON et al., 1991; DEMING et al., 1997; SMITH, 1992), porém, apenas com os avanços das técnicas moleculares esses estudos tornaram-se mais detalhados (SMITH et al., 2015). A origem dos microrganismos envolvidos na degradação da carcaça de baleia ainda é discutida, podendo ter origem no sedimento, na fauna oportunista, na coluna de água e na própria microbiota intestinal da baleia (SMITH et al., 2015).

Durante o processo de sucessão ecológica nas carcaças de baleia, os microrganismos anaeróbicos como: arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato, liberam uma grande quantidade de metano e sulfeto, respectivamente, no sedimento em torno da carcaça (GOFFREDI et al., 2008; NAGANUMA et al., 1996; SMITH et al., 2014; TREUDE et al., 2009). A atividade de redução de sulfato bacteriano, utilizando compostos orgânicos da carcaça, persiste por um longo período (DEMING et al., 1997). TREUDE et al (2009) observou que após sete anos da introdução artificial de uma carcaça de baleia, as bactérias haviam penetrado apenas alguns milímetros em uma vértebra de 23 cm. de diâmetro. O centro de uma

vértebra de baleia de 16 cm.de diâmetro ainda estava intacto após 50 anos afundado, porém, o entorno da vértebra apresentou alta densidade microbiana (DEMING et al., 1997; SCHULLER et al., 2004).

A mesma relação foi observada em fósseis de baleias, onde há evidências de que a atividade microbiana inicia-se da periferia para o centro dos ossos (SHAPIRO; SPANGLER, 2009). A colonização microbiana fica limitada pela disponibilidade de aceptores de elétrons dispersos na água do mar (SMITH et al., 2015) e pela presença dos potenciais doadores de elétrons em torno da carcaça, como hidrogênio e metilamina (GOFFREDI; ORPHAN,2010).

A superfície do sedimento e dos ossos de baleia pode ficar coberta de microrganismos quimiossintéticos de vida livre, formadores de biofilme e endossimbiontes de bivalves e vermes tubulares (BACO et al., 1999; BENNETT et al., 1994; FELDMAN et al., 1998). Grande parte dos invertebrados que colonizam carcaças possui o sistema digestivo degenerado e dependem de uma relação de simbiose com microrganismos que fornecem açúcares e aminoácidos (BACO et al., 1999).Estes animais retiram do meio doadores de elétrons ( $H_2S$ ,  $H_2$ ,  $Fe^{2+}$ ), que podem ser liberados por bactérias anaeróbias durante a decomposição do lipídio, aceptores de elétrons ( $O_2$ ), carbono inorgânico ( $CO_2$ ) e os encaminham para seu interior, onde estão alojadas os microrganismos endossimbiontes (SMITH, 1992; SMITH et al., 2015).

Foi determinado que comunidades que habitam carcaças de baleias passam por quatro estágios de sucessão: o primeiro estágio pode durar até quatro meses, dependendo do tamanho da carcaça e é caracterizado pela fase de limpeza, composta principalmente por peixes e crustáceos que removem mais de 90% do tecido mole (BACO; SMITH, 2003).

O segundo estágio é a fase de enriquecimento, composta principalmente por poliquetas e crustáceos. Esta fase pode durar até dois anos, pois as baixas temperaturas do fundo do mar retardam a decomposição da matéria orgânica. Este estágio é caracterizado pelo enriquecimento orgânico do sedimento em torno da carcaça e a colonização dos ossos é composta principalmente por invertebrados (BACO; SMITH, 2003).

O terceiro estágio é a fase sulfídica, caracterizada pela decomposição de lipídios dos ossos (cerca de 60% do peso úmido) (SCHULLER et al., 2004; SMITH;

BACO, 2003) e redução de sulfato da água do mar (SMITH; BACO, 2003). É dominado por invertebrados dependentes de sulfeto e por biofilmes microbianos, que podem ser sustentados por décadas (NAGANUMA et al., 1996; SMITH; BACO, 2003). O quarto estágio é a fase de recife, onde animais de profundidade utilizam a carcaça como substrato e como abrigo (BACO; SMITH, 2003).

Com base na quantidade de carcaças de baleias que foram descobertas em explorações no fundo do mar, afirma-se que estas ocorram com relativa frequência, principalmente ao longo dos corredores de migração desses animais (SMITH et al., 1989). Carcaças de baleias promovem o enriquecimento orgânico do assoalho marinho e representam um *habitat* único, sendo um dos locais com maior riqueza de espécies em grandes profundidades (BACO; SMITH, 2003).

### **3.3 Madeira como fonte de carbono orgânico**

Celulose, hemicelulose e lignina são os constituintes básicos da madeira, sendo a celulose o material orgânico mais abundante da Terra (FLÔRENCIO et al., 2012). Dentre esses componentes, a lignina dificilmente é degradada, enquanto que a hemicelulose é mais facilmente degradada que a celulose (CLAUSSEN, 1996). A celulose é o constituinte mais abundante da parede celular dos vegetais (LYND et al., 2002), desde os mais simples aos mais complexos (RABELO, 2007). É um homopolissacarídeo composto por unidades consecutivas de  $\beta$ -D-glicose, unidas por ligações  $\beta$  1-4 (ARANTES, 2010).

Essa uniformidade química provoca a cristalização das moléculas de celulose através de pontes de hidrogênio intra e intermoleculares (SCHWARZ, 2001). Tal conformação é responsável por tornar a celulose insolúvel em uma grande variedade de solventes (LYND, 2004), além de dificultar sua hidrólise (CLARKE, 1997). Uma enzima celulítica não é capaz de degradar essa molécula, necessitando assim, de uma mistura enzimática de diferentes celulasas derivadas de diferentes organismos (BOER et al., 2005). Compreender a degradação desses compostos é de grande importância, pois são notáveis reservatórios de energia e carbono (LYND et al., 2002).

Parcelas de madeira podem ser transportadas pelos rios chegando até os oceanos, sendo observadas desde profundidades mais rasas até profundidades abissais, ocorrendo mais comumente em costas arborizadas e em rotas de

navegação (WOLFF, 1979). Em mar profundo, essa matéria orgânica representa uma importante fonte de carbono (FAGERVOLD et al., 2012). Quando degradada por bactérias redutoras de sulfato, em condições anaeróbicas, libera no meio sulfeto de hidrogênio que é aproveitado por outras bactérias quimiolitotróficas, que podem ser consumidas por alguns invertebrados (FAGERVOLD et al., 2012; PALACIOS et al., 2009).

Essas parcelas de madeira que chegam até o assoalho marinho tem chamado atenção por, provavelmente, terem servido de etapas evolutivas de dispersão para táxons que atualmente vivem em exsudações frias e fontes hidrotermais, sugerindo que estes organismos se instalaram primeiramente em madeiras afundadas e carcaças de animais e só mais tarde em exsudações frias e fontes hidrotermais (DISTEL et al., 2000; GLOVER et al., 2005). Estudos moleculares em ecossistemas quimiossintéticos demonstraram que, de fato, parte da fauna encontrada em carcaças de baleias, parcelas de madeira, fontes hidrotermais e exsudações frias compartilharam suas histórias evolutivas (BACO et al., 1999; GLOVER et al., 2005; LORION et al., 2009).

Os primeiros trabalhos sobre bactérias associadas à madeira submersa em água do mar foram realizados antes do advento da era da biologia molecular e tiveram como foco apenas sua ação física sobre a madeira (JURGENS et al., 2003). Em 2008, LANDY et al utilizaram bibliotecas de clones de RNA ribossomal e DGGE (Gel de Eletroforese de Gradiente Desnaturante) para caracterizar bactérias de vida livre presentes em objetos de madeira que estavam submersos e encontraram a classe Bacteroidia e o gênero *Pseudomonas* como predominantes nas amostras.

Palacios et al (2009), utilizando métodos moleculares de *fingerprinting*, encontraram semelhanças nas comunidades microbianas afundadas em profundidades diferentes e em locais distantes geograficamente, porém, a comunidade microbiana mudou de acordo com o tempo de decomposição da madeira, o que também foi observado por FAGERVOLD et al (2012), em que madeiras que foram imersas por um curto período de tempo apresentavam principalmente comunidades ligadas a degradação da celulose, celobiose e fermentação de açúcares, enquanto as que ficaram submersas por um longo período apresentavam grupos de bactérias redutoras de sulfato e arqueias metanogênicas.

Microrganismos que excretam celulases exercem um importante papel na natureza, participando da ciclagem do carbono (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004) e disponibilizando nutrientes para outros organismos (JEFFREY et al., 2007). No ambiente terrestre, fungos responsáveis pela podridão parda (basidiomicetos) são os principais responsáveis pela degradação da madeira, porém, no ambiente marinho, sob baixas concentrações de oxigênio, comparado com superfície terrestre, a deterioração da madeira ocorre de forma mais lenta e os principais organismos degradadores são bactérias e fungos associados a podridão mole (ascomicetos) (DANIEL; NILSSON, 1997). Bactérias hidrolíticas atacam a celulose convertendo-a a celobiose e glicose, o excesso desses compostos inibe as celulases, porém, estes são rapidamente consumidos por bactérias fermentadoras e arqueias gerando ácidos orgânicos. (BAYER et al., 2013).

No ambiente marinho, as altas concentrações de sulfato são aproveitadas pelas bactérias redutoras de sulfato, que irão competir com as arqueias metanogênicas pelo  $H_2$  (LESCHINE, 1995), aumentando a concentração de  $H_2S$  e metano em torno da madeira. Microrganismos quimiolitotróficos podem aproveitar o  $H_2S$  e o metano como fonte de energia, assim como foi observado em fontes hidrotermais e exsudações frias (JORGENSEN; BOETIUS, 2007), em bactérias simbiontes de bivalves (LORION et al., 2009) e em grandes depósitos de matéria orgânica como parcelas de madeira e carcaças de baleia (JORGENSEN; BOETIUS, 2007; GOFFREDI; ORPHAN, 2010).

Os *habitats* formados por essas parcelas de madeira têm potencial para abrigar uma alta diversidade, pois podem sustentar comunidades heterotróficas que utilizarão componentes da madeira e comunidades quimiossintéticas que utilizarão compostos secundários resultantes da degradação (FAGERVOLD et al., 2012). Essa fonte de carbono é de grande importância para a biodiversidade e evolução (FAGERVOLD et al., 2012) da fauna de mar profundo, representando novos nichos ecológicos e permitindo a colonização de comunidades especializadas (ROMANO et al., 2013). Apesar de sua importância, os processos de degradação da madeira e a colonização por microrganismos em ambiente marinho não são totalmente compreendidos, principalmente em mar profundo onde a logística e a acessibilidade torna-se um desafio (FAGERVOLD et al., 2012).



### 3.4 Biofilmes

Biofilmes são comunidades microbianas envolvidas por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) auto-produzidas (COSTERNON et al., 1999). Podem ser constituídos por uma única espécie microbiana ou várias espécies, crescendo em superfícies bióticas ou abióticas (BOARI, 2008; CARPENTIER; CERF, 1993; COSTERNON et al., 1995). É composto de 80-85% de EPS, principalmente de polissacarídeos (homo e heteropolissacarídeos), proteínas e DNA extracelular, enquanto os microrganismos constituem uma pequena porcentagem de 15-20% da massa total (KOKARE et al., 2009).

Os biofilmes são considerados os ecossistemas mais antigos da Terra (NOFFKE et al., 2006; TICE; LOWE, 2004), estando presente a mais de 3 bilhões de anos (SCHOPF, 2006). No ponto de vista evolutivo, é provável que essa estrutura proporcionasse condições para que esses microrganismos sobrevivessem a situações adversas da Terra primitiva (BATY et al., 2000). São altamente resilientes e ótimos modelos de comunicação microbiana, interação entre microrganismos e minerais (dissolução de carbonatos, silicatos, óxidos e precipitações), biogeoquímica de elementos cíclicos (carbono, nitrogênio e enxofre) e são excelentes objetos de estudos em astrobiologia (TOPORSKY et al., 2003).

Há aproximadamente 300 anos atrás, Anthony Van Leeuwenhoek fez a primeira observação de biofilmes utilizando um microscópio simples e material raspado de seus próprios dentes, notando um acúmulo de pequenas formas de vida em movimento, que inicialmente foram chamados de *animalcules*, pois, pensava-se que fossem pequenos animais microscópicos (DUFOUR et al., 2012).

Dois séculos após a observação de Leeuwenhoek, o bacteriologista Arthur Henrici notou o crescimento de uma fina camada de bactérias com diferentes morfologias na parede de um aquário em seu laboratório (DUFOUR et al., 2012) e em 1933, Henrici relatou "*É evidente que a maior parte das bactérias da água não estão como organismos livres e flutuantes, mas crescendo em superfícies submersas; eles são do bentos em vez do plâncton*" (HENRICI, 1933, p 281).

Em 1943, Claude Zobell publicou a primeira descrição detalhada de biofilmes de bactérias marinhas que se aderiam em cascos de navios (CAIXETA, 2008; LUCCHESI, 2006). Neste estudo, Zobell avaliava a diferença de adesão em diferentes superfícies, como: plásticos, metais e vidros (CAIXETA, 2008; LUCCHESI,

2006). Até então, acreditava-se que essas estruturas fossem comunidades passivas de células presas a uma superfície e apenas com os avanços das técnicas moleculares e de microscopia eletrônica (DOYLE, 2001) ficou claro que os biofilmes representam sistemas biológicos complexos e dinâmicos (HALL-STOODLEY et al., 2004).

Em ambientes aquáticos, os nutrientes tendem a se concentrar em superfícies sólidas, favorecendo a formação de biofilmes nesses locais (ZOBELL, 1937), porém, fatores ambientais, composição do substrato e as espécies de microrganismos presentes no local também influenciam na formação do biofilme (CARPENTIER; CERF, 1993). A superfície sólida a qual as células se aderem, atua como substrato de fixação e fonte de nutriente (COSTERTON et al., 1995).

A formação do biofilme caracteriza-se por três etapas, sendo a primeira a fixação das células microbianas a uma superfície biótica ou abiótica, onde previamente se encontra uma película composta de moléculas orgânicas, favorecendo a aderência dessas células (DONLAN, 2002). Essa aderência inicial é mediada pelas forças de Van der Waals, fracas e reversíveis, enquanto estruturas de superfície como fímbrias, flagelos, lipopolissacarídeos (LPS) e exopolissacarídeos são responsáveis pelas interações irreversíveis (DONLAN, 2002). O contato inicial pode ser realizado através de transporte mecânico ou por quimiotaxia (MARSHALL et al., 1971).

A segunda etapa caracteriza-se pelo desenvolvimento de micro-colônias oriundas da divisão das primeiras células aderidas à superfície, formando a primeira camada do biofilme (O'TOOLE et al., 2000). Após a formação de múltiplas camadas na superfície, inicia-se o terceiro estágio com a presença de macro-colônias e canais que ajudam na distribuição de nutrientes e moléculas de sinalização (O'TOOLE et al., 2000). Eventualmente, células individuais ou pequenos grupos soltam-se do biofilme e se dispersam para colonizar outras superfícies (O'TOOLE et al., 2000). Essa dispersão está associada a mudanças ambientais ou a limitação de nutrientes (O'TOOLE et al., 2000).

Através do processo chamado *quorum-sensing*, microrganismos de um biofilme comunicam-se utilizando auto-indutores que regulam a expressão de genes em resposta a flutuação na densidade da população e em situações que exigem que muitas células atuem em conjunto (NG; BASSLER, 2009). Em bactérias, são

reconhecidos dois tipos de sinalização *quorum-sensing*: comunicação intra-espécie, na qual bactérias Gram-negativas utilizam acil homoserinalactona (AHL) como sinalizador e bactérias Gram-positivas utilizam pequenos peptídeos na sinalização (DIGGLE et al., 2007).

Outra comunicação reconhecida é inter-espécie que utiliza um auto-indutor diéster borato furanosilo (AI-2), utilizado por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas sendo reconhecida como um sinalizador universal na comunicação inter-espécie (DIGGLE et al., 2007). Em alguns biofilmes, o *quorum-sensing* não possui conexão com a formação estrutural do biofilme, enquanto em outros casos há evidência de sua importância na fixação das células à superfície, no desenvolvimento, na maturação e dispersão de células (O'TOOLE et al., 2000)

Quando o biofilme é constituído de diversas espécies de organismos, o subproduto metabólico de um indivíduo pode ser aproveitado por outro, assim como a adesão de uma espécie pode favorecer a adesão de outras (COSTERTON et al., 1987; DUNNE, 2002; MARSH, 1995; WOLFAARDT et al., 1994). Porém, a competição por nutrientes e o acúmulo de subprodutos tóxicos podem limitar a diversidade de espécies dentro do biofilme (MARSH, 1995). Até mesmo biofilmes compostos por uma única espécie, possuem heterogeneidade fenotípica (O'TOOLE et al., 2000). A existência de gradientes de concentração de nutrientes, íons e oxigênio formam microambientes que favorecem essa diferenciação (O'TOOLE et al., 2000).

Microrganismos associados a um biofilme tendem a ser mais resistentes a fatores externos do que células livres (CARVALHO, 2007), pois o EPS pode conferir proteção contra biocidas, anticorpos, antibióticos, surfactantes, bacteriófagos, alteração no pH, choque osmótico, exposição a luz UV, dessecação e diferentes predadores (CARVALHO, 2007; COSTERTON et al., 1987), representando uma forma de sobrevivência em ambientes hostis (BEER, et al., 1994; CARVALHO, 2007).

Em ambientes considerados extremos também são encontrados diversos biofilmes, como em águas termais (35-60 °C), geleiras na Antártica, ambientes ácidos com elevado teor de metais, baixas concentrações de nutrientes e ambientes com diferentes níveis de umidade, desde desertos a florestas tropicais (CAMPOS et al., 2009; DOJANI et al., 2007). Segundo SCHNEIDER (2007), a superfície de aderência do biofilme deve conter quantidades adequadas de compostos orgânicos

para que haja a produção suficiente de exopolissacarídeo. Porém, se houver pouco carbono o biofilme será formado por células dispersas ou em pequenos grupos (SUTHERLAND, 2001).

Os microrganismos mais estudados na composição dos biofilmes são as bactérias, principalmente as Gram-negativas que são comumente associadas à formação de biofilmes, porém bactérias Gram-positivas também são encontradas nessas comunidades (LUCCHESI, 2006), assim como vírus, protozoários, fungos, algas e leveduras (LINDSAY; VON HOLY, 2006).

Embora os biofilmes tragam prejuízos para as indústrias e problemas de contaminação, aspectos positivos também devem ser levados em consideração, como a utilização na fabricação de etanol, remoção de compostos tóxicos no tratamento de águas residuais e derramamento de óleo na água do mar, relação simbiótica entre fixadoras de nitrogênio e leguminosas, ciclagem de nutrientes (RICO et al., 2011) e produção de vitaminas e aminoácidos pela microbiota humana (HANCOCK et al., 2010).

Apesar de sua importância, biofilmes de diversos locais ainda são pouco explorados, como mostrado nos trabalhos de KERR et al (2003) e Head et al. (2004) que tinham por objetivo avaliar o crescimento de biofilmes em instrumentos oceanográficos implantados em mar profundo e evidenciaram a necessidade de mais pesquisas nessa área. Grande parte dos estudos de microrganismos nessas regiões limita-se a organismos de vida livre (COSTERTON et al., 1987; MOESENEDER et al., 2001), porém a composição de bactérias de biofilmes em águas profundas pode ser tão complexa quanto comunidades de biofilmes em superfície (BELLOU et al., 2014).

### **3.5 Análise da biodiversidade bacteriana através da técnica de sequenciamento do gene rRNA 16S**

O sequenciamento genético consiste em uma série de processos bioquímicos com a finalidade de determinar a sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA realizado por técnicas manuais ou automatizadas (KOCH; ANDRADE, 2008).

Em 1977, Sanger e Coulson criaram o método de terminação de cadeia, denominado Sanger que superou o método de sequenciamento químico de Allan Maxam e Walter Gilbert, desenvolvido no mesmo ano e o método “*plus and minus*”

descrito por Sanger e Coulson dois anos antes (SCHUSTER, 2008). Este último método foi utilizado no sequenciamento do bacteriófago phi-X174, sendo o primeiro genoma totalmente sequenciado (SANGER et al., 1977).

O método de Sanger se destacou por gerar dados que eram mais facilmente interpretados e com redução do uso de produtos tóxicos e radioisótopos, sendo amplamente utilizado por aproximadamente três décadas (SCHUSTER, 2008).

Inicialmente os fragmentos gerados por Sanger eram pequenos (450 pb) e, após melhorias nesse sistema, os fragmentos atingiam ~850 pb, tornando-se o método padrão de sequenciamento (MEDINI et al., 2008). Consiste em uma técnica semiautomática, baseada em capilaridade e o DNA preparado pelo método *shotgun* (SHENDURE et al., 2008). Os fragmentos de DNA gerados aleatoriamente são clonados dentro de plasmídeos que são utilizados para transformar *Escherichia coli* (SHENDURE et al., 2008).

Em cada reação é escolhida apenas uma colônia de bactéria, dos quais os plasmídeos são isolados. A reação de sequenciamento é cíclica e o ciclo de extensão dos *primers* é interrompido pela incorporação de dideoxynucleotídeos marcados com fluorescência (ddNTPs). A reação ocorre sob a presença de ambos os nucleotídeos (marcados e não marcados) em concentrações controladas. As diferentes fitas de DNA são interrompidas em diferentes pontos da síntese, de acordo com a incorporação dos nucleotídeos terminadores (SHENDURE et al., 2008).

A sequencia final é determinada pela separação dos fragmentos de fita simples de diferentes tamanhos por eletroforese baseada em capilaridade (SHENDURE et al., 2008). No final do capilar, ocorre a excitação a laser das marcações fluorescentes, que fornece a leitura das bases de acordo com as quatro cores emitidas, gerando um gráfico contendo a intensidade das emissões de fluorescência em quatro canais, cada um representando uma base do DNA e os gráficos são traduzidos para sequências de DNA através de um software (SHENDURE et al., 2008).

