

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 16/05/2018.

unesp



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO
CLARO**



Tese de Doutorado

MICROBIOTA DO BIOFILME DE COSTÕES ROCHOSOS DE UBATUBA (SP)

Aline Bartelochi Pinto

**RIO CLARO / SP
2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



Aline Bartelochi Pinto

MICROBIOTA DO BIOFILME DE COSTÕES ROCHOSOS DE UBATUBA (SP)

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor(a) em Microbiologia Aplicada.

**Orientadora: Ana Julia Fernandes Cardoso de Oliveira
Co-orientador: Marcelo Antônio Amaro Pinheiro**

**Rio Claro – SP
2016**

Pinto, Aline Bartelochi

576
P659m Microbiota do biofilme de costões rochosos de Ubatuba
(SP) / Aline Bartelochi Pinto. - Rio Claro, 2016
97 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Ana Julia Fernandes Cardoso de Oliveira
Coorientador: Marcelo Antônio Amaro Pinheiro

1. Microorganismos. 2. Meio ambiente. 3. Indicadores de
contaminação. 4. Patógenos. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI
- Biblioteca da UNESP Campus de Rio Claro/SP

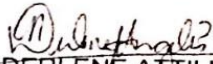


ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ALINE BARTELOCHI PINTO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS.

Aos 16 dias do mês de maio do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) Sala 118 - Bloco Didático I - IB, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. ANA JULIA FERNANDES - Orientador(a) do(a) UNESP - Campus do Litoral Paulista - Unidade São Vicente / UNESP - Campus do Litoral Paulista - Unidade São Vicente, Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS do(a) Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro, Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS do(a) Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas / Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. JOSÉ JUAN BARRERA ALBA do(a) Universidade Federal de São Paulo, Campus Baixada Santista / Universidade Federal de São Paulo, Campus Baixada Santista, Prof. Dr. ANDRE RODRIGUES do(a) Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de ALINE BARTELOCHI PINTO, intitulada **MICROBIOTA DE COSTÕES ROCHOSOS DE UBATUBA (SP): COMPOSIÇÃO, DIVERSIDADE E EFEITO DA CONTAMINAÇÃO ORGÂNICA**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Profa. Dra. ANA JULIA FERNANDES


Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS


Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS


Prof. Dr. JOSÉ JUAN BARRERA ALBA


Prof. Dr. ANDRE RODRIGUES

DEDICATÓRIA

À minha família, sem a qual nada disso seria possível

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Bruna Zampieri, amiga para todas as horas que, além de me fazer ótima companhia no café ainda me ajudou muito na parte molecular.

As meninas do laboratório MicroMar, que me acompanharam nas coletas e no laboratório gerando ótimas lembranças de momentos muito divertidos.

Thais Siems, sempre me deu muita força e ombro amigo nos momentos de crise.

Marcelo Pinheiro, meu co-orientador, além de ajudar sempre em tudo, tornou-se um excelente amigo.

Minha orientadora, *Ana Júlia*, difícil explicar em palavras o que significa para mim. Além de orientadora desde sempre, uma amiga, confidente, que sempre indicou os melhores caminhos e sempre me puxou das nuvens!!!! Parceria para a vida, tanto acadêmica quanto pessoal. Não há palavras suficientes para agradecê-la.

Minha família, por tudo que representa na minha vida.

Renan, companheiro, amigo, amor!!! Sem você nada disso seria possível!

Minhas filhas, *Rafaella* e *Maria Luísa*, razões do meu viver, pequenas pessoas que me fazem ter um sentimento tão imenso. É para vocês que faço tudo! É por vocês todo o empenho, dedicação, noites em claro, esforço, enfim, tudo é por vocês.

À Deus, por minha vida e pela minha fé! *“Andar com fé eu vou que a fé não costuma faiá... (Gilberto Gil)”*

À FAPESP pela concessão de bolsa de estudo processo nº2011/22781-9.