Apesar da robustez nos resultados a necessidade do uso de bibliotecas de clones durante a preparação das amostras, erros e viés biológicos, baixa capacidade de geração de dados e a infraestrutura necessária tornavam este método caro e demorado (BÖCKER, 2004; BRASLAVSKY et al., 2003). METZKER (2005) estimou

que o sequenciamento de um genoma com bilhões de pares de base (mamíferos, por exemplo), levaria cerca de seis meses a um custo de 12 milhões de dólares.

No intuito de superar essas desvantagens, foram desenvolvidas novas tecnologias capazes de gerar grandes quantidades de dados com maior rapidez e menor custo por base sequenciada denominando-se sequenciamento de nova geração (NGS) (CHAISSON et al., 2004; MITRA et al., 2003; ROTHBERG; LEAMON, 2008).

Essa nova geração de sequenciadores trouxe grandes avanços, como a simplificação na preparação das amostras, não sendo mais necessária a construção de bibliotecas de clones. Além disso, reduziu o tempo para obtenção dos resultados. Entretanto, também trouxe desvantagens como a diminuição no tamanho dos fragmentos gerados (MARDIS, 2011).

Em 2005 a empresa *Roche* lançou o equipamento 454 GS20 utilizando o método de pirosequenciamento (LIU et al., 2012; MARGULIES et al., 2005; RONAGHI et al., 1998) e sendo a primeira a se destacar nesse mercado (ROTHBERG; LEAMON, 2008). A técnica baseia-se na elaboração de uma biblioteca de DNA contendo sequências flanqueadoras de adaptadores, eles imobilizam o DNA para o enriquecimento por meio de PCR de emulsão e as leituras são realizadas por meio de pirosequenciamento (ANDERSON; SCRIVVER, 2010).

O pirosequenciamento foi descrito inicialmente em 1996 por Ronaghi e colaboradores, este método libera uma molécula de pirofosfato a cada adição de um dNTP durante a extensão do DNA (RONAGHI et al., 1996). A sulfúrilase converte esta molécula em ATP que é utilizada pela luciferase para converter a luciferina em oxiluciferina que gera luz e é detectada por uma câmera CCD (*charge-coupled device*) acoplada ao sistema (RONAGHI et al., 1996). Esta plataforma, por gerar sequências longas (~700 pb) e foi amplamente utilizada, inclusive para sequenciamento de genomas eucarióticos (WICKER et al., 2009).

As tecnologias de sequenciamento continuaram evoluindo e em 2007 outras empresas lançaram suas plataformas como, Illumina com a plataforma Solexa GA e Applied Biosystems com a plataforma SOLiD (CARVALHO; SILVA 2010). As duas plataformas se diferem pelo mecanismo químico empregado, custo de operação, precisão de bases, volume de dados e tamanhos dos fragmentos gerados (CARVALHO; SILVA, 2010).

A tecnologia Illumina difere da plataforma SOLiD e 454, principalmente por não fazer uso da PCR em emulsão, onde os fragmentos são amplificados na própria superfície de clonagem (*flowcell*) (ANDERSON et al., 2010). A tecnologia Illumina se assemelha ao Sanger por fazer uso da enzima DNA polimerase para incorporar os nucleotídeos previamente marcados com fluoróforos durante o sequenciamento (ANSORGE, 2009). Uma grande diferença em relação ao Sanger é o pequeno comprimento da sequência gerada (30-400 pb) em contraposição ao Sanger que gera de 700 a 1.000 pb (CHAISSON et al., 2004). O pequeno tamanho é compensado pela alta cobertura de sequenciamento (30 vezes ou mais) por um preço menos oneroso (CHAISSON et al., 2004).

Porém, o pequeno tamanho dos *reads* mostrou-se uma limitação no estudo de comunidades microbianas e a empresa Illumina, a fim de resolver esse problema, lançou a plataforma *Miseq* que utiliza *reads* pareados de 250 a 300 pb gerando informações taxonômicas mais confiáveis (JEON et al., 2015).

Nesse tipo de sequenciamento, adaptadores ligados a região 5' são fixados na superfície de clonagem deixando a extremidade 3' exposta para o início do sequenciamento (Figura 1) (SHENDURE et al., 2008). O DNA da amostra também é ligado aos adaptadores por ambas às extremidades fazendo com que fiquem fixos ao suporte de sequenciamento por hibridização a um dos adaptadores já fixados (SHENDURE et al., 2008). No primeiro ciclo do sequenciamento, são fornecidos nucleotídeos não marcados para que haja a formação da fita complementar da fita molde, imobilizada no suporte (SHENDURE et al., 2008). A grande quantidade de adaptadores na superfície de clonagem facilita a hibridização do adaptador livre dos fragmentos de DNA imobilizados à sua sequência complementar fixa próximo ao clone inicial durante o processo de anelamento (SHENDURE et al., 2008).

Após esta etapa, o fragmento de DNA forma uma estrutura em “ponte” (*bridge* PCR) na superfície de clonagem onde é formado a fita complementar (SHENDURE et al., 2008). Durante a desnaturação, as fitas de DNA são separadas e linearizadas, cerca de 1.000 cópias são geradas de cada fragmento de DNA após 35 ciclos e esses fragmentos ficam próximos formando *clusters* de sequências (SHENDURE et al., 2008).

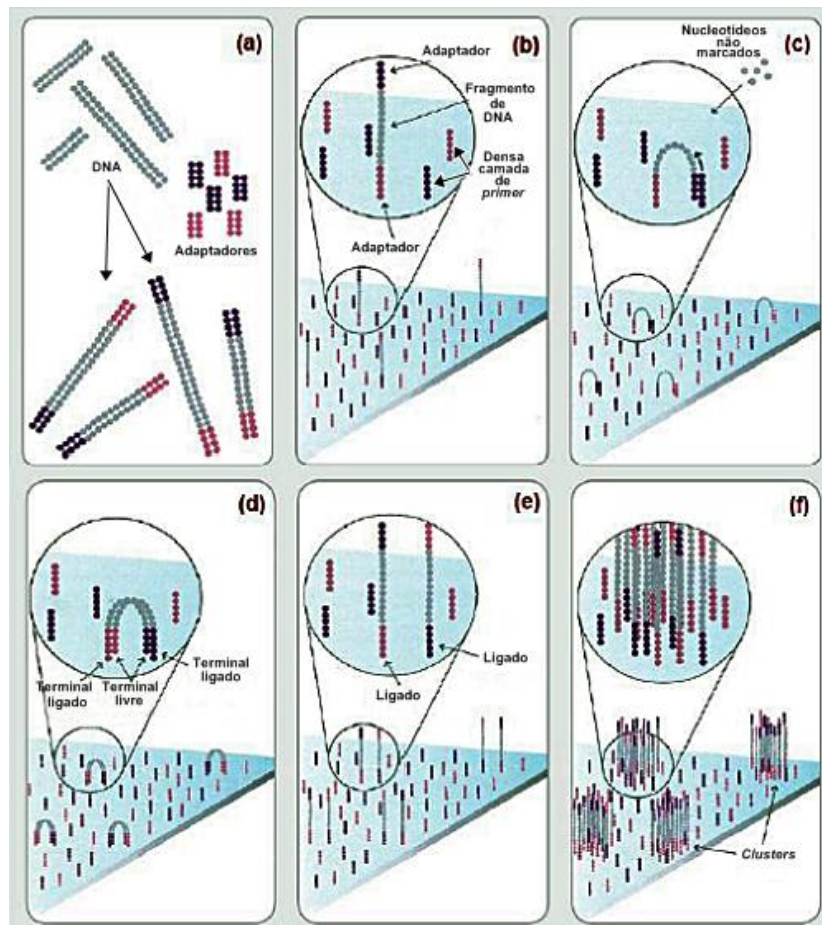
Posteriormente, são fornecidos nucleotídeos terminadores marcados para o sequenciamento dentro de cada *cluster* (SHENDURE et al., 2008). A detecção exata

é garantida graças à alta densidade de *clusters* de sequências que emite sinal de fluorescência gerado pela incorporação de cada nucleotídeo terminador (SHENDURE et al., 2008). Os *clusters* podem ser formados em até oito linhas independentes existentes em cada célula de sequenciamento e em uma única corrida na plataforma, oito bibliotecas genômicas podem ser sequenciadas (SHENDURE et al., 2008).

Após a leitura do sinal de fluorescência é realizada uma lavagem para retirada dos reagentes excedentes, da porção 3' bloqueado e do fluoróforo do nucleotídeo incorporado anteriormente (SHENDURE et al., 2008). As imagens sequenciais capturadas de cada ciclo são utilizadas para leitura das bases (SHENDURE et al., 2008). A maior fonte de erro provém da incorporação errônea de um nucleotídeo, remoção incompleta do terminador ou do marcador fluorescente (SHENDURE et al., 2008).

Atualmente, a empresa Illumina possui diversos equipamentos de sequenciamento, incluindo *Genome AnalyzerIix*, *HiSeq*, *MiSeq* e o *Next Seq*, além de equipamentos de *Arrays* como o *HiScanSQ* e o *iScan* (CARVALHO;SILVA, 2010).





**Figura 1** -Tecnologia Illumina. O DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores em ambas as extremidades (A). As moléculas de DNA fita simples são aderidas por afinidade ao suporte sólido onde se encontram os oligonucleotídeos complementares aos adaptadores (B). Nucleotídeos não marcados e enzimas polimerase são fornecidos para iniciar a amplificação de fase sólida em “ponte” (C). A enzima polimerase incorpora nucleotídeos formando fita dupla (D). Processo de desnaturação em que as fitas serão separadas e linearizadas (E). Milhões de *cluster* de fragmentos de DNA de fita simples são gerados em cada linha da *Flowcell*.  
 Fonte: Modificado de Illumina, Inc., 2007. p.2.

O sequenciamento de nova geração (NGS) trouxe melhorias significativas no campo da Ecologia Microbiana e tem sido amplamente utilizada para descrever o perfil de comunidades microbianas e distribuição taxonômica em diversas amostras ambientais através da amplificação do gene RNAr 16S (CAPORASO et al., 2012; TRINGE; HUGENHOLTZ, 2008; YERGEAU et al., 2012).

Diversos ambientes já foram estudados utilizando sequenciamento de nova geração, muitos desses considerados extremos, como fontes hidrotermais (KILIAS et al., 2013), áreas alcalinas (XIONG et al., 2012), ácidas (GARCÍA-MOYANO et al., 2012; Johnson, 2012), com baixa concentração de oxigênio (BRYANT et al., 2012; STEVENS; ULLOA, 2008) e altas concentrações de metais pesados (CHODAK et al., 2013; GOLEBIEWSKI et al., 2014).

As tecnologias de sequenciamento continuam evoluindo e Thudi et al (2012) ressaltaram que tecnologias como Roche/454, Illumina, ABI SOLiD™ são designadas como “sequenciamento de segunda geração” (SGS) e THOMPSON e MILOS (2011) levantam o termo “sequenciamento de terceira geração” (TGS) para designar tecnologias mais recentes como *Ion Personal Genome Machine* (PGM™), sequenciamento de molécula única, como *HeliScope™ Single Molecule Sequencer* ou o *Single-Molecule Real-Time (SMRT™) Sequencer Pac BioRS*. O “sequenciamento de terceira geração” trouxe, novamente, leituras longas (de dezenas de bases para dezenas de milhares de bases por leitura), alto rendimento, rapidez no processo (de dias para horas ou minutos) e a necessidade de quantidades mínimas de DNA (PAREEK et al., 2011).

Independente da tecnologia o campo do sequenciamento tem evoluído rapidamente, como já havia sido observado por SHENDURE e JI (2008), as tecnologias de sequenciamento de DNA se tornaram um “alvo-móvel” cuja evolução ocorre de forma muito rápida. Em 2011, ZHANG et al. compartilhou dessa observação ao afirmar que as tecnologias de NGS apresentavam mudanças e melhorias diárias. Entretanto, no mercado do sequenciamento, ainda há predominância de plataformas baseadas nas técnicas pioneiras (ZHANG et al., 2011).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Área de Estudo**

A plataforma continental sudoeste é constituída por massas de água com características físicas e químicas diferentes além de ser zona de transição entre o clima tropical e subtropical (CASTRO et al., 2006). A circulação do Oceano Atlântico Sudoeste é caracterizada pelo fluxo da Corrente do Brasil (CB), com sentido sul e de origem tropical, carregando águas quentes e oligotróficas acompanhando a linha de quebra da plataforma continental (OLSON; DINERSTEIN, 1998).

A Bacia de Campos estende-se da costa norte do Rio de Janeiro e o Sul do Espírito Santo, cobrindo uma área de aproximadamente 100.000 km<sup>2</sup>, sendo limitada pela Bacia do Espírito Santo e a Bacia de Santos (MILANI et al., 2000). A estrutura vertical das massas de água é característica do Atlântico Sul, sendo constituídos nos

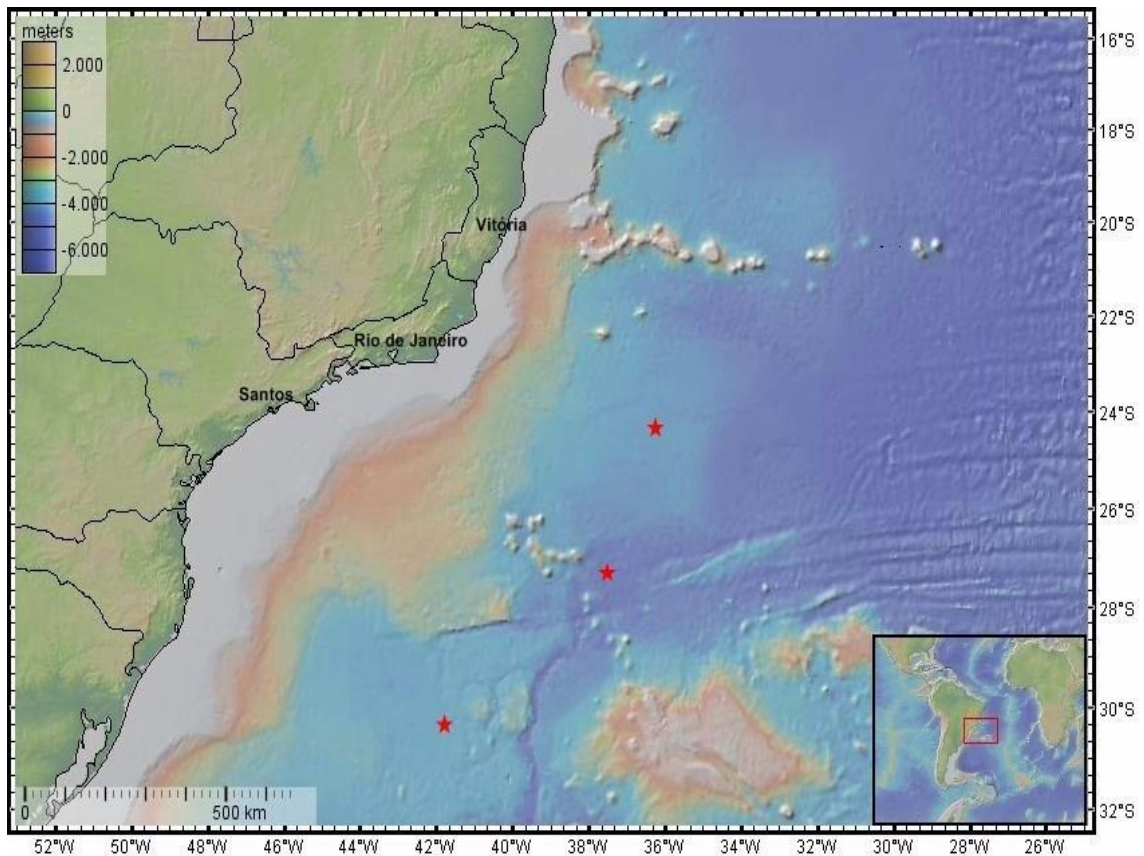
primeiros 3.500 metros pela Água Tropical (AT), Água Central do Atlântico Sul (ACAS), Água Intermediária Antártica (AIA), Água Circumpolar Superior (ACS), Água Profunda do Atlântico Norte (APAN) e a Água Circumpolar Inferior (ACI) (SILVEIRA, 2007).

A Bacia de Santos localiza-se na região sudoeste da margem continental brasileira, abrangendo o litoral do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, possui cerca de 350.000 km<sup>2</sup> de área total, é limitada ao sul pela Bacia de Pelotas e ao norte pela Bacia de Campos (ASSINE et al., 2008; PEREIRA; MACEDO, 1990). As massas de água vertical da Bacia de Santos possuem a mesma estrutura da Bacia de Campos, sendo inicialmente AT, ACAS, AIA, ACS, APAN e ACI (SILVEIRA et al., 2000).

Este estudo concentrou-se na transição entre Água Circumpolar Inferior e Água Profunda do Atlântico Norte, sendo as massas correspondentes às profundidades de fundeio na Bacia de Campos e Bacia de Santos. A APAN ocupa níveis entre 1.000 e 3.000 metros de profundidade, originando-se no Mar de Labrador e circulando em direção sul até se misturar às águas do Oceano Austral, formando a Água Profunda Circumpolar (SILVEIRA et al., 2000). Possui salinidade entre 34,6 – 35, oxigenação >5 mL/L, temperaturas entre 3 °C e 4 °C sendo parte integrante da circulação termo-halina (KRUEGER et al., 2008).

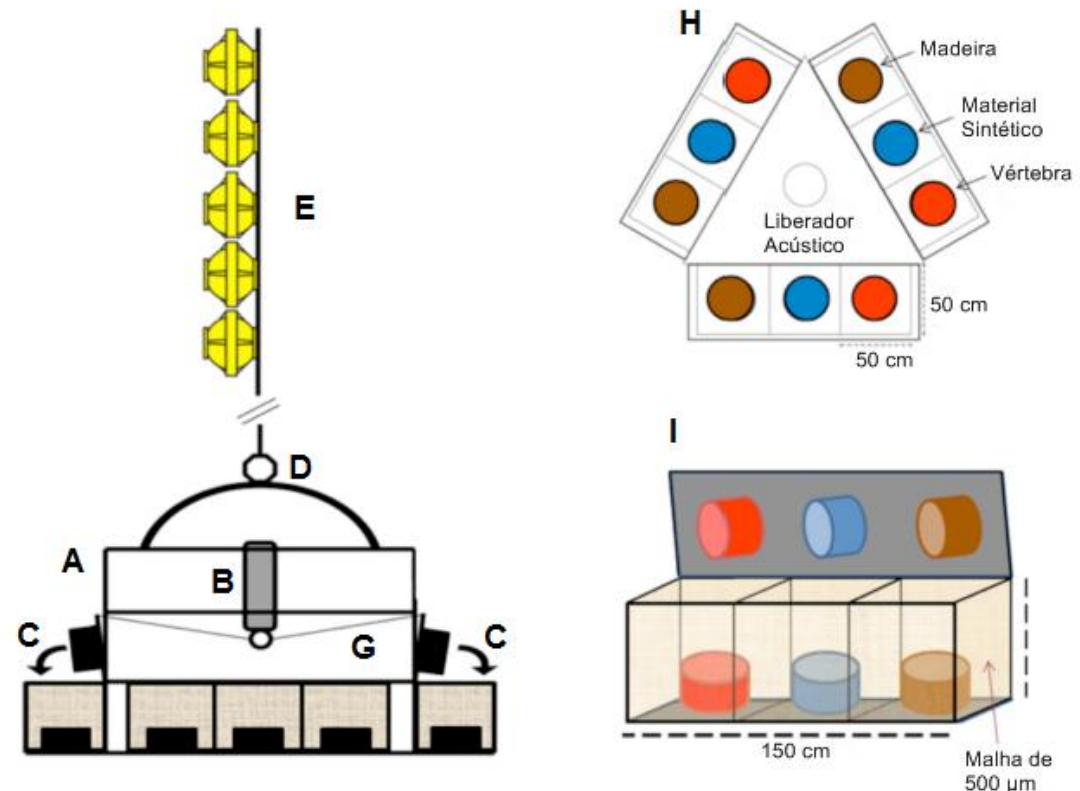
## 4.2 Amostragem

Substratos sintéticos (carpete de borracha) e orgânicos (vértebras de baleia e blocos de madeira) foram implantados artificialmente, dentro das atividades do projeto “Biodiversidade e conectividade de comunidades bênticas em substratos orgânicos (ossos de baleia e parcelas de madeira) no Atlântico sudoeste profundo (BIOSUOR)”, a 3.300 metros de profundidade no Oceano Atlântico em três sítios de fundeio: Espírito Santo (-22° 50' 27.117"S, -38° 24' 58.7988"W) e Rio de Janeiro (-25° 20' 17.9982"S, -39° 38' 28.3194"W) localizado na Bacia de Campos e São Paulo (-28° 1' 42.3582"S, -43° 31' 46.8012"W), localizado na Bacia de Santos (Figura 2). O fundeio foi realizado em Julho de 2013, com apoio do Navio Oceanográfico Alfa Crucis, pertencente ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP).



**Figura 2** - Mapa batimétrico da região de estudo, indicando os pontos onde os *landers* contendo substratos sintéticos e orgânicos foram fundeados. Isóbatas de 3.300 metros nos sítios: Espírito Santo (-22° 50' 27.117"S, -38° 24' 58.7988"W), Rio de Janeiro (-25° 20' 17.9982"S, -39° 38' 28.3194"W) e São Paulo (-28° 1' 42.3582"S, -43° 31' 46.8012"W). Fonte: GeoMapApp®.

Os substratos de estudo foram fixados em estruturas autônomas experimentais (*landers*) constituídas de suportes retangulares de alumínio, equipados com três compartimentos cobertos com malha de 500  $\mu\text{m}$  (Figura 3). Em cada *lander* foi alocado seis substratos sintéticos, seis blocos de madeira e seis vértebras de baleia. A tampa desses compartimentos permaneceu aberta para que os substratos fossem expostos ao fluxo de água. Estas estruturas foram equipadas com um liberador acústico Teledyne Benthos 866A e seis boias esféricas de vidro (Teledyne Benthos C-204-42) específicas para mar profundo, além de um equipamento com sinal de rádio para facilitar a recuperação dos mesmos.



**Figura 3** - O *lander* constituído de um frame triangular de alumínio contendo um conjunto de vértebra de baleia, bloco de madeira e carpete sintético acondicionados em caixas arranjadas de forma aleatória (H). (B) Liberador acústico responsável por soltar as tampas (C, G). (A) Vista lateral do *lander* com as caixas abertas e os substratos expostos. (D, E) Boias de flutuação. (I) Vista lateral do conjunto de caixas. Esquema ilustrativo elaborado pelo Paulo Yukio Gomes Sumida.

Em Maio de 2015, após 22 meses de fundeio, com o auxílio do NPo Almirante Maximiano (H-41) da Marinha do Brasil, os *landers* foram resgatados (Figura 4) e realizada a coleta das amostras de biofilmes desenvolvidos na superfície dos substratos, as quais puderam ser distinguidos pela coloração (Figura 5). Os biofilmes foram retirados com auxílio de espátulas estéreis e colocados em tubos criogênicos de 2 ml. Os substratos sintéticos não apresentaram desenvolvimento aparente de biofilme, portanto, foram coletadas pequenas porções com auxílio de bisturis estéreis e colocados em tubos criogênicos de 5 ml, totalizando 27 amostras, sendo três amostras por substrato e nove amostras por Estado (Tabela 1). Os materiais coletados foram imediatamente armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até seu processamento no Laboratório de Ecologia Microbiana (LECOM) no Instituto Oceanográfico da USP (IOUSP).

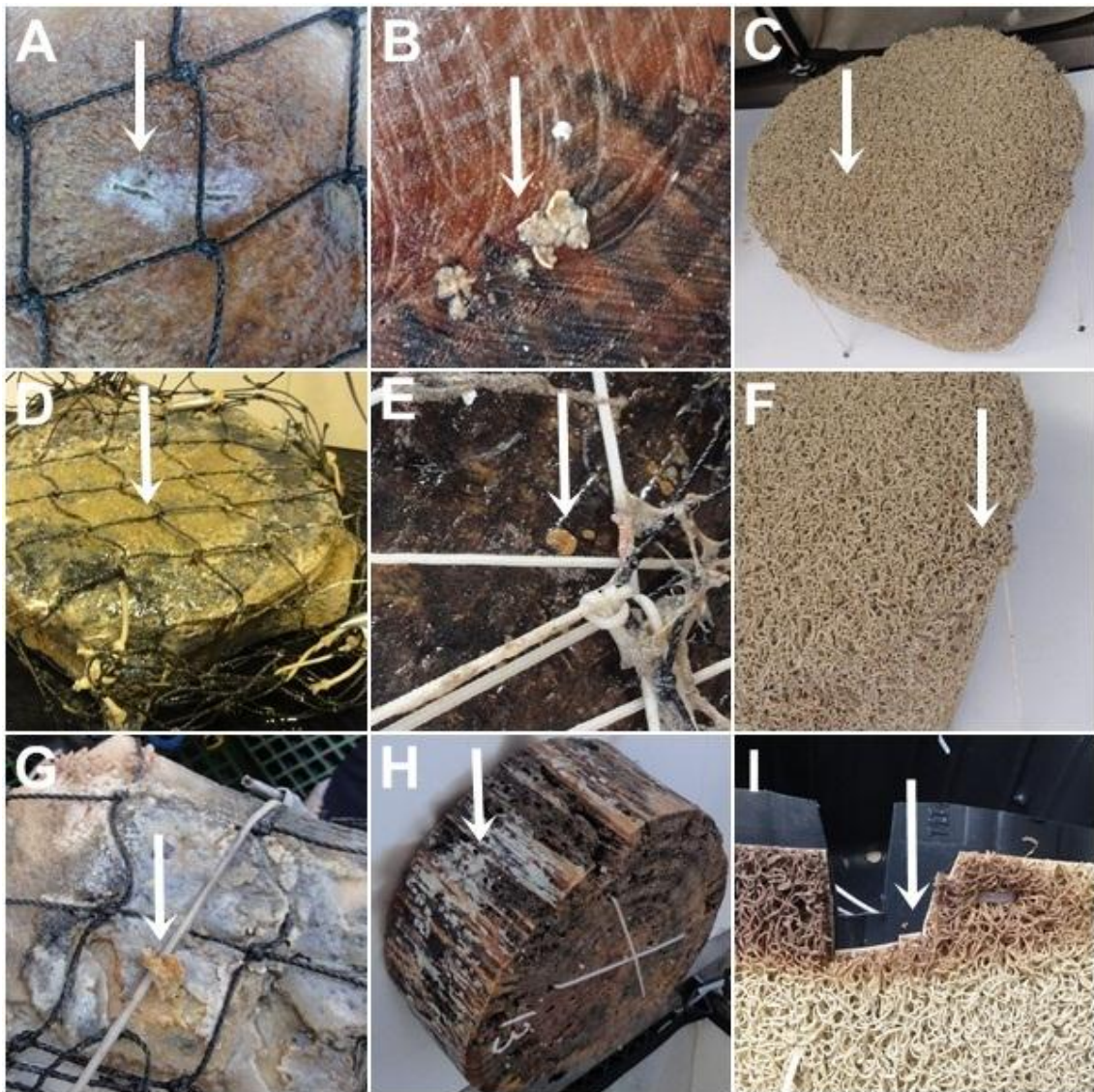




**Figura 4** - Resgate dos *landers* contendo os substratos sintéticos e orgânicos, a bordo do NPo Almirante Maximiano (H-41) da Marinha do Brasil em Maio de 2015. Fotos de Cristina Rossi Nakayama.

**Tabela 1** – Informações das amostras coletadas nos substratos sintéticos e orgânicos.

| <b>Identificação</b> | <b>Substrato</b> | <b>Profundidade (m)</b> | <b>Local</b>   | <b>Cor do biofilme</b> |
|----------------------|------------------|-------------------------|----------------|------------------------|
| VES1                 | Vértebra         | 3.300                   | Espírito Santo | Amarelo                |
| VES2                 | Vértebra         | 3.300                   | Espírito Santo | Branco                 |
| VES3                 | Vértebra         | 3.300                   | Espírito Santo | Branco                 |
| MES1                 | Madeira          | 3.300                   | Espírito Santo | Preto                  |
| MES2                 | Madeira          | 3.300                   | Espírito Santo | Bege                   |
| MES3                 | Madeira          | 3.300                   | Espírito Santo | Amarelo                |
| SES1                 | Sintético        | 3.300                   | Espírito Santo | -                      |
| SES2                 | Sintético        | 3.300                   | Espírito Santo | -                      |
| SES3                 | Sintético        | 3.300                   | Espírito Santo | -                      |
| VRJ1                 | Vértebra         | 3.300                   | Rio de Janeiro | Amarelo                |
| VRJ2                 | Vértebra         | 3.300                   | Rio de Janeiro | Amarelo                |
| VRJ3                 | Vértebra         | 3.300                   | Rio de Janeiro | Branco                 |
| MRJ1                 | Madeira          | 3.300                   | Rio de Janeiro | Preto                  |
| MRJ2                 | Madeira          | 3.300                   | Rio de Janeiro | Bege                   |
| MRJ3                 | Madeira          | 3.300                   | Rio de Janeiro | Amarelo                |
| SRJ1                 | Sintético        | 3.300                   | Rio de Janeiro | -                      |
| SRJ2                 | Sintético        | 3.300                   | Rio de Janeiro | -                      |
| SRJ3                 | Sintético        | 3.300                   | Rio de Janeiro | -                      |
| VSP1                 | Vértebra         | 3.300                   | São Paulo      | Amarelo                |
| VSP2                 | Vértebra         | 3.300                   | São Paulo      | Preto                  |
| VSP3                 | Vértebra         | 3.300                   | São Paulo      | Branco                 |
| MSP1                 | Madeira          | 3.300                   | São Paulo      | Branco                 |
| MSP2                 | Madeira          | 3.300                   | São Paulo      | Bege                   |
| MSP3                 | Madeira          | 3.300                   | São Paulo      | Amarelo                |
| SSP1                 | Sintético        | 3.300                   | São Paulo      | -                      |
| SSP2                 | Sintético        | 3.300                   | São Paulo      | -                      |
| SSP3                 | Sintético        | 3.300                   | São Paulo      | -                      |



**Figura 5** - Exemplos de vértebras de baleia, blocos de madeira e carpetes sintéticos: (A) Vértebra de baleia evidenciando biofilme branco, (B) bloco de madeira evidenciando biofilme bege e (C) carpete sintético coletados no sítio Espírito Santo. (D) Vértebra de baleia evidenciando biofilme amarelo, (E) bloco de madeira evidenciando biofilme amarelo e (F) carpete sintético coletados no sítio Rio de Janeiro. (G) Vértebra de baleia evidenciando biofilme amarelo, (H) bloco de madeira evidenciando biofilme branco e (I) carpete sintético coletados em São Paulo. Fotos de Cristina Rossi Nakayama.

### 4.3 Análise Molecular da diversidade bacteriana

#### 4.3.1 Extração de DNA Total

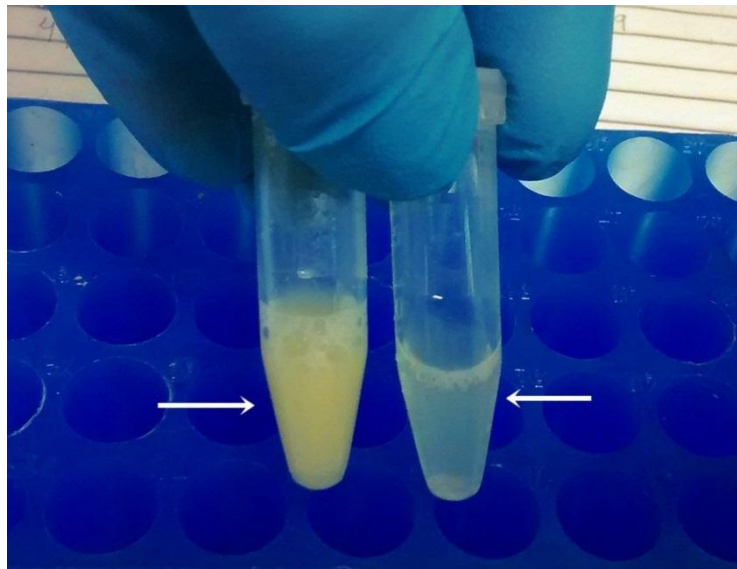
A extração de DNA total das amostras coletadas foi realizada utilizando o *Power Biofilm DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories, CA, USA) de acordo com as especificações do fabricante. Em linhas gerais, amostras que variavam de 0,0085 g a 0,4 g foram utilizadas na extração de DNA, que consistiu na lise celular, remoção



de lipídios, desnaturação, remoção de proteínas e eluição do DNA, gerando um produto final de 100 µl. A concentração de DNA foi quantificada pelo detector de fluorescência *Qubit* 1.0 (Life Technologies, USA) com o *kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies, USA).

#### 4.3.2 Purificação do DNA

Após a extração de DNA total, o produto final das amostras de biofilme apresentava coloração amarelada ou turva (Figura 6), deste modo todas as amostras foram submetidas à purificação com o *kit DNA Clean & Concentrator™* (Zymo Research, USA) segundo especificações do fabricante. Com a purificação, todos os pigmentos residuais foram removidos e o DNA foi quantificado novamente pelo detector de fluorescência *Qubit* 1.0 (Life Technologies, USA) com o *kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies, USA).



**Figura 6** - Amostras de DNA extraídas dos biofilmes de vértebras de baleia do sítio São Paulo: Biofilme amarelo (VSP1) e biofilme branco (VSP3) respectivamente, evidenciando a turbidez residual após a extração de DNA total.

#### 4.3.3 Sequenciamento do gene *RNAr 16S* por *Illumina Miseq*

As amostras de DNA total, que foram extraídas dos substratos sintéticos e biofilmes desenvolvidos nos substratos orgânicos, foram enviadas a empresa Macrogen (Coreia) para sequenciamento na plataforma *Illumina Miseq*, que gera seqüências de até 600 pb através de um sistema *paired 2 x 300 pb* (Caporaso et al., 2012). Esta técnica promove o sequenciamento do DNA gerando informações

sobre milhões de pares de base em uma única corrida (CAPORASO et al., 2012; KOZICH et al., 2013).

O gene RNAr 16S é o marcador taxonômico mais utilizado para estudos de microbiologia ambiental (DELONG et al., 2001) e neste estudo, foi utilizado a região hipervariável V3-V4 deste gene. Para a amplificação desta região, foi utilizado os *primers* S-D-Bact-0341-b-S-17 (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') e S-D-Bact-0785-a-A-21 (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). Os *primers* continham uma sequência de adaptadores específicos (*Forward* 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'; *Reverso*: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3') para a plataforma Illumina Miseq.

De acordo com KLINDWORTH et al (2013), estes *primers* possuem degenerações que permitem alta cobertura e boa representatividade da diversidade microbiana. A cobertura individual destes *primers* é 98,1% para 341F e 96,2% para 785R enquanto para o par, a cobertura é de 70,9% (KLINDWORTH et al., 2013).

A reação inicial de PCR constituiu de uma desnaturação de 95 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 57 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Uma segunda reação de PCR foi realizada para adição de índices em cada *amplicon* do gene RNAr 16S para a montagem das bibliotecas. As bibliotecas foram purificadas por *beads* magnéticas através do *kit AMPure XP beads* (Beckman Coulter), quantificadas, normalizadas e a etapa final de *pooling* foi realizada agrupando todas as bibliotecas e sequenciando na plataforma Miseq.

#### **4.3.4 Análise das sequências obtidas com o sequenciamento do gene rRNA 16S**

A análise de dados do sequenciamento do gene RNAr 16S foi realizado com o *software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME)* (CAPORASO et al., 2010), empregando linhas de comandos específicos para cada etapa. Primeiramente, foi realizada a montagem dos *reads* pareados com o auxílio do *software* PEAR (ZHANG et al., 2011), formando sequências únicas.

As sequências unidas foram submetidas a filtros de qualidade e todas com valores de qualidade abaixo de 30 (Phred>30) foram descartadas. Com o auxílio do

*software* USEARCH 8 as sequências foram trimadas e selecionadas para conterem comprimento mínimo de 400 pares de bases. A clusterização em OTUs e a retirada de singletons e chimeras foram realizadas utilizando o mesmo *software*. As unidades taxonômicas operacionais (OTU) foram definidas utilizando nível de distância de 3%, sendo estabelecido 97% de similaridade pelo método *uclust* (EDGAR, 2010). As sequências representativas de cada OTU foram classificadas pela base de dados RDP (*RibosomalDatabaseProject*) (<https://rdp.cme.msu.edu/>) com limite de confiança de 0,05.

O comando *assign\_taxonomy.py* foi utilizado para gerar *clusters* e a matriz de OTUs que foi relacionada aos táxons correspondentes. As sequências foram alinhadas com o comando *aling\_seqs.py* pelo método PyNast (CAPOROSO et al., 2010) e a classificação taxonômica com base nas sequências disponíveis no banco de dados do RDP. O comando *filter\_alignment.py* foi utilizado para filtrar as sequências alinhadas. A árvore filogenética foi montada empregando o comando *make\_phylogeny.py*.

Os índices de alfa-diversidade foram obtidos através do comando *alpha\_diversity.py*. A riqueza foi estimada pelos índices Chao1 e Ace, enquanto a diversidade estimada pelos índices de Shannon e Simpson. Para análise de beta-diversidade (empregando o comando *beta\_diversity.py*) foi utilizado o índice UniFrac, que utiliza duas abordagens para avaliar a diversidade de uma comunidade: a versão *weighted* UniFrac, que responde diretamente para a diferença na abundância relativa dos organismos entre as amostras (quantitativo) e *unweighted* UniFrac que avalia apenas presença e ausência dos organismos entre as amostras (qualitativo) (LOZUPONE et al., 2005). Neste estudo, a beta diversidade foi representada pelo índice *weighted* UniFrac por responder melhor aos objetivos do trabalho. Através deste índice foi realizada a Análise de Coordenadas Principais (*Principal Coordinates Analysis- PCoA*). O índice de Bray Curtis foi empregado na construção do dendrograma utilizando a tabela OTUs gerada pelo *Qiime*.

Os gráficos de barra, o PCoA e os dendrogramas foram gerados através do *software* R utilizando os pacotes *ggplot2* e *vegan*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise do sequenciamento do gene RNAr 16S por Illumina Miseq

Após o sequenciamento, foram gerados 14.327.504 *reads* distribuídos entre as 27 amostras estudadas neste trabalho (Tabela 2), obtendo-se média de 530.648 *reads* por amostra. Após serem montados e submetidos ao filtro de qualidade, restaram 6.489.922 sequências no total. A análise das sequências geradas permitiu a classificação das bactérias com base na matriz de OTUs, geradas pelo *software Qiime*, com total de 1.758 OTUs e média de 65 OTUs por amostra.

**Tabela 2** - Informações do sequenciamento do gene RNAr 16S por Illumina Miseq.

| <b>Identificação</b> | <b>Reads gerados</b> | <b>Sequências montadas</b> |
|----------------------|----------------------|----------------------------|
| MES1                 | 664.404              | 303.520                    |
| MES2                 | 442.758              | 198.928                    |
| MES3                 | 616.004              | 276.676                    |
| MRJ1                 | 610.026              | 279.482                    |
| MRJ2                 | 635.712              | 289.026                    |
| MRJ3                 | 634.670              | 288.299                    |
| MSP1                 | 514.288              | 235.176                    |
| MSP2                 | 449.500              | 202.336                    |
| MSP3                 | 551.534              | 244.165                    |
| VES1                 | 449.520              | 202.589                    |
| VES2                 | 682.420              | 318.648                    |
| VES3                 | 418.008              | 190.090                    |
| VRJ1                 | 671.862              | 299.189                    |
| VRJ2                 | 607.498              | 271.908                    |
| VRJ3                 | 553.830              | 251.452                    |
| VSP1                 | 463.930              | 208.101                    |
| VSP2                 | 347.018              | 155.639                    |
| VSP3                 | 711.700              | 328.046                    |
| SES1                 | 556.624              | 253.317                    |
| SES2                 | 373.070              | 169.865                    |
| SES3                 | 587.804              | 254.068                    |

|              |                   |                  |
|--------------|-------------------|------------------|
| SRJ1         | 769.838           | 353.181          |
| SRJ2         | 446.884           | 201.818          |
| SRJ3         | 471.110           | 211.065          |
| SSP1         | 398.910           | 183.296          |
| SSP2         | 332.714           | 151.560          |
| SSP3         | 365.868           | 168.482          |
| <b>Total</b> | <b>14.327.504</b> | <b>6.489.922</b> |

A grande quantidade de sequências geradas pelas novas tecnologias de sequenciamento tem proporcionado grandes avanços na área de Microbiologia, permitindo a análise de comunidades complexas ou raras (HUGONI et al., 2013). Porém, essa grande quantidade de informação requer maiores cuidados durante as análises, retirando os artefatos de sequenciamento.

Erros durante o sequenciamento podem fazer com que *reads* de um mesmo taxa formem mais de um agrupamento, causando uma superestimação da diversidade (KUNIN et al., 2010).

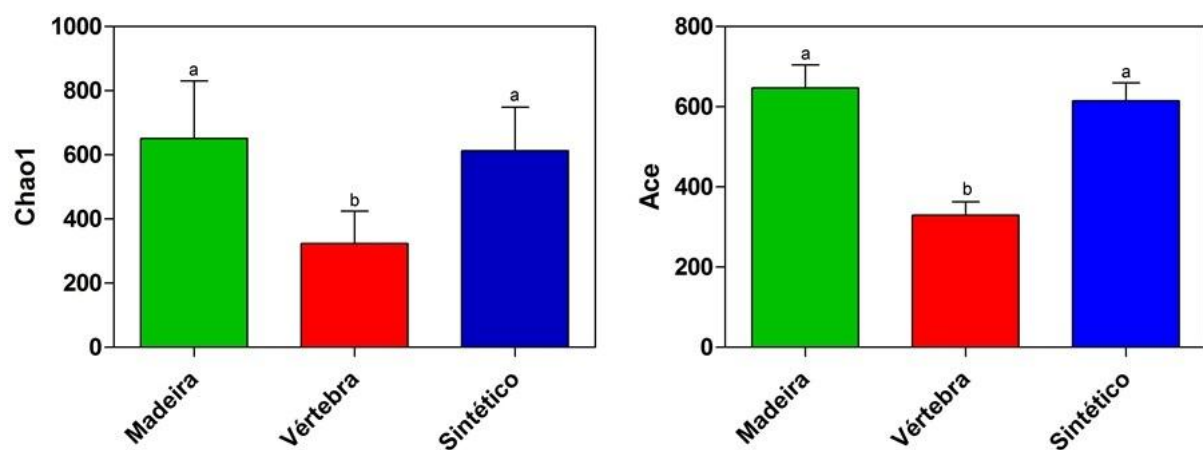
Não há um consenso sobre os métodos de filtragem da qualidade para o sistema Illumina, para o qual os autores do Qiime (BOKULICH, 2013), Mothur (KOZICH et al., 2013) e UPARSE (EDGAR, 2013) propõem sugestões diferentes. Devido a falta dessa padronização, alguns autores defendem que apenas uma filtragem rigorosa poderia reduzir a diversidade superestimada (CAPOROSO et al., 2011), por outro lado, outros autores defendem que uma filtragem rigorosa poderia provocar a perda da sensibilidade da técnica, impactando a distribuição taxonômica (BOKULICH, 2013).