RESUMO

O biofilme do entremarés constitui-se de uma estrutura tridimensional, sendo composto, principalmente, por bactérias, cianobactérias, diatomáceas, protozoários e esporos de macroalgas, embebidos em uma matriz mucopolissacarídea. Neste sentido, o biofilme é importante fonte de alimento para algumas espécies, influenciando diretamente a estrutura da comunidade dos costões rochosos, embora tenha recebido pouca atenção pelas dificuldades associadas à sua amostragem e quantificação. O presente trabalho teve por objetivos avaliar a influência da contaminação orgânica sobre a composição e diversidade da microbiota (cianobactérias, bactérias heterotróficas) e do microfítolâncton (diatomáceas e nanoheterótrofos) de costões rochosos com diferentes condições de impacto por efluentes orgânicos, bem como a sazonalidade das espécies microbianas predominantes em função da zonação (meso e infralitoral) e o grau de exposição às ondas (semi exposto e abrigado). Para tanto foram efetuadas coletas em 4 costões rochosos (2 semi expostos e 2 abrigados), no Município de Ubatuba (SP), com obtenção de três fragmentos rochosos de cada um, durante a maré baixa, em pontos georeferenciados nas duas faixas de zonação supracitadas, visando o isolamento e quantificação dos micro-organismos. As amostras destinadas à quantificação por epifluorescência foram acondicionadas em frascos com formaldeído a 5% de concentração final, para a fixação dos micro-organismos; enquanto aquelas destinadas ao isolamento foram colocadas em frascos com água do mar filtrada e esterilizada. Em cada ponto amostral foram registrados temperatura, oxigênio dissolvido (OD) e pigmento fotossintético (clorofila *a*). Os resultados obtidos sugerem que há diferenças tanto entre as praias analisadas quanto em relação aos parâmetros avaliados dentro de uma mesma praia, o que indica que, tanto a sazonalidade, quanto o efeito do impacto das ondas nos costões influenciam na estrutura da comunidade microbiana presente no seu biofilme havendo diferenças na predominância das espécies analisadas. A presença de micro-organismos indicadores de contaminação fecal, tanto na água quanto no biofilme das áreas amostradas sugere que há impacto por efluentes domésticos nas praias avaliadas e que o biofilme é um microambiente protetor para os micro-organismos nos sistemas entre-marés. Embora isto possa oferecer vantagens do ponto de vista produtivo do ecossistema, pode ser preocupante do ponto de vista da saúde pública e ambiental uma vez que acumulam também micro-organismos patogênicos e, à semelhança do que acontece em outros tipos de biofilmes, podem se transformar em potenciais fontes de contaminação do ambiente, da biota e de humanos. O presente estudo foi financiado pela FAPESP processo nº2011/27781-9

Palavras-chave: Biofilme. Costões Rochosos. Micro-organismos

ABSTRACT

Intertidal rocky shores biofilm is a tridimensional structure composed, mainly, by bacteria, cyanobacteria, diatoms, protozoans and macroalgae spores immersed in a mucopolysaccharides matrix. Thus, biofilm is an important food source for some species and has direct influence on the community structure of rocky shores although, due to difficulties in its sampling and quantification, has being given little attention. The present study aimed to evaluate the influence of organic contamination on biofilm composition and diversity of microbiota (cyanobacteria, heterotrophic bacteria) and microphytoplankton (diatoms and nanoheterotrophs) from rocky shores under different conditions as well as differences according to zonation (meso and infralittoral) and wave impacts (moderately exposed and sheltered). Therefore, 4 rocky shores from Ubatuba city (Sao Paulo, Brazil) were sampled during low tide, in georeferenced points from meso and infralittoral. Samples destined to quantification by epifluorescence were placed in vials with formaldehyde at 5% final concentration, for fixation of microorganisms while those intended for the isolation were placed in vials with sterile and filtered seawater. At each sampling point were recorded temperature, dissolved oxygen (DO) and photosynthetic pigment (chlorophyll *a*). The results suggest that there are differences between the analyzed beaches and in relation to the parameters assessed within a beach which indicates that both zonation and wave impact on rocky shores influence the structure of microbial community present in its biofilm. The presence of faecal indicators both in water and biofilm samples shows an impact by domestic effluents in the evaluated beaches and that biofilms can act as a protective microenvironment for microorganisms in intertidal systems. Although this may offer advantages for ecosystems productivity, it can be a problem for environment and public health since they can also accumulate pathogenic microorganisms and, similarly to what happens in other types of biofilms, can become potential sources of environment, biota and humans contamination. The present study was founded by FAPESP proc n° 2011/22781-9

Keywords: Biofilms. Microorganisms. Rocky Shores.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3. OBJETIVOS	25
3. 1 Objetivo Geral	25
3. 2 Objetivos Específicos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Área de estudo	26
4.2. Coleta de Amostras	28
4.3 Densidade dos Micro-organismos.....	30
4.4 Indicadores de contaminação fecal.....	33
4.5 Isolamento e identificação de bactérias cultiváveis	34
4.6 Análise estatística	37
5. RESULTADOS	39
5.1 Indicadores de contaminação fecal nas águas adjacentes e biofilme	39
5.3 Clorofila- <i>a</i>	45
5.4 Densidades de micro-organismos no biofilme	47
5.5 Identificação de Diatomáceas.....	70
5.6 Parâmetros físico-químicos.....	72
5.6 Identificação de bactérias cultiváveis.....	74
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÃO.....	86
8. REFERÊNCIAS	87