Idealmente, são necessários padrões de filtragem que contornem esses problemas, a fim de estimarmos a diversidade mais próxima da real, sem perder informações importantes nesse processo.

## 5.2 Índices de riqueza e diversidade das comunidades bacterianas dos substratos sintéticos e biofilmes dos substratos orgânicos

Os índices de riqueza (Chao1 e Ace) e diversidade (Shannon e Simpson) estão listados individualmente na Tabela 4. Os índices Chao1 e Ace mostraram diferenças significativas na riqueza das amostras da vértebra de baleia quando comparado com as amostras da madeira e do material sintético. As amostras das parcelas de madeira não mostraram diferenças significativas quando comparadas com o material sintético (Figura 7). Tal resultado demonstra que as amostras da madeira e do material sintético apresentam maior riqueza que as amostras de biofilme das vértebras de baleia e que a riqueza encontrada nos biofilmes da madeira é semelhante à riqueza encontrada no material sintético. A Tabela 3 apresenta o valor médio da riqueza de cada substrato, corroborando com os índices de Chao1 e Ace.

Para a realização dos gráficos da Figura 7, os dados foram avaliados pelo teste Shapiro-wilk, para verificar a necessidade de normalização dos mesmos. Os índices de riqueza que obtiveram valores acima de 0,05 não precisaram ser normalizados. Os valores de Chao1 e Ace já estavam normais segundo Shapiro-wilk (0,614 e 0,658 respectivamente).



**Figura 7** - Índice de riqueza Chao1 e Ace estimado para as amostras de biofilme das parcelas de madeira (verde), vértebras de baleia (vermelho) e material sintético (azul), onde letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os substratos e letras diferentes indicam diferença significativa. Significância calculada através do teste ANOVA.

**Tabela 3** - Tabela com os valores de riqueza de grupos raros, abundantes e totais encontrado nas amostras de biofilme das parcelas de madeira, biofilme das vértebras de baleia e material sintético. Valores baseados na tabela OTU.

| Substrato | Riqueza de raros | Riqueza de abundantes | Riqueza total |
|-----------|------------------|-----------------------|---------------|
| Madeira   | 4.901            | 177                   | 5.079         |
| Vértebra  | 2.204            | 162                   | 2.366         |
| Sintético | 4.749            | 194                   | 4.943         |

Para o índice de diversidade Simpson (Figura 8), que calcula a probabilidade de duas amostras retiradas ao acaso pertencerem a espécies diferentes (GORENSTEIN, 2002), houve diferença significativa na diversidade encontrada nas amostras da vértebra com as amostras da madeira e material sintético, porém, assim como nos índices de riqueza não houve diferença significativa na diversidade encontrada nas parcelas de madeira e material sintético. A média dos valores de Simpson para as amostras da madeira, vértebra e material sintético foram respectivamente: 0,962; 0,912 e 0,969 indicando, segundo este índice, que as amostras de biofilme das vértebras de baleia mostraram-se mais diversas que os demais substratos e as amostras de material sintético o substrato menos diverso.

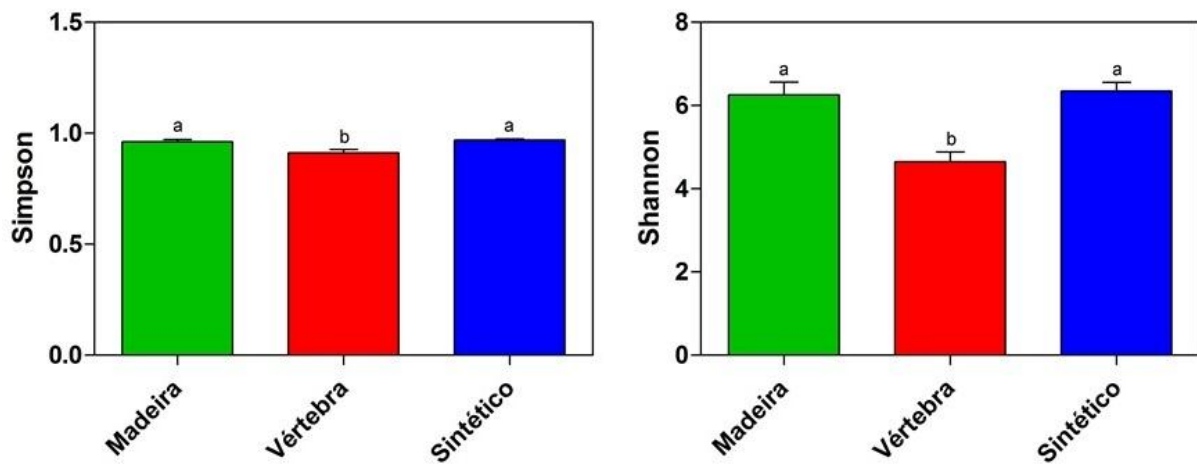
O índice de Shannon calcula o grau de incerteza em prever a qual espécie pertence um organismo retirado aleatoriamente da amostra e quanto maior o valor de Shannon, maior a diversidade da amostra (LAMPRECHT, 1990). A média dos valores calculados para Shannon das amostras da madeira, vértebra e material sintético foram respectivamente: 6,256; 4,646 e 6,353. Segundo o índice de diversidade Shannon, as amostras de material sintético foram as mais diversas, enquanto as amostras de biofilme das vértebras de baleia foram menos diversas.

A diferença entre os resultados dos índices Simpson e Shannon deve-se ao fato de que no primeiro índice os grupos dominantes possuem maior peso na análise, enquanto o índice de Shannon, além de considerar os grupos abundantes, também é sensível aos grupos raros (MAGURRAN, 1988).

Provavelmente os grupos que colonizam as vértebras de baleia sejam mais específicos para este substrato, justificando a menor riqueza e maior prevalência de grupos dominantes (justificando a maior diversidade para o índice Simpson). Não há evidências de que o material sintético estaria sendo utilizado como fonte de carbono. Provavelmente estaria sendo utilizado como substrato de fixação e estes grupos estariam utilizando as partículas de carbono orgânico que se aderiram a esse

material possibilitando a colonização de diversos grupos, não necessitando assim de especificidades metabólicas, justificando a maior diversidade para o índice Shannon, que considera tanto os grupos dominantes quanto os raros. As parcelas de madeira apresentaram riqueza e diversidade semelhante ao material sintético, provavelmente abrigando tanto comunidades específicas deste substrato como comunidades que se aderiram de forma equivalente ao substrato sintético, justificando a dominância dos mesmos filos em ambos os substratos.

Para a realização dos gráficos da Figura 8, os dados também foram avaliados pelo teste Shapiro-wilk, onde os dados de Simpson (0,0005) não estavam normais, por esta razão foi realizado o teste *Friedman* utilizado para dados não normais. O índice Shannon não precisou ser normalizado (0,207).



**Figura 8** - Índice de diversidade Simpson e Shannon estimado para as amostras de biofilme das parcelas de madeira (verde), vértebras de baleia (vermelho) e material sintético (azul), onde letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os substratos e letras diferentes indicam diferença significativa. Significância calculada através dos testes *Friedman* e ANOVA.



**Tabela 4** - Índice de riqueza (Chao1 e Ace) e diversidade (Shannon e Simpson) de OTUs estimada para as amostras de material sintético e dos biofilmes das parcelas de madeira e vértebras de baleia coletados no Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo.

| <b>Amostra</b> | <b>Chao1</b> | <b>Ace</b> | <b>Shannon</b> | <b>Simpson</b> | <b>OTUs</b> |
|----------------|--------------|------------|----------------|----------------|-------------|
| MES1           | 850,833      | 833,771    | 7,203          | 0,984          | 739         |
| MES2           | 800,971      | 788,123    | 7,214          | 0,985          | 694         |
| MES3           | 868,685      | 871,374    | 7,257          | 0,986          | 783         |
| MRJ1           | 565,620      | 572,088    | 6,018          | 0,967          | 487         |
| MRJ2           | 734          | 715,643    | 6,647          | 0,975          | 623         |
| MRJ3           | 635,508      | 631,573    | 6,090          | 0,968          | 546         |
| MSP1           | 360,372      | 369,868    | 4,640          | 0,897          | 312         |
| MSP2           | 437,25       | 437,171    | 5,278          | 0,943          | 369         |
| MSP3           | 609,057      | 601,473    | 5,954          | 0,952          | 525         |
| VES1           | 349          | 350,742    | 3,858          | 0,842          | 274         |
| VES2           | 471,306      | 474,962    | 4,959          | 0,937          | 362         |
| VES3           | 311,487      | 326,503    | 4,788          | 0,924          | 263         |
| VRJ1           | 400          | 401,513    | 5,491          | 0,958          | 323         |
| VRJ2           | 404,837      | 402,238    | 5,658          | 0,961          | 357         |
| VRJ3           | 336,137      | 351,978    | 4,917          | 0,930          | 243         |
| VSP1           | 136          | 141,516    | 3,789          | 0,854          | 116         |
| VSP2           | 231,534      | 253,477    | 3,770          | 0,872          | 197         |
| VSP3           | 276,047      | 266,239    | 4,590          | 0,930          | 231         |
| SES1           | 721,5        | 723,362    | 7,319          | 0,988          | 690         |
| SES2           | 536,7        | 530,846    | 6,345          | 0,975          | 487         |
| SES3           | 717,322      | 700,701    | 6,724          | 0,980          | 623         |
| SRJ1           | 830,093      | 839,143    | 6,645          | 0,978          | 763         |
| SRJ2           | 682,380      | 688,681    | 6,547          | 0,973          | 604         |
| SRJ3           | 608,459      | 607,527    | 5,862          | 0,957          | 501         |
| SSP1           | 428,877      | 429,015    | 5,328          | 0,939          | 381         |
| SSP2           | 442,109      | 449,387    | 5,699          | 0,952          | 393         |
| SSP3           | 551,521      | 564,543    | 6,707          | 0,979          | 501         |

### 5.3 Os filios mais abundantes nas parcelas sintéticas e orgânicas

Nos substratos sintéticos e nos biofilmes formados nas parcelas orgânicas, foram encontrados treze filios mais abundantes (com ocorrência superior à 0,1%) (Figura 9). O filo mais representativo nas amostras foi Proteobacteria, representando 52,9% dos filios encontrados, sendo o maior e mais diverso filo do domínio Bacteria (KERSTERS et al., 2006). Este filo é dividido em seis classes: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria e Zetaproteobacteria. Constitui um grupo morfologicamente diverso, incluindo cocos, bacilos, espirilos e organismos filamentosos, abrangendo a maior parte das bactérias Gram-negativas (KERSTERS et al., 2006). Possuem representantes quimiolitotróficos, heterotróficos e fototróficos (TRÜPER, 1987; ZAVARZIN et al., 1991). Essa versatilidade fenotípica e filogenética possibilita a este filo colonizar os mais diversos ambientes (ZINGER et al., 2011). A classe Zetaproteobacteria foi a única classe pertencente a este filo que não foi encontrada nas amostras estudadas.

O segundo filo mais abundante nas amostras foi Bacteroidetes, representando 18,4% dos filios encontrados. Os microrganismos deste grupo incluem representantes anaeróbios obrigatórios, sacarolíticos e Gram-negativos. Como produto final do metabolismo (fermentação) podem liberar ácido succínico e acético (SAMPAIO, 2008; QU et al., 2008). As classes representadas nas amostras estudadas, pertencentes a este filo foram: Bacteroidetes incertae sedis, Bacteroidia e Flavobacteriia.

O filo Firmicutes (5,5%) também foi encontrado, abrigando organismos aeróbios e anaeróbios, Gram-positivos, com baixo teor de guanina e citosina (G + C) e formadores de endósporos (GUEDON et al., 2005). Apresentam metabolismo de homofermentação, heterofermentação e respiração. Como produto final do metabolismo é gerado ácido láctico, acetona, butanol e etanol (GUEDON et al., 2005; JUMAS-BILAK et al., 2009;). Como representante deste filo, encontramos a classe Clostridia.

O filo Parcubacteria representou 4,5% dos filios encontrados. Estes organismos são encontrados exclusivamente em ambientes anóxicos (RINKE et al., 2013), não possuem cadeia transportadora de elétrons, sugerindo que este grupo é

obrigatoriamente fermentador de açúcares simples e ácidos orgânicos, embora há evidência de possível degradação de celulose e quitina por alguns membros deste grupo (NELSON; STEGEN, 2015). Também são associados ao ciclo do nitrogênio e enxofre em sedimentos anóxicos (WRIGHTON et al., 2012). Este grupo carece de diversos genes para biossíntese de aminoácidos, lipídios, nucleotídeos e vitaminas, possuindo um limitado sistema de transporte, pondo em pauta como esses organismos obtêm esses metabólitos essenciais. NELSON e STAGEN (2015) sugerem que este grupo possa ser ectosimbiontes ou ectoparasitas de outras células microbianas, devido à ausência de diversos genes essenciais e o pequeno tamanho de seu genoma. Neste estudo não foi encontrado representante de classe para este filo.

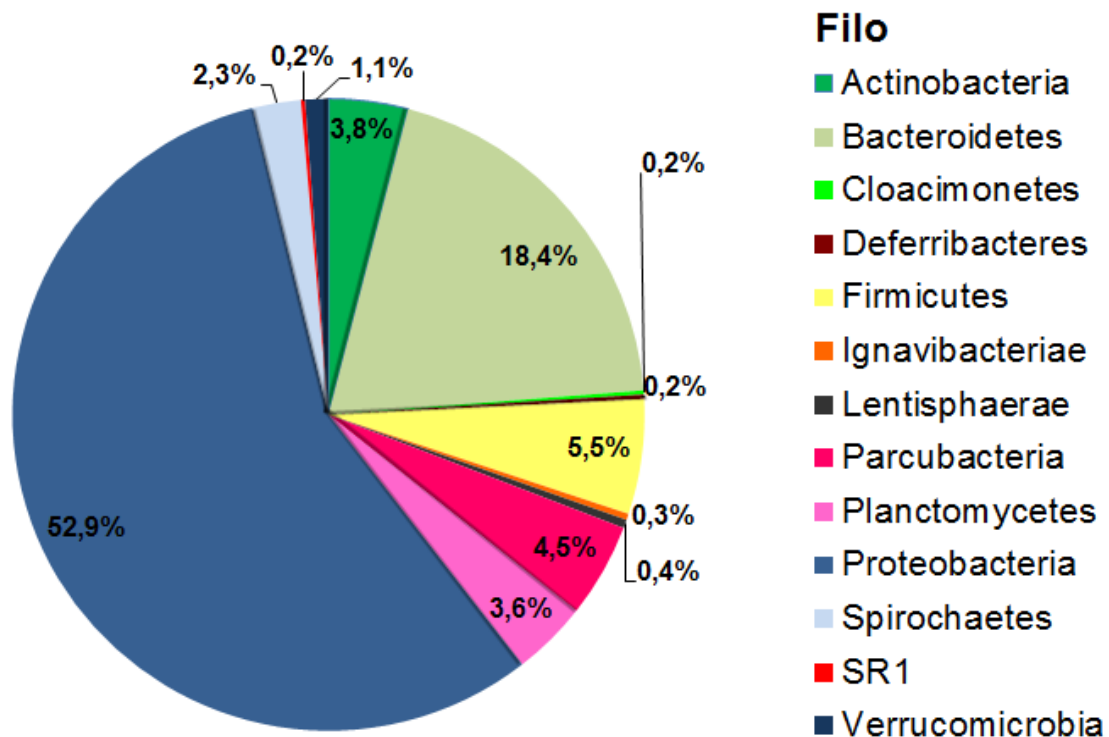
O filo Actinobacteria (3,8%) também foi descrito nas amostras estudadas. Este filo abriga bactérias Gram-positivas com alta concentração de guanina e citosina (G + C) em seu DNA (CWALA et al., 2011; RAO et al., 2012; VENTURA et al., 2007). Seu crescimento é caracterizado pela formação de hifas e um micélio aéreo, apresentando ampla diversidade morfológica (VENTURA et al., 2007). Este grupo exerce importante papel na ecologia de solos, destacando-se em atividades de biorremediação, compostagem, ciclagem de nutrientes e decomposição de compostos orgânicos complexos ou tóxicos (VELAYUDHAM; MURUNGAN, 2012; VENTURA et al., 2007). Muito explorado em aplicações biotecnológicas pela indústria têxtil e de papel (OLIVEIRA et al., 2014), com ampla distribuição, inclusive em sedimentos marinhos (BHAVANA et al., 2013; DHARMARAJ, 2009). Possuem representantes autotróficos, heterotróficos, fototróficos e quimiotróficos. São aeróbios, anaeróbios ou anaeróbios facultativos (KENNEDY, 1999). Abrigam grupos de microrganismos que atuam na degradação de celulose, lignocelulose, xilana e lignina (DING et al., 2004; PETROSYAN et al., 2003). Podem produzir corantes em tons amarelos, marrons, pretos, laranja que podem ser liberados no meio ou retidos no micélio (AMSAVENI et al., 2015). Esses corantes não são essenciais para o crescimento, mas podem ser produzidas em situações estressantes (BUTLER; DAY, 1998; DASTAGER et al., 2006). Neste filo encontramos a classe Actinobacteria.

O filo Planctomycetes representou 3,6% dos filios encontrados. Estes organismos são aeróbios, Gram-positivos, quimioheterotrófico e encontrados em ambientes marinhos (FUCHSMAN et al., 2012), em águas dulcícolas (BONDOSO et

al., 2011), em solos, em ambientes poluídos (CHOUARI et al., 2003) e em ambientes com extremas variações de salinidade (BERNHARD et al., 2012), temperatura (Li et al., 2010) e acidez (URBIETA et al., 2012), mostrando a imensa variedade de ambientes ocupados por este filo. Estes organismos possuem a característica incomum de não sintetizarem peptidoglicano (LIESACK et al., 1986), sendo envolto por uma membrana encontrada, até então, apenas em eucariontes revelando a importância deste grupo no entendimento da evolução de células eucarióticas (FUERST, 1995). Dentro deste filo encontramos as classes Phycisphaerae e Planctomycetia.

O filo Spirochaetes representou 2,3% dos filamentos amostrados. São bactérias heterotróficas e helicoidais, porém, com grande diversidade fenotípica. Possui representantes aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios (CANALE-PEROLA; HOLT; UDRIS, 1967). Metabolicamente diverso este filo pode metabolizar ácidos graxos de cadeia longa, alguns álcoois de cadeia longa (JOHNSON; WALBY, 1972), obter energia apenas pela fermentação de açúcares (CANALE-PEROLA; HOLT; UDRIS, 1967) ou catabolizar uma grande diversidade de aminoácidos e carboidratos (HESPELL; CANALE-PAROLA, 1971). São células de vida livre podendo ser encontradas em diversos ambientes, como água doce, marinha, lama, microflora normal de eucariotos ou na superfície de protozoários (BLOODGOOD et al., 1974; BREZNAK, 1973). Este filo abrigou as classes Spirochaetia e Cloacomonas.

Verrucomicrobia representou 1,1% dos filamentos encontrados. Este filo possui representantes encontrados no solo, água doce e marinha (HEDLUND; GOSINK; STALEY, 1997; JANSSEN et al., 1997). Possuem representantes anaeróbios ou anaeróbios facultativos (CHIN et al., 2001), sacarolíticos (JANSSEN, 1998), oligotróficos (DA ROCHA et al., 2009), membros oxidantes de metano e únicos metanotróficos acidófilos extremos conhecidos (DUNFIELD et al., 2007; POL, et al., 2007). Verrucomicrobiae foi a única classe encontrada dentro deste filo.



**Figura 9** - Gráfico de setores mostrando os treze filos mais abundantes encontrados nas parcelas de material sintético e orgânico.

#### 5.4 Composição taxonômica das comunidades bacterianas em cada substrato

##### Composição taxonômica dos biofilmes das parcelas de madeira

Nos biofilmes coletados nas parcelas de madeira, foram encontrados cinco filos mais abundantes (com ocorrência superior à 0.1%): Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Planctomycetes e Firmicutes (Figura 10). Dentro desses filos, as dez classes mais abundantes foram: Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, Phycisphaerae, Actinobacteria, Clostridia, Flavobacteriia, Bacteroidia (Figura 11).

O filo Proteobacteria foi o mais abundante encontrado nas parcelas de madeira (55,1%). Dentro deste filo, a classe Alphaproteobacteria, representando 40,8% das classes encontradas, esteve presente em todas as amostras, com abundância semelhante entre os sítios de fundeio estudados. A classe Gammaproteobacteria também esteve presente em todas as amostras, porém, com ocorrência desigual entre as amostras e representou 5,9% das classes amostradas. A classe Deltaproteobacteria representou 4,45% do total de classes e não foi

encontrado na amostra MSP1. Epsilonproteobacteria esteve presente em todas as amostras e representou 8,35% das classes encontradas neste substrato.

Resultados semelhantes foram encontrados por FAGERVOLD et al (2012) em trabalhos no Oceano Pacífico e Mediterrâneo realizados a 1.000 e 1.600 metros de profundidade fundeando parcelas de madeira por aproximadamente 20 meses. FAGERVOLD et al (2012) relataram o filo Proteobactéria como dominante nas parcelas de madeira e a classe Alphaproteobacteria dominante dentro deste filo, assim como neste trabalho. Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Epsilonproteobacteria também foram frequentes, enquanto a ocorrência de Betaproteobacteria foi menor. Em outro estudo, realizado no Canyon Blanes, no Mediterrâneo, FAGERVOLD et al (2013) fundearam parcelas de madeira que ficaram submersas de nove a doze meses entre 900 e 1.800 metros de profundidade e as classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria foram encontradas em abundância, corroborando com o presente trabalho. Em 2013, BIENHOLD apresentou resultados semelhantes em um experimento com blocos de madeira submerso no Mediterrâneo por um ano a 1.690 metros de profundidade, onde a classe dominante foi Alphaproteobacteria.