Índice de Figuras

FIGURA 1- A TERRA VISTA À NOITE	16
FIGURA 2- ZONAÇÃO EM COSTÕES ROCHOSOS.	19
FIGURA 3-- MAPA DA LOCALIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE UBATUBA.	28
FIGURA 4- ESQUEMA DO PROCESSAMENTO DAS COLETAS	30
FIGURA 5 –ESQUEMA DA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE SOB MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA	31
FIGURA 6-EQUIPAMENTO DE FILTRAÇÃO E MICROSCÓPIO DE EPIFLUORESCÊNCIA	31
FIGURA 7- DENSIDADES DE <i>E. COLI</i> E <i>ENTEROCOCCUS</i> SP NAS ÁGUAS ADJACENTES AOS COSTÕES ROCHOSOS DAS PRAIAS ESTUDADAS.	41
FIGURA 8- DENSIDADES DE <i>E. COLI</i> NAS AMOSTRAS DE BIOFILME.....	42
FIGURA 9- DENSIDADES DE <i>ENTEROCOCCUS</i> NAS AMOSTRAS DE BIOFILME.	43
FIGURA 10- DENSIDADE DE <i>E. COLI</i> E <i>ENTEROCOCCUS</i> EM RELAÇÃO À ZONAÇÃO.....	44
FIGURA 11-DENSIDADE MÉDIA DE <i>E. COLI</i> E <i>ENTEROCOCCUS</i> EM RELAÇÃO À SAZONALIDADE..	45
FIGURA 12- CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA-A NAS AMOSTRAS DE BIOFILME.....	46
FIGURA 13- CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE CLOROFILA A NO INVERNO E VERÃO.....	47
FIGURA 14-BACTÉRIAS CORADAS COM DAPI. IMAGENS OBTIDAS COM MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA	48
FIGURA 15- DENSIDADES MÉDIAS DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS NAS PRAIAS ESTUDADAS ..	48
FIGURA 16- DENSIDADE DE BACTÉRIAS NAS AMOSTRAS DE BIOFILME NO VERÃO E INVERNO EM RELAÇÃO À EXPOSIÇÃO ÀS ONDAS	50
FIGURA 17- DENSIDADE MÉDIA DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS EM RELAÇÃO AOS FATORES EXPOSIÇÃO, SAZONALIDADE E ZONAÇÃO.....	51
FIGURA 18- DENSIDADE DE CIANOBACTÉRIAS UNICELULARES NAS AMOSTRAS DE BIOFILME EM RELAÇÃO ÀS PRAIAS.....	52
FIGURA 19- DENSIDADE DE CIANOBACTÉRIAS UNICELULARES NAS AMOSTRAS DE BIOFILME NO VERÃO E INVERNO EM RELAÇÃO À EXPOSIÇÃO ÀS ONDAS	53
FIGURA 20-DENSIDADE MÉDIA DE CIANOBACTÉRIAS EM RELAÇÃO AOS FATORES EXPOSIÇÃO, SAZONALIDADE E ZONAÇÃO.....	54
FIGURA 21-DENSIDADE DE CIANOBACTÉRIAS COLONIAIS NAS AMOSTRAS DE BIOFILME EM RELAÇÃO ÀS PRAIAS.....	55
FIGURA 22-DENSIDADE DE CIANOBACTÉRIAS COLONIAIS NAS AMOSTRAS DE BIOFILME NO VERÃO E INVERNO EM RELAÇÃO À EXPOSIÇÃO ÀS ONDAS	56
FIGURA 23- CIANOBACTÉRIAS NAS AMOSTRAS DE BIOFILME. IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA.	57
FIGURA 24-DENSIDADE MÉDIA DE CIANOBACTÉRIAS EM COLÔNIA EM RELAÇÃO AOS FATORES EXPOSIÇÃO, SAZONALIDADE E ZONAÇÃO.....	58
FIGURA 25-DENSIDADE DE DIATOMÁCEAS NAS AMOSTRAS DE BIOFILME EM RELAÇÃO ÀS PRAIAS..	59
FIGURA 26- DENSIDADE DE DIATOMÁCEAS NAS AMOSTRAS DE BIOFILME NO VERÃO E INVERNO EM RELAÇÃO À EXPOSIÇÃO ÀS ONDAS	61
FIGURA 27- DENSIDADE MÉDIA DE DIATOMÁCEAS EM RELAÇÃO AOS FATORES EXPOSIÇÃO, SAZONALIDADE E ZONAÇÃO.....	62
FIGURA 28-DENSIDADE DE NANOFLAGELADOS AUTÓTROFOS NAS AMOSTRAS DE BIOFILME EM RELAÇÃO ÀS PRAIAS.....	63
FIGURA 29- DENSIDADE DE NANOFLAGELADOS AUTÓTROFOS NAS AMOSTRAS DE BIOFILME NO VERÃO E INVERNO EM RELAÇÃO À EXPOSIÇÃO ÀS ONDAS	64