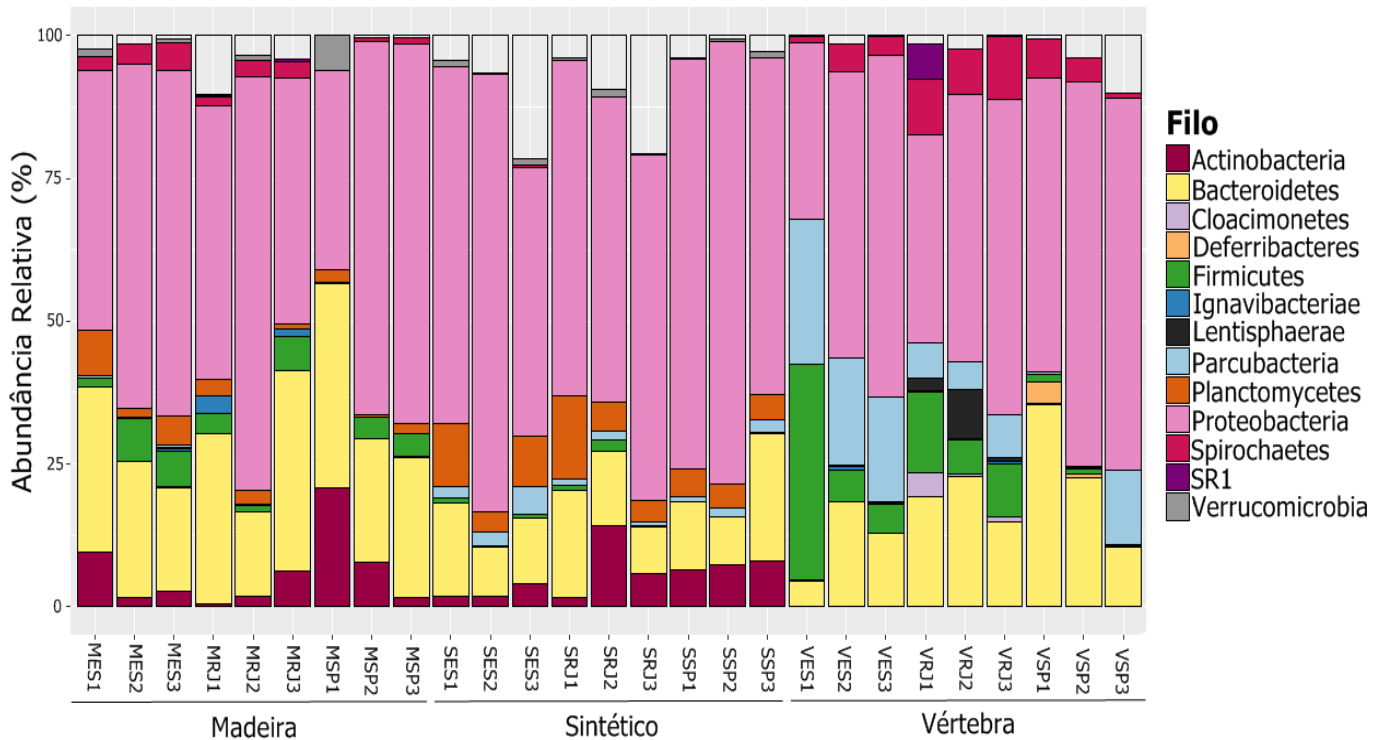
As Deltaproteobacteria são essencialmente redutoras de sulfato e enxofre e segundo FAGERVOLD et al (2013), a presença de Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria em parcelas de madeira estaria relacionada à oxidação e redução de sulfato, respectivamente, contribuindo para o consumo deste composto no interior das madeiras. Já as Epsilonproteobacteria abrigam diversos grupos oxidadores de sulfeto de hidrogênio, que é produzido pelas redutoras de sulfato e enxofre (DUNLAP et al., 2012).

O Bacteroidetes foi o segundo filo mais abundante nas amostras (25,9%). A classe Bacteroidia (5,5%) esteve presente em todas as amostras do sítio Espírito Santo e Rio de Janeiro, enquanto nas amostras do Estado de São Paulo, apenas uma amostra (MSP1) não apresentou esta classe. A classe Flavobacteriia (20%) esteve presente em todas as amostras das três estações de fundeio e foi a segunda classe mais abundante das parcelas de madeira. Nos trabalhos realizados por FAGERVOLD (2012-2013) e Bienhold (2013) o filo Bacteroidetes também foi encontrado, juntamente com as classes Bacteroidia e Flavobacteriia, descritas como dominantes neste filo. As Flavobacteriias abrigam grupos de organismos envolvidos

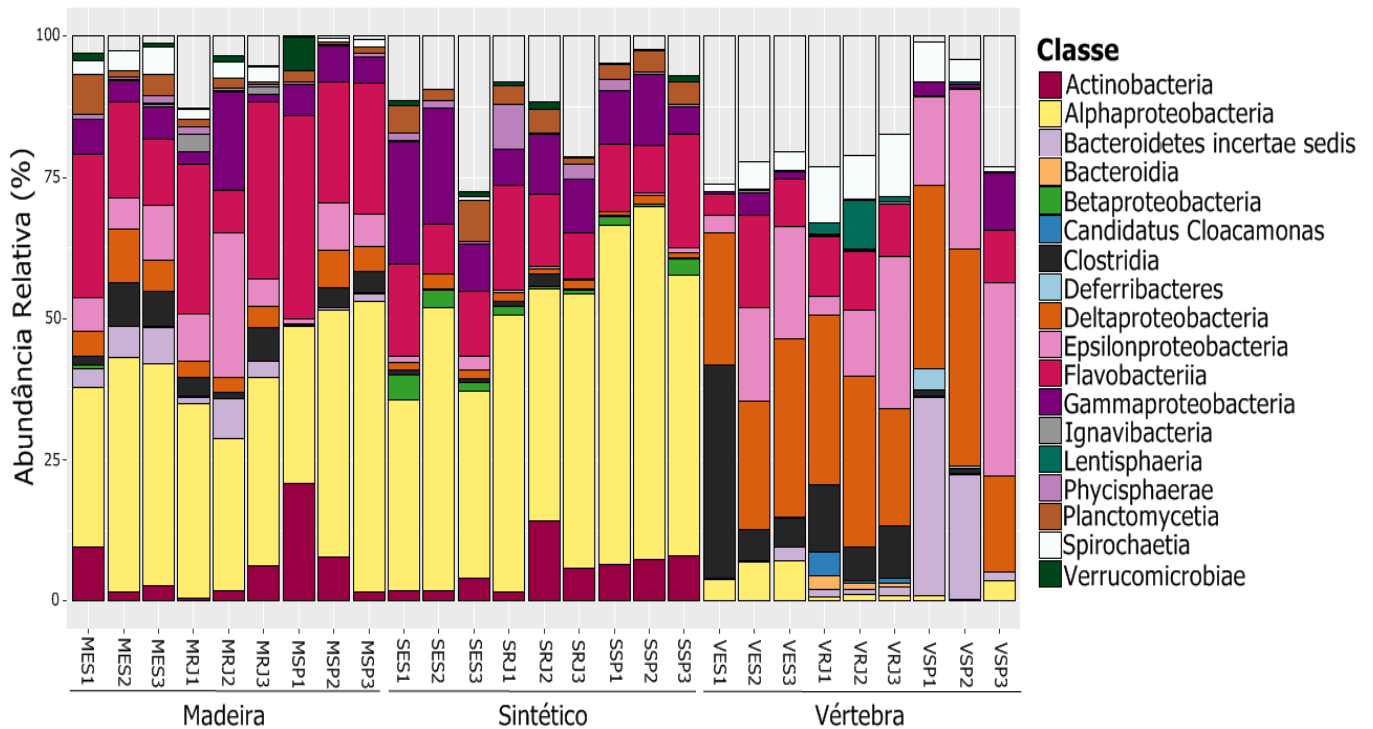
na hidrólise de celulose (BARBEYRON et al., 2001; BOWMAN, 2006) e nos trabalhos de FAGERVOLD (2012), esta classe foi abundante nas amostras fundeadas durante o período de 20 a 30 meses, demonstrando a participação deste grupo nos estágios intermediários da quebra da celulose.

Actinobacteria foi o terceiro filo mais abundante nas parcelas de madeira (5,8%). Este filo é um dos poucos grupos que abrigam organismos verdadeiramente celulolíticos (GARRITY, 2001; SCHWARZ, 2001). O filo Planctomycetes (2,8%), abrigando a classe Phycisphaerae (0,7%), foi encontrado com abundância variada entre os locais de fundeio deste estudo, porém, esteve presente em todas as amostras. Phycisphaerae, por ser heterotrófico anaeróbio e fermentador, poderia, provavelmente, estar fermentando açúcares durante a degradação da madeira. O filo Firmicutes (3,64%), com a classe representada por Clostridia (3,64%) não foi encontrado na amostra MSP1, porém, esteve presente nas demais. A classe Clostridia abriga organismos produtores de enzimas hidrolíticas arranjadas em celulosomas e são utilizados como modelo para a degradação anaeróbia da celulose (SCHWARZ, 2001). Nos trabalhos de FAGERVOLD (2012-2013) e BIENHOLD (2013) também houve ocorrência do filo Firmicutes com a classe Clostridia e do filo Planctomycetes, em menor proporção.

Com base nas Figuras 10 e 11 podemos observar que todos os filios e classes mais abundantes apresentados nas amostras de biofilme que cresceram em torno das parcelas de madeira, estiveram presentes em proporções variadas entre as amostras, porém, ocorrem em todos os sítios de fundeio. Em um trabalho realizado por PALACIOS (2009), parcelas de madeira foram fundeadas em locais geograficamente distantes e observou-se esta mesma relação, que também foi observada por FAGERVOLD (2012-2013) e BIENHOLD (2013): As comunidades microbianas em parcelas de madeira, no fundo oceânico, mudam de acordo com o estágio de decomposição, devido a mudanças químicas nas parcelas, havendo menor influência da localização geográfica.



**Figura 10** - Gráfico de barras evidenciando a abundância dos filos mais representativos (abundância superior à 0,1%) nos biofilmes das parcelas de madeira (M), no substrato sintético (S) e nas vértebras (V) de baleia coletados no sítio Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ) e São Paulo (SP).



**Figura 11** - Gráfico de barras evidenciando a abundância das classes mais representativas (abundância superior à 0,1%) nos biofilmes das parcelas de madeira (M), no substrato sintético (S) e nas vértebras (V) de baleia coletados no Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ) e São Paulo (SP).



### **Composição taxonômica dos biofilmes das vértebras de baleia**

Nos biofilmes coletados nas vértebras de baleia, foram encontrados quatro filós mais abundantes: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Parcubacteria (Figura 10). Dentro desses filós, as nove classes mais abundantes foram: Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, Clostridia, Flavobacteriia e Bacteroidia (Figura 11).

O filo dominante foi Proteobacteria (50,1%), assim como nas parcelas de madeira. As classes Deltaproteobacteria (27,4%) e Epsilonproteobacteria (17,7%) foram as classes dominantes neste filo, estando presente em todas as amostras dos três sítios de fundeio. A classe Alphaproteobacteria representou 2,8% das classes amostradas, estando presente em todas as amostras, porém, difere das amostras de madeira, em que Alphaproteobacteria foi a classe dominante entre todos os filós. Gammaproteobacteria representou 2,0% das classes amostradas e não foi encontrada nas amostras VRJ1 e VRJ3. Os trabalhos de DEMING et al (1997) e WIKLUND et al (2007), relataram a presença de Gammaproteobacteria em amostras de biofilme que cresceram sobre ossos de baleia. As análises foram realizadas através de microscopia, onde relataram a presença de grupos morfologicamente distintos como, cocos, bastonetes e principalmente bactérias filamentosas, que foram atribuídas ao gênero *Beggiatoa*, pertencente à classe Gammaproteobacteria, oxidadora de sulfeto, elemento abundante durante a decomposição das vértebras.

A classe Deltaproteobacteria compreende organismos redutores de sulfato e enxofre, utilizando este composto como aceptor final de elétrons e necessitando de matéria orgânica como fonte de carbono. O sulfato é abundante na água do mar, enquanto as vértebras de baleia são ricas em matéria orgânica. Epsilonproteobacteria, por outro lado, abrigam organismos oxidadores de sulfeto, que é produzido pelas redutoras de sulfato, explicando, provavelmente, a dominância destas duas classes nas vértebras de baleia e evidenciando a relação entre os grupos presente nas vértebras.

Assim como nas amostras da madeira, o segundo filo mais abundante das amostras das vértebras foi o Bacteroidetes (17,8%), abrigando a classe Bacteroidia, terceira classe mais abundante das amostras (13,7%), foi encontrada em todas as amostras dos três sítios de fundeio. Flavobacteriia, também pertencente a este filo, representou 4,0% das classes encontradas em nossas amostras de vértebras e

esteve presente em todas as amostras fundeadas. Ambas as classes, pertencentes ao filo Bacteroidetes, foram encontradas nas amostras de madeira e estiveram presentes em todas as estações de fundeio, sendo Flavobacteriia a segunda classe mais abundante dos biofilmes das madeiras.

O terceiro filo mais abundante nas amostras estudadas foi Parcubacteria, representando 10,5% dos filios encontrados, sem representantes de classe identificada nas amostras estudadas. Este filo esteve presente em todas as amostras e com ocorrência semelhante entre os sítios de fundeio, sendo mais representativo nas amostras localizadas no sítio Espírito Santo, diferindo das amostras de madeira, onde representou apenas 1% dos filios encontrados. Organismos deste grupo são relacionados ao ciclo do enxofre e nitrogênio em condições anóxicas (WRIGHTON et al., 2012), sendo a vértebra local adequado para o crescimento deste grupo.

Firmicutes representou 8,6% dos filios encontrados, com a classe Clostridia representando 8,6% das classes amostradas. Esta classe apresentou prevalência nas amostras do Espírito Santo, principalmente em VES1 e não esteve presente na amostra VSP3. Nas amostras de madeira, Clostridia também esteve presente e representou 3,6% das classes amostradas. Organismos deste filo apresentam metabolismo de homo e heterofermentação, liberando como produto final ácido láctico, acetona e butanol, que podem ser utilizados fonte de carbono para outros organismos.

A comparação dos nossos dados com a literatura é limitada, pois os trabalhos de ecologia de carcaça de baleia estão focados nas comunidades de invertebrados, havendo poucos relatos sobre ecologia microbiana e descrição taxonômica dos grupos que colonizam esses ossos, dando maior relevância a este trabalho.

### **Composição taxonômica das parcelas de material sintético**

Nos biofilmes encontrados nas parcelas de material sintético, foram encontrados seis filios mais abundantes: Proteobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Parcubacteria (Figura 10). Dentro desses filios, as classes mais abundantes foram: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, Flavobacteriia (Figura 11).

O filo dominante nas parcelas de material sintético, assim como as amostras da madeira e vértebra foi o Proteobacteria (62,9%). Alphaproteobacteria (47,6%) foi a classe dominante nessas amostras, semelhante as amostras da madeira e oposto as amostras da vértebras.

A classe Betaproteobacteria (1,7%) esteve presente em todas as amostras dos três sítios de fundeio, principalmente no sítio Espírito Santo, diferindo tanto das amostras de madeira, como das amostras de biofilme das vértebras, as quais não apresentaram esta classe. A Gammaproteobacteria representou 11,5% das classes amostradas e ocorreu em todas as amostras de material sintético analisadas. Esta classe ocorreu em porcentagem elevada quando comparada com os materiais das madeiras (5,9%) e das vértebras (2,0%).

A classe Deltaproteobacteria (1,4%) ocorreu em pequena proporção em todas as amostras dos sítios de fundeio. Epsilonproteobacteria (0,6%), também em pequena proporção e ausente em SES2. Já nas amostras das vértebras, Deltaproteobacteria e Epsilonproteobacteria foram às classes dominantes nas amostras avaliadas.

Resultados semelhantes para a classe Gammaproteobacteria foram encontrados por MEIER et al (2013), que mantiveram um equipamento oceanográfico composto por estruturas plásticas e de vidro por 10 dias a 4.700 metros de profundidade no Oceano Pacífico, a fim de avaliar o crescimento de biofilmes em tais materiais sintéticos, observando prevalência da classe Gammaproteobacteria em ambos os substratos. Em outro trabalho realizado por WAHL et al (2013), avaliando o crescimento de biofilmes em materiais sintéticos (placas de acrílico e placas plásticas) no ambiente marinhos costeiros, foi relatada a prevalência das classes de Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria, enquanto Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Epsilonproteobacteria foram encontrados com baixa abundância.

O segundo filo mais abundante nas amostras de material sintético foi Bacteroidetes, representando 13,2% dos filios encontrados. A classe Flavobacteriia foi amostrada em todas as amostras sintéticas analisadas e foi a segunda classe mais abundante desse material (12,9%), assim como nas amostras de madeira. A classe Bacteroidia, encontrada nas amostras de madeira e vértebra não foi encontrada nas amostras sintéticas. SWEET et al (2011), analisaram o crescimento

de biofilme em corais artificiais em regiões costeiras, onde a classe Flavobacteriia esteve presente entre as classes amostradas, assim como no presente trabalho. Em um trabalho desenvolvido por LEE et al (2014), o filo Bacteroidetes foi um dos filios mais representativos em placas de PVC e alumínio, assim como nos materiais sintéticos analisados neste estudo.

O filo Planctomycetes (6,7%) foi o quarto filo mais abundante destas amostras, estando presente também nas amostras de madeira e ausente nas amostras de vértebra de baleia. A classe Phycisphaerae, pertencente a este filo, representou 3,0% das classes encontradas nos materiais sintéticos e esteve presente em todas as amostras.

O trabalho realizado por LEE et al (2014), observou a presença do filo Planctomycetes em materiais sintéticos fundeados, assim como a presença do filo Actinobacteria, que no presente trabalho, correspondeu a 5,6% dos filios amostrados.

O filo Parcubacteria representou 2,4% dos filios encontrados nas parcelas de material sintético. Não houve ocorrência de classes abundantes dentro deste filo nas amostras estudadas. Este grupo esteve ausente nas amostras de madeira, porém, foi encontrado com alta incidência nas amostras de biofilme das vértebras.

Como mencionado anteriormente, as parcelas de material sintético não apresentaram crescimento aparente de biofilme, no entanto, no ambiente marinho, as superfícies submersas de quaisquer materiais tendem a adsorver moléculas orgânicas que rapidamente formam uma película superficial orgânica (SWEET et al., 2011). Esta superfície, contendo matéria orgânica depositada, favorece a fixação e colonização por comunidades microbianas (SWEET et al., 2011).

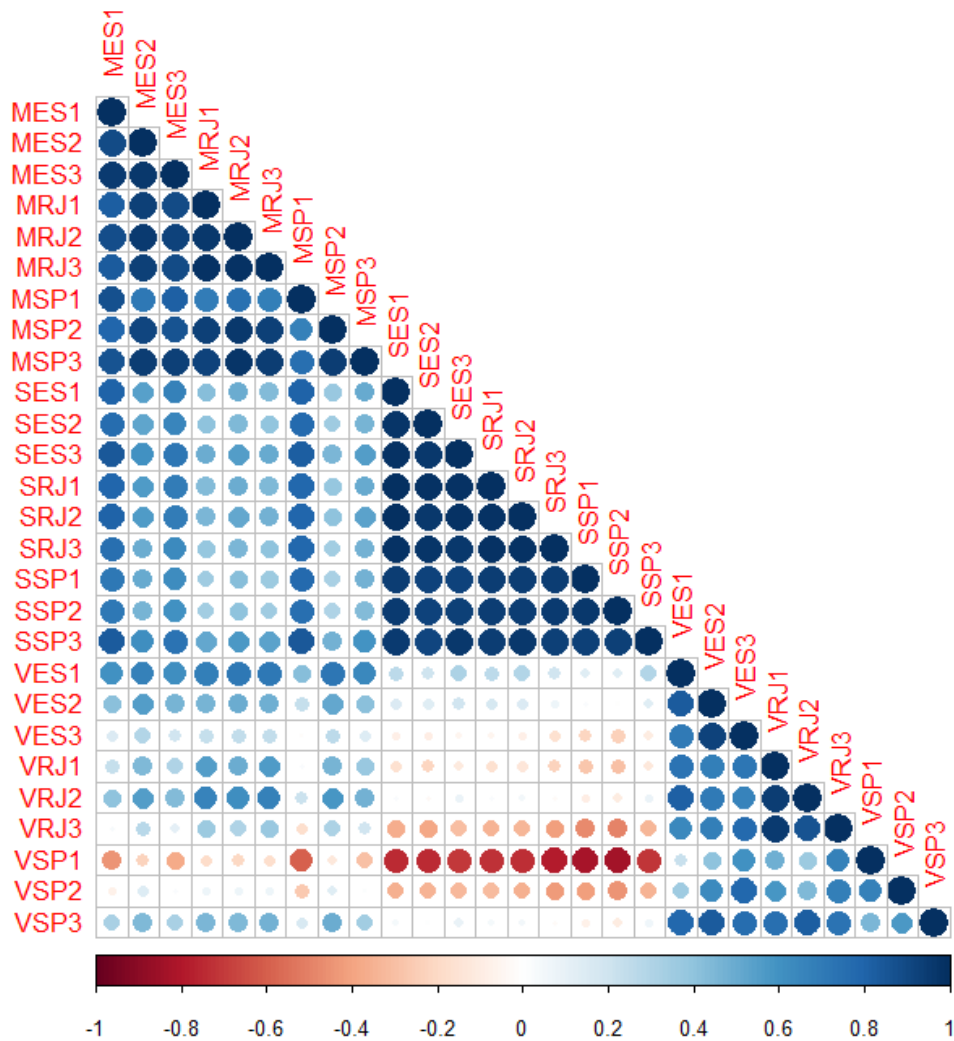
Estudos de formação de biofilmes sobre materiais sintéticos tem o foco de avaliar os danos causados por esses microrganismos em instrumentos oceanográficos e em plataformas implantadas em regiões marinhas (HEAD et al., 2004). Diferentes materiais sintéticos já foram submersos para avaliação do tempo e capacidade de formação de biofilmes. DONLAN (2001) afirma que as características do substrato têm forte efeito sobre o desenvolvimento dessas comunidades. SWEET et al (2011) encontraram maior diversidade de microrganismos em estruturas rugosas em comparação com superfícies lisas, as quais apresentariam diferentes nichos, propiciando a diversidade de colonizadores. Por outro lado, LEE et al (2014)

afirmam que as condições ambientais e o tempo de imersão podem ser fatores mais influentes para a estruturação das comunidades microbianas do que a composição e textura do substrato artificial.

Por utilizarmos apenas um tipo de substrato sintético com textura rugosa e por ainda haver poucos trabalhos envolvendo a formação de biofilmes nesses substratos, principalmente em mar profundo, não podemos confirmar esse tipo de relação neste trabalho, porém, a caracterização taxonômica, aqui descrita, contribuirá para melhor entendimento da colonização desses materiais.

Comparando os três substratos estudados, vimos que os filos Proteobacteria e Bacteroidetes foram os mais abundantes nos três substratos, enquanto os filos Actinobacteria e Planctomycetes estiveram presentes apenas nas amostras das madeiras e sintéticos. Parcubacteria foi compartilhado apenas entre as amostras da vértebra e do material sintético. As classes mais abundantes dos biofilmes da madeira foram Alphaproteobactéria (40,8%), Flavobacteriia (19,9%) e Epsilonproteobacteria (8,3%), as mais abundantes das vértebras de baleia foram Deltaproteobacteria (27,4%), Epsilonproteobacteria (17,7%) e Bacteroidia (13,7%). As classes mais abundantes no material sintético foram Alphaproteobacteria (47,6%), Flavobacteriia (12,9%) e Gammaproteobacteria (11,5%).

Um Gráfico de Correlação (Figura 12) representando as 1.758 OTUs encontradas nas 27 amostras evidenciou as OTUs compartilhadas entre os mesmos substratos e entre substratos diferentes. Comparando o substrato vértebra com o substrato sintético nota-se que houve poucas OTUs sendo compartilhadas (vermelho claro e escuro). Comparando o substrato vértebra e o substrato madeira há menos OTUs sendo compartilhadas (azul claro e alguns pontos vermelhos) do que comparando o substrato madeira com o substrato sintético (azul claro e escuro). Essa relação mais próxima entre as comunidades da madeira e do sintético é justificada pelos grupos que dominam ambos os substratos, onde os filos mais abundantes são compartilhados entre madeira e sintético, aumentando o número de OTUs compartilhadas. Quando comparamos as OTUs compartilhadas entre os mesmos substratos vemos que o substrato que menos compartilha OTUs entre si são as amostras das vértebras, enquanto o substrato com maior quantidade de OTUs compartilhadas entre si foi o sintético.



**Figura 12** - Gráfico de correlação representando as OTUs compartilhadas entre as amostras coletadas nos substratos sintéticos e nos biofilmes dos substratos orgânicos nas três estações de fundeio. Gráfico de correlação baseado em Spearman.

Para verificar se houve diferença significativa entre as comunidades dos diferentes substratos foi realizado a Análise de Similaridade (ANOSIM) (Tabela 5). Através desta análise, avaliamos se houve diferença significativa entre as amostras dos três substratos (sintético, madeira e vértebra) nos três sítios de fundeio (ES, RJ e SP), obtendo valor de  $p = 0,001$  e valor de  $R = 0,8818$ , mostrando que houve diferença significativa entre os três substratos. Comparando apenas as amostras de material sintético com as amostras de biofilme das madeiras obtivemos valor de  $p = 0,001$  e valor de  $R = 0,8590$  mostrando diferença significativa entre esses dois substratos. O mesmo foi realizado para as amostras de material sintético e as

amostras de biofilme das vértebras de baleia, obtendo assim, o valor de  $p = 0,001$  e  $R = 0,9910$ , sendo esses dois substratos significativamente diferentes. Comparando os biofilmes do substrato madeira com o substrato vértebra, vimos que também houve diferença significativa entre eles.

Apesar dos três substratos mostrarem-se significativamente diferentes, quando observamos os valores de  $R$  vemos que as amostras de material sintético e os biofilmes das vértebras de baleia mostraram-se mais distantes ( $R = 0,9910$ ) do que comprando as amostras de material sintético com as amostras de biofilme da madeira ( $R = 0,8590$ ), assim como observado no Gráfico de Correlação (Figura 12) em que vemos uma maior quantidade de OTUs compartilhadas entre os materiais sintéticos e os biofilmes da madeira e uma menor quantidade sendo compartilhada entre o substrato sintético e os biofilmes da vértebra. Essa relação também foi observada nos gráficos de taxonomia (Figura 10 e 11) em que o substrato sintético e os biofilmes das madeiras compartilharam as duas classes mais abundantes, enquanto o substrato sintético e os biofilmes das vértebras de baleia mostraram-se mais distantes em relação as classes mais abundantes.

**Tabela 5** - Análise de Similaridade (ANOSIM) entre os substratos e os sítios de fundeio.

| <b>Comparações</b>         | <b>Valor de <math>p</math></b> | <b>Valor de <math>R</math></b> |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Sintético/Madeira/Vértebra | 0,001                          | 0,8818                         |
| Sintético/Madeira          | 0,001                          | 0,8590                         |
| Sintético/Vértebra         | 0,001                          | 0,9910                         |
| Madeira/Vértebra           | 0,001                          | 0,9235                         |

Valores de  $p$  indicam significância entre as categorias analisadas. Valores iguais ou abaixo de 0,05 são considerados significativamente distintos. Os valores de  $R$  variam de 0 à 1, onde a proximidade à 1 indica maior separação entre as amostras.

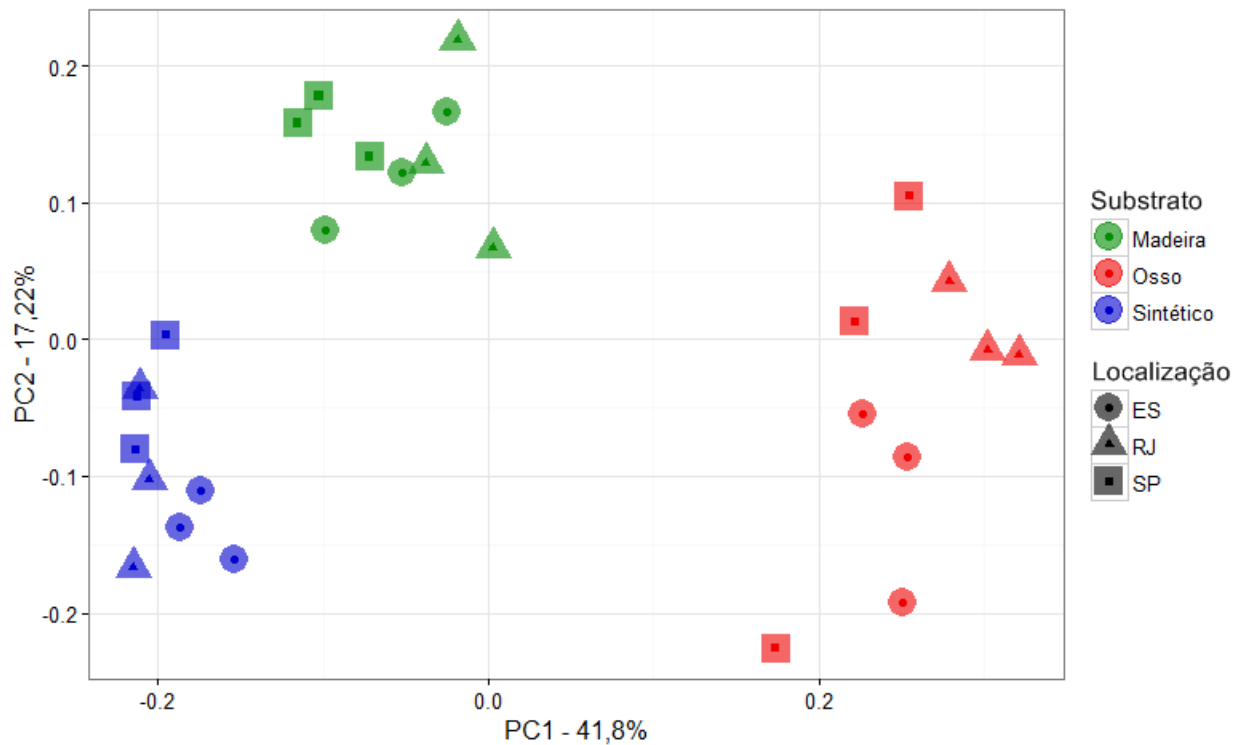
### **5.5 Influência da localização geográfica sob as comunidades bacterianas dos substratos sintéticos e os biofilmes das parcelas orgânicas**

Estudos de biogeografia microbiana demonstraram que as condições ambientais locais (*i.e.* temperatura e salinidade) e as interações que ocorrem entre as comunidades microbianas são fatores mais importantes na distribuição das populações do que os fatores regionais, como a distância espacial entre ecossistemas (QUISPEL, 1998). Sabe-se também que organismos procariontes, em

geral, não atingem grandes distâncias espaciais, nem ultrapassam barreiras geográficas de forma ativa (FINLAY; ESTEBAN, 2007). A dispersão desses organismos ocorre de forma passiva, sejam carreados por outros organismos, dispersão pelo vento ou por correntes oceânicas (FINLAY; ESTEBAN, 2007).

Neste estudo, os mesmos substratos foram fundeados em locais geograficamente distantes, com a intenção de avaliar se as comunidades bacterianas seriam restritas ao sítio de fundeio ou se estariam sendo compartilhadas mesmo em áreas geograficamente distantes, além de avaliar a influência do substrato na estruturação das comunidades. Para essa avaliação, foi realizada a Análise de Componente Principal (PCoA) (Figura 13) utilizando o índice *weighted UniFrac*, que mede a distância filogenética dos taxos baseados em uma árvore filogenética (LOZUPONE; KNIGHT, 2005). Através desta análise foi evidenciada a separação das amostras em três grupos distintos: substrato sintético, parcelas de madeira e vértebras de baleia, revelando, inicialmente, maior influência do substrato na separação das amostras. Este fato pode ter sido favorecido pela presença da ACI e APAN nos três sítios de fundeio, à 3.300 metros de profundidade, seguindo a corrente do Brasil no sentido Sul, podendo agir como um dispersor dessas comunidades microbianas, além de fatores como temperatura, salinidade, profundidade e tempo de fundeio serem semelhantes entre as localizações, contribuindo para o estabelecimento de comunidades semelhantes entre os estados.





**Figura 13** - Análise de Componente Principal (PCoA) evidenciando a separação das amostras em três grupos: (azul) parcelas de material sintético; (verde) parcelas de madeira e (vermelho) vértebras de baleia. PC1: 41,8% e PC2: 17,22%. UniFrac.

Para avaliarmos se as características macroscópicas dos biofilmes, como a coloração, seriam fatores capazes de diferenciar as comunidades de bactérias e avaliarmos a similaridade entre os biofilmes do mesmo substrato e a influência da localização geográfica, foi construído um dendrograma (Figura 14) com as OTUs compartilhadas.

Inicialmente, observamos a formação de dois grandes *clusters*, um formado apenas pelas amostras de biofilme das vértebras e outro formado pelas amostras de biofilme da madeira e do material sintético, corroborando com os resultados anteriores, que mostraram maior proximidade entre esses dois substratos (Figura 11; Figura 12; Tabela 5).

Posteriormente, observamos a separação das amostras em três *clusters*, cada *cluster* abrigou amostras de um substrato específico: um *cluster* foi formado apenas pelas amostras de biofilme das vértebras (em vermelho), outro *cluster* formado apenas pelas amostras do material sintético (em azul) e outro *cluster* formado apenas pelas amostras de biofilme das parcelas de madeira (em verde),

mostrando a forte influência do substrato na composição das comunidades bacterianas.

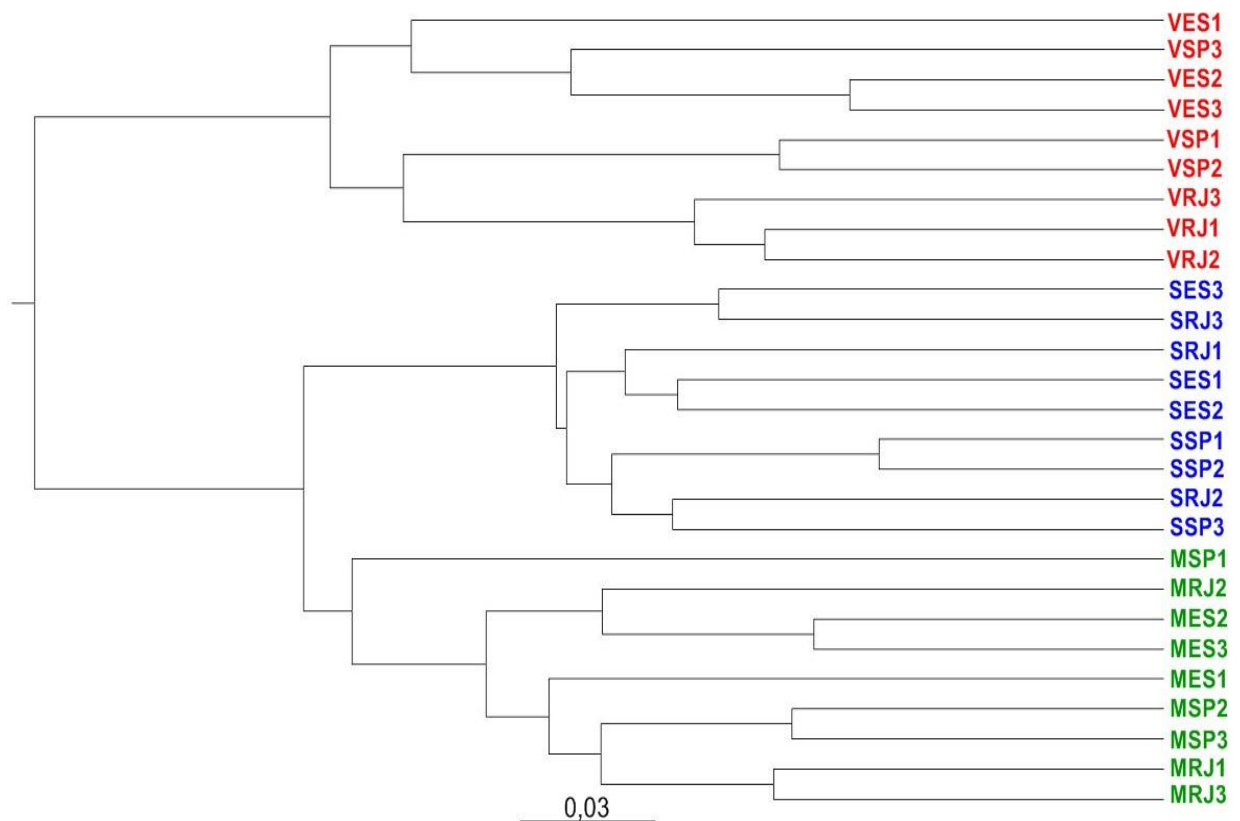
Nas parcelas de madeira localizadas no sítio Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, coletamos biofilmes pretos (MES1 e MRJ1), biofilmes beges (MES2, MRJ2 e MSP2), biofilmes amarelos (MES3, MRJ3 e MSP3) e biofilmes brancos (MSP1) (Figura 15).

Analisando o dendrograma vemos que a caracterização visual dos biofilmes não influenciou na similaridade entre as amostras de madeira, não havendo agrupamento pelo aspecto macroscópico. Quando levamos em consideração os sítios de fundeio, vimos que os pares de amostras MES2 e MES3; MSP2 e MSP3; MRJ1 e MRJ3 mostraram-se mais próximos entre si.

Para as vértebras, temos registros de biofilmes com diferentes colorações em carcaças de baleia, como já descritos por TREUDE et al (2009), que registraram a presença de biofilmes brancos e amarelos em torno dos ossos. SMITH et al (2014) encontraram biofilmes de coloração branca e rosa sobre as carcaças, porém não foram feitas análises taxonômicas desses materiais. Nas vértebras coletadas neste trabalho, foram encontrados biofilmes brancos (VES2, VES3, VRJ3 e VSP3), biofilmes amarelos (VES1, VRJ1, VRJ2 e VSP1) e biofilme preto (VSP2) (Figura 15).

Analisando a distribuição das amostras das vértebras no dendrograma, vemos que os pares que se mostraram mais próximos VES2 e VES3; VRJ1 e VRJ2 compartilham a coloração branca e amarela respectivamente. *Clusters* foram formados apenas com as amostras do Rio de Janeiro (VRJ1, VRJ2 e VRJ3), amostras do Espírito Santo (VES2 e VES3) e São Paulo (VSP1 e VSP2). Considerando essas amostras, a localização geográfica mostrou-se um fator mais influente na distribuição das amostras que o aspecto macroscópico.

Nos materiais sintéticos houve agrupamento entre as amostras localizadas no sítio de São Paulo (SSP1 e SSP2) e Espírito Santo (SES1 e SES2). As demais amostras ficaram dispersas dentro do *cluster* formado pelas amostras sintéticas e como não houve formação aparente de biofilme, o fator macroscópico não pode ser observado.



**Figura 14** - Dendrograma evidenciando a similaridade entre as 27 amostras coletadas nos três diferentes substratos, considerando as OTUs totais. Agrupamento realizado através do Coeficiente de Similaridade Bray Curtis.

Além do dendrograma baseado em Bray Curtis, foi realizada a Análise de Similaridade (ANOSIM) entre os substratos e entre os sítios de fundeio (Tabela 6).

Quando comparamos as amostras de cada sítio de fundeio (considerando cada Estado como um conjunto), vimos que todas as amostras coletadas no Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo não são significativamente diferentes entre elas ( $p = 0,498$ ).

Considerando apenas as vértebras de baleia do ES, RJ e SP vemos que houve diferença significativa entre os sítios de fundeio ( $p = 0,002$ ), mostrando a influência não apenas do substrato, mas também da localização geográfica. Para o substrato sintético, observamos que a diferença entre as amostras dos diferentes sítios de fundeio também foram significativamente diferentes ( $p = 0,02$ ), mostrando, também, a influência da localização geográfica para este substrato.

Quando analisamos os biofilmes coletados nas parcelas de madeira, vimos que não houve diferença significativa ( $p = 0,155$ ) entre os sítios de fundeio, onde os grupos taxonômicos que colonizaram as nove amostras nos três sítios de fundeio não foram significativamente diferentes, provavelmente, pela questão levantada por

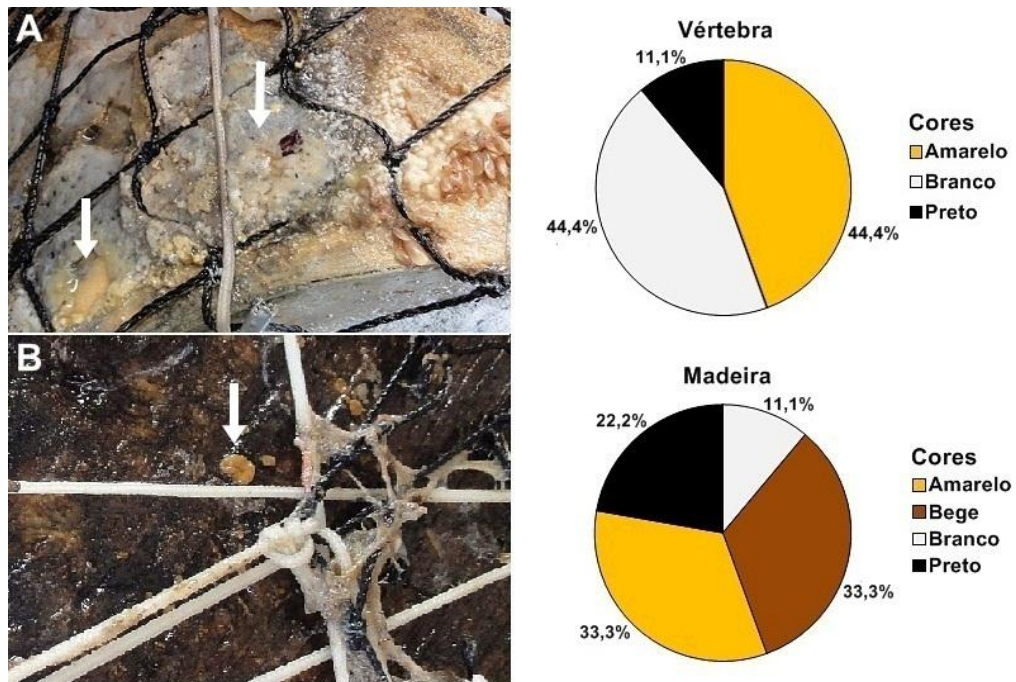
FOGERVOLD (2012-2013) e BIENHOLD (2013) em que afirmaram que as comunidades microbianas de parcelas de madeira no assoalho marinho, seriam moldadas pelo tempo de decomposição, devido a mudanças químicas da madeira e, neste trabalho, todas as parcelas tiveram o mesmo tempo de fundeio sobre condições ambientais e profundidades semelhantes, onde possivelmente, estavam no mesmo estágio de decomposição. Os mesmos autores ressaltam que a influência exercida pela localização geográfica é menor do que comparada ao estágio de decomposição, corroborando com o presente trabalho.

Com base no dendrograma apresentado e na Análise de Similaridade (ANOSIM), observamos a forte influência do substrato na composição das comunidades bacterianas. A localização geográfica mostrou-se influente para as amostras da vértebra de baleia e material sintético, para as amostras da madeira a distância geográfica não foi um fator determinante na estruturação das comunidades.

**Tabela 6** - Análise de Similaridade (ANOSIM) entre os sítios de fundeio.

| <b>Comparações</b>    | <b>Valor de <math>p</math></b> | <b>Valor de R</b> |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------|
| Sintético no ES/RJ/SP | 0,020                          | 0,4732            |
| Madeira no ES/RJ/SP   | 0,155                          | 0,1604            |
| Vértebra no ES/RJ/SP  | 0,002                          | 0,5884            |
| ES/RJ/SP              | 0,498                          | -0,0086           |

Valores de  $p$  indicam significância entre as categorias analisadas. Valores iguais ou abaixo de 0,05 são considerados significativamente distintos. Os valores de R variam de 0 à 1, onde a proximidade à 1 indica maior separação entre as amostras.



**Figura 15** - Imagem A evidenciando uma vértebra de baleia com biofilme amarelo e branco indicado pelas setas. Imagem B evidenciando uma parcela de madeira com biofilme bege indicado pela seta. Gráficos de setores evidenciando as cores dos biofilmes encontrados nas vértebras e parcelas de madeira.

Este trabalho obteve informações taxonômicas inéditas sobre a colonização de parcelas sintéticas e orgânicas no Atlântico sudoeste profundo, porém, ainda não nos permite concluir qual a verdadeira sucessão ecológica na colonização desses substratos, uma vez que as amostras utilizadas neste estudo não avaliou a série temporal dessa colonização e os trabalhos semelhantes são escassos, entretanto, nossos resultados abrem portas para trabalhos futuros na área.

## 6 CONCLUSÕES

- Considerando os grupos abundantes, o substrato vértebra mostra-se mais diverso, porém, quando atribuímos pesos iguais aos grupos abundantes e raros, o material sintético mostra-se mais diverso. O substrato madeira possui maior riqueza que os demais substratos.
- Houve diferença significativa na composição das comunidades entre os substratos estudados. Os filos mais abundantes nos substratos sintéticos e orgânicos foram Proteobacteria e Bacteroidetes. As classes Alphaproteobacteria, Flavobacteriia e Epsilonproteobacteria foram as dominantes nos biofilmes da madeira. Alphaproteobacteria, Flavobacteriia e Gammaproteobacteria foram as classes dominantes nos substratos sintéticos e as classes Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria e Bacteroidia foram as dominantes nos biofilmes das vértebras de baleia.
- As comunidades bacterianas não foram significativamente diferentes entre os sítios de fundeio (Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo).
- Não houve diferença significativa entre as amostras de biofilme da madeira coletada nos diferentes sítios de fundeio, porém, para as amostras de material sintético e para os biofilmes das vértebras houve diferença significativa entre os sítios de fundeio.

## REFERÊNCIAS\*

ALLISON, P. A.; SMITH, C. R.; KUKERT, H.; DEMING, J. W.; BENNETT, B. A. Deep-water taphonomy of vertebrate carcasses: a whale skeleton in the bathyal Santa Catalina Basin. **Paleobiology**, v. 17, p. 78–89, 1991.

AN, Y. H.; DICKINSON, R. B.; DOYLE, R. J. Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections. In: AN, Y. H.; FRIEDMAN, R. J. (eds), **Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications**. Totowa, N.J.: Humana Press, 2000. p. 1–27.

ANDERSON, M. W.; SCRIVVER, I. Next generation DNA sequencing and the future genomic medicine. **Gene**, v. 1, n. 1, p. 38-69, 2010.

ANDERSON, W. F.; AKIN, D. E. Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 35, n. 5, p. 355-366, 2008.

ANSORGE, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. **New Biotechnology**, Amsterdam, v.5, n. 4, p. 195-203, 2009.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, p. 2-11, 2010.

ASSINE, M. L.; CORRÊA, F. S.; CHANG, H. K. Migração de depocentros na Bacia de Santos: importância na exploração de hidrocarbonetos. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 38, n. 2 (supl.), p. 111-127, 2008.

---

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: Referências: elaboração. Rio de Janeiro 2002.

BACO, A. R., SMITH, C. R., PEEK, A., RODERICK, G., VRIJENHOEK, R. C. The phylogenetic relationships of whale-fall vesicomyid clams based on mitochondrial COI DNA sequences. **Marine Ecology Progress**, v. 182, p. 137-147, 1999.

BACO, A. R.; SMITH C. R. High species richness in deep-sea chemoautotrophic whale skeleton communities. **Marine Ecology Progress**, v. 260,p. 109–114, 2003.

BATY, A. M.; EASTBURN, C. C.; TECHKARNJANARUK, S.; GOODMAN, A. E.; GEESEY, G. G. Spatial and temporal variations in chitinolytic gene expression and bacterial biomass production during chitin degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3574–3585, 2000.

BAYER, E.; SHOHAM, Y.; LAMED, R. Lignocellulose-Decomposing Bacteria and Their Enzyme Systems. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (eds). **The Prokaryotes**. Heidelberg: Springer, 2013.p. 215-266.

BEER, D. D., STOODLEY, P., LEWANDOWSKI, Z. Liquid Flow in Heterogeneous Biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 636-641, 1994.

BELLOU, N.; PAPATHANASSIOU, E.; DOBRETISOV, S.; LYKOUSIS, V.; COLIJN, F. The effect of substratum type, orientation and depth on the development of bacterial deep-sea biofilm communities grown on artificial substrata deployed in the Eastern Mediterranean. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 28, n. 2, p. 199-213, 2014.

BENNETT, B. A., SMITH, C.R., GLASER, B., MAYBAUM, H.L. Faunal community structure of a chemoautotrophic assemblage on whale bones in the deep northeast Pacific Ocean. **Marine Ecology Progress**, v. 108, p. 205–223, 1994.

BERNHARD, A. E.; MARSHALL, D.; YIANNOS, L. Increased variability of microbial communities in restored salt marshes nearly 30 years after tidal flow restoration. **Estuaries and Coasts**, Columbia, v. 35, p. 1049-1059, 2012.



BHAVANA, M.; PRASAD, K. S.; RAJAGOPAL., S. V. Screening and isolation of antagonistic Actinobacteria from marine sediments of Visakhapatnam sea coast. **International Journal of Pharmaceutical., Chemical and Biological Sciences**, v. 3, p. 767-770, 2013.

BOARI, C. A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por Aeromonashydrophila e Staphylococcus aureus sob diferentes condições de cultivo**. 2008. 80f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BÖCKER, S. Sequencing from compomers: using mass spectrometry for DNA de novo sequencing of 200+ nt. **Journal Computational Biology**, 11, n. 6, p. 1110-1134, 2004.

BOER, A. W.; FOLMAN, A. L. B.; SUMMERBELL, B. R. C.; BODDY, L. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. **FEMS Microbiology Reviews**, Netherlands, v. 29, p. 795–811, 2005.

BOKULICH, N.; SUBRAMANIAN, S.; FAITH, J. J.; GEVERS, D.; GORDON, J. I.; KNIGHT, R.; MILLS, D. A.; CAPORASO, J. G. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. **NatureMethods**, v. 10, p. 57–59, 2013.

BONDOSO, J.; ALBUQUERQUE, L.; NOBRE, M. F.; LOBO-DA-CUNHA, A.; COSTA, M. S.; LAGE, O. M. *Aquisphaera giovannonii* gen. nov., sp. Nov., a Planctomycete isolated from a freshwater aquarium. **International Journal of Systematic and Evolutive Microbiology**, Reading, v. 61, p. 2844-2850, 2011.

BRASLAVSKY, I.; HEBERT, B.; KARTALOV, E.; QUAKE, S. R. Sequence information can be obtained from single DNA molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A**, v. 100, n. 7, p. 3960-4000, 2003.

BRAY, J. R.; CURTIS, J. T., 1957. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, v. 27, p. 325–349, 1957.

BRINKHOFF, T.; SIEVERT, S. M.; KUEVER, J.; MUYZER, G. Distribution and diversity of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. at a shallow-water hydrothermal vent in the Aegean Sea (Milos, Greece). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3843-3849, 1999.

BRYANT, J. A.; STEWART, F. J.; EPPLEY, J. M.; DELONG, E. F. Microbial community phylogenetic and trait diversity declines with depth in a marine oxygen minimum zone. **Ecology**, v. 93, n. 7, p. 1659–1673, 2012.

BUTLER, M.J.; DAY, A. W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n.12, p. 1115–1136, 1998.

BUTMAN, C. A.; CARLTON, J. T.; PALUMBI, S. R. Whaling effects on deep-sea biodiversity. **Conservation Biology**, v. 9, p. 462–464, 1995.

CAIXETA, D. O. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008. 75 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CAMPOS, V. L.; ESCALANTE, G.; YAÑEZ, J.; ZAROR, C. A.; MONDACA, M. A. Isolation of arsenite-oxidizing bacteria from a natural biofilm associated to volcanic rocks of Atacama Desert, Chile. **Journal Basic Microbiology**, v. 49, p. 593–597, 2009.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 108, p. 4516–4522, 2011.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.

CAPORASO, J. G.; PASZKIEWICZ, K.; FIELD, D.; KNIGHT, R.; GILBERT, J. A. The Western English Channel contains a persistent microbial seed bank. **ISME Journal**, v. 6, p. 1089–1093, 2012.

CARPENTIER, B., CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal Applied Bacteriology**, v. 75, p. 499–511, 1993.

CARVALHO, C. C. C. R. Biofilms: recent developments on an old battle. Recent Patentson. **Biotechnology**, Oak Park, v. 1, p. 49-57, 2007.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.

CASTRO, C. B.; PIRES, D. O.; MEDEIROS, M. S.; LOIOLA, L. L.; ARANTES, R. C. M.; THIAGO, C. M.; BERMAN, E. Cnidaria. In: LAVRADO, H. P., IGNACIO, B. L. (eds). **Biodiversidade bêmica da costa central da Zona Econômica Exclusiva Brasileira**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2006. Livros, v. 14, p. 147–192.

CHAISSON, M.; PEVZNER, P.; TANG, H. Fragment assembly with short reads. **Bioinformatics**, v. 20, n.13, p. 2067-2074, 2004.

CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of Classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 11, n. 4, p. 265–270, 1984.

CHAO, A.; LEE, S. M. Estimating the number of Classes via sample coverage. **Journal of the American Statistical Association**, v. 87, n. 417, p. 210–217, 1992.

CHODAK, M.; GOLEBIEWSKI, M.; MORAWSKA-PLOSKONKA, J.; KUDUK, K.; NIKLIŃSKA, M. Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 7–14, 2013.

CHOUARI, R.; LE PASLIER, D.; DAEGELEN, P.; GINESTET, P.; WEISSENBACH, J.; SGHIR, A. Molecular evidence for novel planctomycete diversity in a municipal wastewater treatment plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7354-7363, 2003.

CLARKE, A. J. Biodegradation of cellulose: enzymology and biotechnology. Inc, Pennsylvania, Lancaster, **Technomic Publishing Company**, v. 272, p. 3161-3167, 1997.

CLAUSSEN, J. W. Acclimation abilities of three tropical rainforest seedlings to an increase in light intensity. **Forest Ecology and Management**, v. 80, p. 245-255, 1996.

CORLISS, J. B.; DYMOND, J.; GORDON, L. I.; EDMOND, J. M.; HERZEN, R. P. Submarine thermal springs on the Galapagos Rift. **Science**, v. 203, p. 1073–1083, 1979.

COSTERTON, J. W. K. J.; CHENG, G. G.; GEESEY, T. I.; LADD, J. C.; NICKEL, M.; DASGUPTA; MARRIE, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Reviews Microbiology**, v. 41, p. 435–464, 1987.

COSTERTON, J. W., Z. LEWANDOWSKI, D. E. CALDWELL, D. R. KORBER, AND H. M. LAPPIN-SCOTT. Microbial biofilms. **Annual Reviews Microbiology**, v. 49, p. 711–745, 1995.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CWALA, Z.; IGBINOSA, E.O.; OKON. A. I. Assessment of antibiotics production potentials in four actinomycetes isolated from aquatic environments of the Eastern Cape Province of South Africa. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 118-124, 2011.

DANIEL, G.; NILSSON, T. Developments in the study of soft rot and bacterial decay. In: BRUCE, A., PALFREYMAN, J. W. (eds.), **Forest Products Biotechnology**. Taylor & Francis, 1997, p. 37-62.

DASHTBAN, M; SCHRAFT, H; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosicresiduos; opportunities & perpectives. **I International Journal of Biological Sciences**. v. 5, p. 578-595, 2009.

DASTAGER, S. G.; WEN-JUN, L.; DAYANAND, A.; SHU-KUN, T.; XIN-PENG, T., XIAO-YANG, Z.; LI-HUA, X.; CHENG-LIN, J. Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in Streptomyces. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.8, p. 1131-1134, 2006.

DELONG, E. F.; PACE, N. R. Environmental diversity of Bacteria and Archaea. **Systematic Biology**, v. 50, p. 470–478, 2001.

DEMING, J. W.; MACKO, S. A.; SMITH, C. R. Evidence For The microbial basis of a chemoautotrophic invertebrate community at a whale fall on the deep seafloor: Bone-colonizing bacteria and invertebrate endosymbionts. **Microscopy Research And Technique**, v. 37, p.162–170, 1997.

DHARMARAJ, S., ASHOKKUMAR, B., DHEVENDARAN, K. Fermentative production of carotenoids from marine actinomycetes. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 1, n. 4, p. 36-41, 2009.

DIGGLE, S. P.; GARDNER, A.; WEST, S. A.; GRIFFIN, A. S. Evolutionary theory of bacterial quorum sensing: when is a signal not a signal? **Philosophical Transaction**, Royal Society Londres, v. 362, p. 1241–1249, 2007.

DING, C. H.; JIANG, Z. Q.; LI, X. T.; LI, L. T.; KUSAKABE, I. High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p.7-10, 2004.

DISTEL, D.L.; BACO, A.R.; CHUANG, E.; MORRILL, W.; CAVANAUGH, C.; SMITH, C. R. Do mussels take wooden steps to deep-sea vents? **Nature**, v. 403, p. 725–726, 2000.

DOJANI, S.; LAKATOS, M.; RASCHER, U.; WANER, W.; LUTTGE, U.; BUDEL, B. Nitrogen input by cyanobacterial biofilms of an inselberg into a tropical rainforest in French Guiana. **Flora**, v. 22, p. 521–529, 2007.

DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1387–1392, 2001.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 881–890, 2002.

DOYLE, R. (ed.). **Microbial growth in biofilms**, part A: developmental and molecular biological aspects. *Methods Enzymology*, 2001. p. 19-26.

DUBILIER, N.; BERGIN, C.; LOTT, C. Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis, **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 725–740, 2008.

DUFOUR, D.; LEUNG, V.; LÉVESQUE, C. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. **Endodontic Topics**, v. 22, p. 2–16, 2012.

DUNNE, W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, p. 155-166, 2002.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

EDGAR, R. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature Methods**, v. 10, p. 996–998, 2013.

FAGERVOLD, S. K., BESSETTE, S., ROMANO, C., MARTIN, D., PLYUSCHEVA, M., LE BRIS, N., GALAND, P. E. Microbial communities associated with the degradation of oak wood in the Blanes submarine canyon and its adjacent open slope (NW Mediterranean). *Progress in Oceanography*, v. 118, p. 137-143, 2013.

FAGERVOLD, S. K., GALAND, P.E., ZBINDEN, M., GAILL, F., LEBARON, P., PALACIOS, C. Sunken woods on the ocean floor provide diverse specialized habitats for microorganisms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, n. 3, p. 616–628, 2012.

FELDMAN, R. A.; SHANK, T. M.; BLACK, M. B.; BACO, A. R.; SMITH, C. R.; VRIJENHOEK, R. C. Vestimentiferan on a whale fall. **Biological Bulletin**, v. 194, p. 116-119, 1998.

FINLAY, B. J.; ESTEBAN, G. F. Body size and biogeography. Pp. 167-185. In: HILDREW, A.; RAFFAELLI, D.; EDMONDS-BROWN, R. (eds). *Body size: the structure and function of aquatic ecosystems*. **Cambridge University Press**, p. 343, 2007.

FUCHSMAN, C. A.; STALEY, J. T.; OAKLEY, B. B.; KIRKPATRICK, J. B.; MURRAY, J. W. Free-living and aggregate-associated Planctomycetes in the Black Sea. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 80, p. 402-416, 2012.

FUERST, A. The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. **Microbiology**, v. 141, p. 1493-1 506, 1995.

FUHRMAN, J. A.; MCCALLUM, K.; DAVIS, A. A. Novel major archae bacterial group from marine plankton. **Nature**, v. 356, p. 148–149, 1992.

GAGE, J. D.; TYLER, P. A. Deep Sea Biology: a Natural History of Organisms at the Deep-Sea Floor. Cambridge University Press, Cambridge. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 71, p. 747-748, 1991.

GARCÍA-MOYANO, A.; GONZÁLEZ-TORIL, E.; AGUILERA, Á.; AMILS, R.; AGUILERA, A. Comparative microbial ecology study of the sediments and the water column of Río Tinto, an extreme acidic environment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 81, n. 2, p. 303–14, 2012.

GARRITY, G. M. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. In: **GARRITY, G.; BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, W. (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Berlin Heidelberg New York, Springer, 2001.p. 722.

GAUDRON, S. M.; PRADILLON F.; PAILLERET M.; DUPERRON S.; LE BRIS N. Colonization of organic substrates deployed in deep-sea reducing habitats by symbiotic species and associated fauna. **Marine Environmental Research**, v. 70, p. 1–12, 2010.

GLOVER, A. G.; KALLSTROM, B.; SMITH, C. R.; DAHLGREN, T. G. World-wide whale worms? A new species of *Osedax* from the shallow north Atlantic. **Proceedings of the Royal Society**, v. 272, p.2587-2592, 2005.

GOFFREDI, S. K.; ORPHAN, V. J. Bacterial community shifts in taxa and diversity in response to localized organic loading in the deep sea. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 344-363, 2010.



GOFFREDI, S. K.; WILPISZESKI, R.; LEE, R.; ORPHAN, V. Temporal evolution of methane cycling and phylogenetic diversity of archaea in sediments from a deep-sea whale-fall in Monterey Canyon, California. **ISME Journal**, v. 2, p. 204–220, 2008.

GOLEBIEWSKI, M.; DEJA-SIKORA, E.; CICHOSZ, M.; TRISTYN, A.; WRÓBEL, B. 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. **Microbial Ecology**, v. 67, p. 635-647, 2014.

GORENSTEIN, M. R. **Métodos de amostragem no levantamento da comunidade arbórea em floresta estacional semidecídua**. 2002. 104 f. Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

Greengenes.16S rRNA gene database and workbenckcompatible with ARB. 2012. Disponível em: [http://greengenes.lbl.gov/Download/Sequence\\_Data/Fasta\\_data\\_files/](http://greengenes.lbl.gov/Download/Sequence_Data/Fasta_data_files/).

GUEDON, E.; SPERANDIO, B.; PONS, N.; EHRLICH, S. D.; RENAULT, P. Overall control of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis* by CodY, and possible models for CodY regulation in Firmicutes. **Microbiology**, v. 151, p. 3895–3909, 2005.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTONS, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial Biofilms: From The Natural Environment To Infectious Diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.

HANCOCK, V.; DAHL, M.; KLEMM, P. Probiotic *Escherichia coli* strain Nissle out-competes intestinal pathogens during biofilm formation. **Journal Medical Microbiology**, v. 59, p. 392–399, 2010.

HEAD, R. M.; DAVENPORT, J.; THOMASON, J. C. The effect of depth on the accrual of marine biofilms on glass substrata deployed in the Clyde Sea, Scotland. **Biofouling**, v. 20, p. 177–180, 2004.

HENRICI, A. T. Studies of freshwater bacteria: I. A direct microscopic technique. **Journal Bacteriology**, v. 25, p. 277–287, 1933.

HOYOUX, C.; XBINDEN, M.; SAMADI, S.; GAILL, F.; COMPERE, P. Wood-based diet and gut microflora of galatheid crab associated with Pacific deep-sea wood falls. **Marine Biology**, v. 156, p. 2421–2439, 2009.

HUGONI, M.; TAIB, N.; DEBROAS, D.; DOMAIZON, I.; JOUAN DUFOURNEL, I.; BRONNER, G.; SALTER, I.; AGOGUE, H.; MARY, I.; GALAND, P. E. Structure of the rare archaeal biosphere and seasonal dynamics of active ecotypes in surface coastal waters. **Proceeding of the National Academy Sciences**, USA, v. 110, p. 6004–6009, 2013.

JANNASCH, H. W. Review Lecture: the chemosynthetic support of life and the microbial diversity at deep-sea hydrothermal vents, **Proceeding of de Royal Society B: Biological Science**, v. 225, p. 277–297, 1985.

JANNASCH, H.; WIRSEN, C. O. Chemosynthetic primary production at the East Pacific sea floor spreading centers. **Bioscience**, v. 29, p. 592–598, 1979.

JEFFREY, L. S. H.; SAHILAH, A. M. R.; SON, R.; TOSIAH, S. Isolation and screening of actinomycetes from Malaysian soil for their enzymatic and antimicrobial activities. **Journal of Tropical Agriculture and Food Science**, v. 35, p. 159-164, 2007.

JEON, Y. S.; PARK, S. C.; LIM, J.; CHUN, J.; KIM, B. S. Improved pipeline for reducing erroneous identification by 16S rRNA sequences using the Illumina MiSeq platform. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 60-69, 2015.

JOHNSON, D. B. Geomicrobiology of extremely acidic subsurface environments. **FEMS Microbiol Ecology**, v. 81, n. 1, p. 2–12, 2012.

JORGENSEN, B. B.; BOETIUS, A. Feast and famine – microbial life in the deepsea bed. **Nature Review Microbiology**, v. 5, p. 770–781, 2007.

JUMAS-BILAK, E.; LAURENT ROUDIERE, L.; MARCHANDIN, H. Description of ‘Synergistetes’ phyl.nov.and emended description of the phylum ‘Deferribacteres’ and of the family Syntrophomonadaceae, phylum ‘Firmicutes’. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 1028–1035, 2009.

JURGENS, J. A.; BLANCHETTE, R. A.; CARLSON, D. N. Evaluating the wooden remnants of Tektas Burnu shipwreck. In: KOESTLER, R. J.; KOESTLER, V.H.; CHAROLA, A. E.; NIETO-FERNANDEZ, F. E. (eds.). **Biology and Conservation: Biodeterioration of Works of Art**. New York, Metropolitan Museum of Art, 2003.p. 390–407.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems e Environment**, v. 74, p. 65-76, 1999.

KERSTERS, K.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. Introduction to the Proteobacteria. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. (eds). **The Prokaryotes**, New York, Springer, v. 5, p. 3-37, 2006.

KILIAS, S. P.; NOMIKOU, P.; PAPANIKOLAOU, D. New insights into hydrothermal vent processes in the unique shallow-submarine arc-volcano, Kolumbo (Santorini), Greece. **Scientific Reports**, v. 3, p. 2421, 2013.

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST, C.; HORN, M. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 1-11, 2013.

KOCH, A.; ANDRADE, F. M. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 1, p. 17-23. 2008.

KOKARE, C. R.; CHAKRABORTY, S.; KHOPADE, A. N.; MAHADIK, K. R. Biofilm: importance and applications. **Indian Journal Biotechnology**, v. 8, p. 159–168, 2009.

KOZICH, J. J.; WESTCOTT, S. L.; BAXTER, N. T.; HIGHLANDER, S. K.; SCHLOSS, P. D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. **Applied Environmental Microbiology**, v. 79, p. 5112–5120, 2013.

KROGH, A. Conditions of life at great depths in the ocean. **Ecological Monographs**, v.4, p. 430–439, 1934.

KRUEGER, S.; LEUSCHNER, D.; EHRMANN, W.; SCHMIEDL, G.; MACKENSEN, A.; DIEKMANN, B. Ocean circulation patterns and dust supply into the South Atlantic during the last glacial cycle revealed by statistical analysis of kaolinite/chlorite ratios. **Marine Geology**, v. 253, n. 4, p. 82–91, 2008.

KUNIN, V.; ENGELBREKTSON, A.; OCHMAN, H.; HUGENHOLTZ, P. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 118–123, 2010.

LANDY, E. T.; MITCHELL, J. I.; HOTCHKISS, S.; EATON, R. A. Bacterial diversity associated with archaeological waterlogged wood: ribosomal RNA clone libraries and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, n. 1, p. 106–116, 2008.

LEE, O. O.; WANG, Y.; REMEO, T.; ZHANG, W.; SHEK, C. S.; BOUGOUFFA, S.; AL-SUWAILEM, A.; ZHANG, X.; LAFI, F. F.; TIAN, R.; AL-SUWAILEM, A.; BATANG, Z. B.; XU, W.; WANG, G. C.; BAJIC, V. B.; QIAN, P. Y. In situ environment rather

than substrate type dictates microbial community structure of biofilms in a cold seep system. **Scientific Report**, v. 4, p. 35-87, 2014.

LESCHINE, S. B. Cellulose Degradation in Anaerobic Environments. **Annual Review**, Massachusetts, v. 49, p. 399-426, 1995.

LI, H.; CHEN, S.; MU, B. Z.; GU, J. D. Molecular detection of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria in high-temperature petroleum reservoirs. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, p. 771-783, 2010.

LIESACK, W.; KONIG, H.; SCHLESNER, H.; HIRSCH, P. Chemical composition of the peptidoglycan-free cell envelopes of budding bacteria of the *Pirella/Planctomyces* group. **Archives of Microbiology**, v. 145, p.361-366, 1986.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. **Journal of Hospital Infection**, Londres, v.64,n. 4, p. 313-325, 2006.

LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HU, N.; HE, Y.; Pong, R. Comparison of Next-Generation Sequencing systems. **Journal Biomedicine Biotechnology**, v. 126, p. 11-20, 2012.

LORION, J.; DUPERRON, S.; GROS, O.; CRUAUD, C.; SAMADI, S. Several deep-sea mussels and their associated symbionts are able to live both on wood and on whale-falls. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 276,p. 177-185, 2009.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228–8235, 2005.

LUCCHESI, E. G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes *in vitro* e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. 105 f. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN, W. H. Pistorius IS, Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506–577, 2002.

MAGURRAN, A. E. Ecological Diversity and Its Measurement. **Royal Society**, University Research Fellow, p. 179, 1988.

MARDIS, E. R. A decade's perspective on DNA sequencing technology. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 198–203, 2011.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, p. 376-380, 2005.

MARSH, P. D. Dental plaque. In: Lappin-Scott, H. M.; Costerton, J. W. (eds.). **Microbial biofilms**. New York, N.Y, Cambridge University Press, p. 282–300, 1995.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Jounal Genetic Microbiology**, v. 68, p. 337–348, 1971.

MCCOLLOM, T. M.; SHOCK, E. L. Geochemical constraints on chemolithoautotrophic metabolism by microorganisms in seafloor hydrothermal systems. **Geochimicaet Cosmochimica Acta**, v. 61, p. 4375–4391, 1997.

MEDINI, D.; SERRUTO, D.; PARKHILL, J.; RELMAN, D.A.; DONATI, C.; MOXON, R.; FALKOW, S.; RAPPUOLI, R. Microbiology in the post-genomic era. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p. 419-430, 2008.

MEIER, A.; TSALOGLOU, N. M.; MOWLEM, M. C.; KEEVIL, C. W.; CONNELLY, D. Hyperbaric biofilms on engineering surfaces formed in the deep sea. **Biofouling**:

**The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 29, n. 9, p. 1029-1042, 2013.

METZKER, M. L. Emerging technologies in DNA sequencing. **Genome Research**, v. 15, n. 12, p. 1767-1776, 2005.

MILANI, E. J.; BRANDÃO, J.A.S. L.; ZALÁN, P. V.; GAMBOA, L. A. P. Petróleo na margem continental brasileira: geologia, exploração, resultados e perspectivas. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 18, n. 3, p. 351-396, 2000.

MITRA, R. D.; SHENDURE, J.; OLEJNIK, J.; EDYTA-KRZYMANSK-OLEJNIK, CHURCH, G. M. Fluorescent in situ sequencing on polymerase colonies. **Analytical Biochemistry**, v. 320, p. 55-65, 2003.

MOESENEDER, M. M.; WINTER, C.; HERNDL, G. J. Horizontal and vertical complexity of attached and free-living bacteria of the eastern Mediterranean Sea, determined by 16S rDNA and 16S rRNA fingerprints, **Limnology Oceanography**, v. 46, p. 95–107, 2001.

NAGANUMA, T.; WADA, H.; FUJIOKA, K. Biological community and sediment fatty acids associated with the deep-sea whale skeleton at the Torishima Seamount. **Journal Oceanography**, v. 52, p. 1–15, 1996.

NEDASHKOVSKAYA, O. I.; SEUNG, B. K.; VALERY, V. M. *Maribacterstanieri* sp. nov., a marine bacterium of the family Flavobacteriaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 214–218, 2010.

NELSON, W. C.; STEGEN, J. C. The reduced genomes of Parcubacteria (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 708-713, 2015.

NG, W. L.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum-sensing network architectures. **Annual Reviews Genetic**, v. 43, p. 197-222, 2009.

NOFFKE, N.; ERIKSSON, K. A.; HAZEN, R. M.; SIMPSON, E. L. A new window into Early Archean life: Microbial mats in Earth's oldest siliciclastic tidal deposits (3.2 Ga Moodies Group, South Africa). **Geology**, v. 34, p. 253–256, 2006.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews Microbiology**, v. 54, p. 49–79, 2000.

OLIVEIRA, A. P. G.; SABINO, S. M.; GANDINE, S. M.; MOULIN, T.; AMARAL, A. A. Importância das Actinobacterias em processos ecológicos, industriais e econômicos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 18, p. 3938-3952, 2014.

OLSON, D. M.; DINERSTEIN, E. The Global 200: A representation approach to conserving the Earth's most biologically valuable ecoregions. **Conservation Biology**, v. 12, p. 502–515, 1998.

ORCUTT, B., N.; SYLVAN, J., B.; KNAB, N., J.; EDWARDS, K., J. Microbial Ecology of the Dark Ocean above, at, and below the Sea Floor. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 75, p. 361–422, 2011.

PALACIOS, C.; ZBINDEN, M.; PAILLERET, M.; GAILL, F.; LEBARON, P. Highly similar prokaryotic communities of sunken wood at shallow and deep-sea sites across the oceans. **Microbial Ecology**, v. 58, n. 4, p. 737–752, 2009.

PAREEK, C. S.; SMOCZYNSKI, R.; TRETYN, A. Sequencing technologies and genome sequencing. **Human Genetics Review**, v. 52, p. 413–435, 2011.

PAULL, C. K.; HECKER, B.; COMMEAU, R. Biological communities at the Florida Escarpment resemble hydrothermal vent taxa. **Science**, v. 226, p. 965–967, 1984.

PEREIRA, M. D.; SCHETTINI, C. A. F.; OMACHI, C. Y. Caracterização De Feições Oceanográficas Na Plataforma De Santa Catarina Através De Imagens Orbitais. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 27, n. 1, p. 81-93, 2009.



PEREIRA, M. J.; MACEDO, J. M. A Bacia de Santos: Perspectivas de uma nova província petrolífera na plataforma continental sudeste brasileira. **Boletim de Geociências da Petrobrás**, v. 4, n. 1, p. 3-11, 1990.

PETROSYAN, P.; GÁRCIA-VARELA, M.; LUZ-MADRIGAL., A.; HUITRÓN, C.; FLORES, M.E. *Streptomycesmexicanussp.*, a xylanolytic micro-organism isolated from soil. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p.269-273, 2003.

Qu, J. H.; YUAN, H. L. *Sediminibacterium salmoneum* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from sediment of a eutrophic reservoir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2191-2194, 2008.

QUISPEL, A. Lourens, G. M. Baas Becking (1895- 1963), Inspirator for many (micro)biologists. **International Microbiology**, v. 1, p. 69-72, 1998.

R Development Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>, 2011.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** 2007. 150 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RAO, K.V.R.; KIRAN, C. H. R.; RAO, D. B.; MADHAVI, Y.; RAO, P. K.; RAO, T. R. Antagonistic activities of actino bacteria from mangrove sediment. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 364-367, 2012.

RICO, A.; MCCRAW, S. L.; PRESTON, G. M. The metabolic interface between *Pseudomonas syringae* and plant cells. **Current Opinion Microbiology**, v. 14, p. 31–38, 2011.

RINKE, C.; SCHWIENTEK, P.; SCZYRBA, A.; IVANOVA, N. N.; ANDERSON, I. J.; CHENG, J. F. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. **Nature**, v. 499, p.4311-4317, 2013.

ROMANO, C.; VOIGHT, J.; PLUSCHEVA, M.; MARTIN, D. Submarine canyons as the preferred habitat for wood-boring species of Xylophaga (Mollusca, Bivalvia). **Progress in Oceanography**, v. 118, p. 175–187, 2013.

RONAGHI, M.; UHLÉN, M.; NYRÉN, P. DNA sequencing: a sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science**, v. 281, n. 5375, p. 363-365, 1998.

RONAGHI, M.; KARAMOHAMED, S.; PETTERSSON, B.; UHLEN, M.; NYREN, P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 242, n. 1, p. 84-89, 1996.

ROTHBERG, J. M.; LEAMON, J. H. The development and impact of 454 sequencing. **National Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 17-24, 2008.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 205-211, 2004.

RUIZ-PONTE, C.; CILIA, V.; LAMBERT, C.; NICOLAS, J. L. *Roseobactergallaeciensi* ssp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten maximus*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 537-542, 1998.

SANGER, F.; AIR, G. M.; BARRELL, B. G.; BROWN, N. L.; COULSON, A. R.; FIDDES, C. A.; HUTCHISON, C. A.; SLOCOMBE, P. M.; SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**, v. 24, n. 5596, p. 687-695, 1977.

SCHNEIDER, R. P. Biofilmes Microbianos. **Microbiologia em Foco**, v. 1, p. 4-12, 2007.

SCHOPF, J. W. Fossil evidence of Archean life. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 361, p. 869–885, 2006.

SCHULLER, D.; KADKO, D.; SMITH, C. R. Use of  $^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$  disequilibria in the dating of deep-sea whale falls. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 218, p. 277–289, 2004.

SCHUSTER, S., C. Next-generation sequencing transforms today's biology. **Nature Methods**, New York, v. 5, n. 1, p.16-18, 2008.

SCHWARZ, W. H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 56, p. 634–649, 2001.

SHAPIRO, R.S., SPANGLER, E. Bacterial fossil record in whale-falls: Petrographic evidence 748 of microbial sulfate reduction. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 274, p. 196–203, 2009.

SHENDURE J; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **National Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135-45, 2008.

SILVEIRA, I. C. A. **O Sistema Corrente do Brasil na Baía de Campos, RJ**. Tese de Livre Docência. 2007. 160 f. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SILVEIRA, I. C. A.; Schmidt, A. C. K.; Campos, E. J. D.; Godói, I. S. S.; Ikeda, Y. A Corrente de Brasil ao Largo da Costa Leste Brasileira. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 48, p. 171-183, 2000.

SMITH, C. R. Whale falls: chemosynthesis on the deep seafloor. **Oceanus**, v. 35, p. 74–78, 1992.

SMITH, C. R.; BACO, A. R. Ecology of whale falls at the deep sea floor. **Oceanography Marine Biology Annual Review**, v. 41, p. 311–354, 2003.

SMITH, C. R.; BACO, A. R.; GLOVER, A. G. Faunal succession on replicate deep-sea whale falls: time scales and vent-seep affinities. *Cah. **Biology Marine***, v. 39, p. 345–346, 2002.

SMITH, C. R.; GLOVER, A. G.; TREUDE, T.; HIGGS, N. D.; AMON, D. J. Whale-Fall Ecosystems: Recent Insights into Ecology, Paleoecology and Evolution. **Annual Review of Marine Science**, v. 7, p.10.1-10.26, 2015.

SMITH, C. R.; KUKERT, H.; WHEATCROFT, R. A.; JUMARS, P. A.; DEMING J. W. Vent fauna on whale remains. **Nature**, v. 34, p. 127–128, 1989.

SMITH, C. R.; MAYBAUM, H. L.; BACO, A. R.; POPE, R. H.; CARPENTER, S. D.; YAGER, P. L.; MACKO, S. A.; Deming, J. W. Sediment community structure around a whale skeleton in the deep Northeast Pacific: macrofaunal microbial and bioturbation effects. **Deep-Sea Research II**, v. 45, p. 335–364, 1998.

SMITH, C.R. Bigger is better: the role of whales as detritus in marine ecosystems. In: ESTES, J.; DEMASTER, D. P.; DOAK, D. F.; WILLIAMS, T. M.; BROWNELL, R. L. (eds). **Whales, whaling and ocean ecosystems**. California, University Press, 2006. p. 286–302.

SMITH, K. E.; THATJE, S.; SINGH, H.; AMSLER, M. O.; VOS, S. C. Discovery of a recent, natural whale fall on the continental slope off Anvers Island, western Antarctic Peninsula. **Deep-Sea Research I**, v. 90, p. 76–80, 2014.

SOGIN, M. L.; MORRISON, H. G.; HUBER, J.A.; WELCH, D. M.; HUSE, S. M.; NEAL., P. R.; ARRIETA, J. M.; HERNDL, G. J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 103, p.12115–12120, 2006.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. A. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BOM, E. P. S. Brazilian potencial for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 918-926, 2008.

STEVENS, H.; ULLOA, O. Bacterial diversity in the oxygen minimum zone of the eastern tropical South Pacific. **Environment Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1244–1259, 2008.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 222-227, 2001.

SWEET, M. J.; CROQUER, A.; BYTHELL, J. C. Development of Bacterial Biofilms on Artificial Corals in Comparison to Surface-Associated Microbes of Hard Corals. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 21195, 2011.

THOLE, S.; KALHOEFER, D.; VOGET, S.; BERGER, M.; ENGELHARDT, T.; LIESEGANG, H.; WOLLHERR, A.; KJELLEBERG, S.; DANIEL, R.; SIMON, M. *Phaeobactergallaeciensis* genomes from globally opposite locations reveal high similarity of adaptation to surface life. **ISME Journal**, v. 6, p. 2229-2244, 2012.

THOMPSON, J. F.; MILOS, P. M. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. **Genome Biology**, v. 12, n. 217, p. 1-10, 2011.

THUDI, M.; LI, Y.; JACKSON, S. A.; MAY, G. D.; VARSHNEY, R. K. Current state-of-art of sequencing technologies for plant genomics research. **Briefing in Functional Genomics**, v. 2, n. 2, p. 3-11, 2012.

TICE, M. M.; LOWE, D. R. Photosynthesis microbial mats in the 3.416-Myr-old ocean. **Nature**, v. 431, p. 549–552, 2004.

TOPORSKY, J.; STEELE, A.; MCKAY, D. S.; WESTFALL, F. Bacterial biofilms in astrobiology: the importance of life detection. In: KRUMBEIN, W. E.; PATERSON, D.

M.; ZAVARZIN, G. A. (Eds), **Fossil and Recent Biofilms, A Natural History of Life on Earth**. Boston, Kluwer, 2003. p. 430–445.

TREUDE, T.; SMITH, C. R.; WENZHOFER, F.; CARNEY, E.; BERNARDINO, A. F. Biogeochemistry of a deep-sea whale fall: sulfate reduction, sulfide efflux and methanogenesis. **Marine Ecology Progress**, v. 382, p.1–21, 2009.

TRINGE, S. S. G.; HUGENHOLTZ, P. A. Renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current Opinion Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 442–446, 2008.

TURNER, R.D., 1973. Wood-boring bivalves, opportunistic species in the deep sea. **Science**, v. 180, p. 1377–1379, 1973.

URBIETA, M. S.; TORIL, E. G.; AGUILERA, A.; GIAVENO, M. A.; DONATI, E. First prokaryotic biodiversity assessment using molecular techniques of an acidic river in Neuquén, Argentina. **Microbial Ecology**, New York, v. 64, p. 91-104, 2012.

VAN DOVER C.; GERMAN, C. R.; SPEER, K. G.; PARSON, L. M.; VRIJENHOEK, R. C. Evolution and biogeography of deep-sea vent and seep invertebrates. **Science**, v. 295, p.1253-1257, 2002.

VAN DOVER, C. L. The ecology of deep-sea hydrothermal vents. **Limnology and Oceanography**, Princeton University Press, Princeton, New Jersey, v. 46, n. 8, p. 1-124, 2000.

VELAYUDHAM, S.; MURUNGAN, K. Diversity and antibacterial screening of actinomycetes from javadi hill forest soil, Tamilnadu, India. **Journal of Microbiology Research**, v. 2, n. 2, p. 41- 46, 2012.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, p. 495-548, 2007.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, p. 6578–6583, 1998.

WICKER, T. et al. A whole-genome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley. **Plant Journal**, v. 59, n. 5, p. 712-722, 2009.

WOLFAARDT, G. M. J. R.; LAWRENCE, R. D.; ROBERTS, S. J.; CALDWELL, D. E. Multicellular organization in a degradative biofilm community. **Applied Environment Microbiology**, v. 60, p. 434–446, 1994.

WOLFF, T. Macrofaunal utilization of plant remains in the deep sea. **Sarsia**, v. 64, p. 117–136, 1979.

WRIGHTON, K. C.; THOMAS, B. C.; SHARON, I.; MILLER, C. S.; CASTELLE, C. J.; VERBERKMOES, N. C. Fermentation, hydrogen, and sulfur metabolism in multiple uncultivated bacterial phyla. **Science**, v. 337, p.1661–1665, 2012.

XIONG, J.; LIU, Y.; LIN, X. Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau. **Applied Environmental Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 2457–2466, 2012.

YERGEAU, E.; LAWRENCE, J. R.; SANSCHAGRIN, S.; WAISER, M. J.; KORBER, D. R. Next-generation sequencing of microbial communities in the Athabasca River and its tributaries in relation to oil sands mining activities. **Applied Environmental Microbiology**, v. 78, p. 7626–7637, 2012.

ZAVARZIN, G. A.; STACKEBRANDT, E.; MURRAY, R. G. E. A correlation of phylogenetic diversity in the Proteobacteria with the influences of ecological forces. **Can. Journal Microbiology**, v. 37, p. 1-6, 1991.

ZHANG, J.; CHIODINI, R.; BADR, A.; ZHANG, G. The impact of next-generation sequencing on genomics. **Journal Genetic Genomics**, v. 38, n. 3, p. 95-109, 2011.

ZINGER, L.; AMARAL-ZETTLER, L. A.; FUHRMAN, J. A.; HORNER-Devine, M. C.; HUSE, S. M.; WELCH, D. B. M.; MARTINY, B. H. J.; SOGIN, M.; BOETIUS, A.; RAMETTE, A. Global patterns of Bacterial Beta-Diversity in Seafloor and Seawater Ecosystems. **Plos One**, v. 6, n. 9, p. 245-270, 2011.

ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces on bacterial activity. **Journal Bacteriology**, v. 46, p. 39–56, 1943.

ZOBELL, C. E. The influence of solid surface on the physiological activities of bacteria in sea water. **Journal Bacteriology**, v. 33, p. 33-86, 1937.