FIGURA 30-DENSIDADE MÉDIA DE NANOFLAGELADOS AUTÓTROFOS EM RELAÇÃO AOS FATORES EXPOSIÇÃO, SAZONALIDADE E ZONAÇÃO.	65
FIGURA 31-DENSIDADE DE NANOFLAGELADOS HETERÓTROFOS NAS AMOSTRAS DE BIOFILME EM RELAÇÃO ÀS PRAIAS.....	66
FIGURA 32-DENSIDADE DE NANOFLAGELADOS AUTÓTROFOS NAS AMOSTRAS DE BIOFILME NO VERÃO E INVERNO EM RELAÇÃO À EXPOSIÇÃO ÀS ONDAS	67
FIGURA 33-DENSIDADE MÉDIA DE NANOFLAGELADOS HETERÓTROFOS EM RELAÇÃO AOS FATORES EXPOSIÇÃO, SAZONALIDADE E ZONAÇÃO.	68
FIGURA 34- COMPARAÇÃO ENTRE O VERÃO E O INVERNO DE TODOS OS MICRO-ORGANISMOS ESTUDADOS.	69
FIGURA 35- BIPLLOT DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	70
FIGURA 36 -PORCENTAGENS DE DIATOMÁCEAS PENADAS E CÊNTRICAS (DP E DC) NAS PRAIAS AMOSTRADAS	71
FIGURA 37-DIATOMÁCEAS VISUALIZADAS EM MICROSCÓPIO INVERTIDO	72
FIGURA 38-EXEMPLO DE RESULTADO DA CORRIDA DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,8% DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO DAS CEPAS ISOLADAS	75
FIGURA 39-EXEMPLO DE RESULTADO DA CORRIDA DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,8%, DEPOIS DA REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR), DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO DAS CEPAS ISOLADAS.	75
FIGURA 40 -EXEMPLO DE SAÍDA DO PROGRAMA BioEDIT E DA BASE DE DADOS DO NCBI ATRAVÉS DA FERRAMENTA BLASTN.....	76
FIGURA 41- PORCENTAGENS DAS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS DAS PRAIAS AMOSTRADAS	77

Índice de Tabelas

TABELA 1- DENSIDADES DE <i>E. COLI</i> (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO) NAS ÁGUAS ADJACENTES AOS COSTÕES ROCHOSOS DAS PRAIAS ESTUDADAS, EM DUAS ESTAÇÕES DO ANO (VERÃO E INVERNO).	39
TABELA 2- DENSIDADES MÉDIAS E DESVIO PADRÃO (DESVPAD.) DE <i>ENTEROCOCCUS</i> SP NAS ÁGUAS ADJACENTES AOS COSTÕES DAS PRAIAS ESTUDADAS, NAS ESTAÇÕES DO ANO.....	40
TABELA 3- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA DENSIDADE DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS COM A INTERAÇÃO DOS FATORES ZONAÇÃO, EXPOSIÇÃO E SAZONALIDADE	49
TABELA 4- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA DENSIDADE DE CIANOBACTÉRIAS UNICELULARES COM A INTERAÇÃO DOS FATORES ZONAÇÃO, EXPOSIÇÃO E SAZONALIDADE	53
TABELA 5-ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA DENSIDADE DE CIANOBACTÉRIAS COLONIAIS COM A INTERAÇÃO DOS FATORES ZONAÇÃO, EXPOSIÇÃO E SAZONALIDADE	56
TABELA 6- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA DENSIDADE DE DIATOMÁCEAS COM A INTERAÇÃO DOS FATORES ZONAÇÃO, EXPOSIÇÃO E SAZONALIDADE.....	60
TABELA 7-ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA DENSIDADE DE NANOFLAGELADOS AUTÓTROFOS COM A INTERAÇÃO DOS FATORES ZONAÇÃO, EXPOSIÇÃO E SAZONALIDADE	64
TABELA 8-ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA DENSIDADE DE NANOFLAGELADOS HETERÓTROFOS COM A INTERAÇÃO DOS FATORES ZONAÇÃO, EXPOSIÇÃO E SAZONALIDADE	66
TABELA 9-MÉDIAS DE TEMPERATURA (T, EM °C) E OXIGÊNIO DISSOLVIDO (OD, EM %)E SEUS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO (DESVPAD) NOS COSTÕES ROCHOSOS DAS PRAIAS, DURANTE O VERÃO E INVERNO.	73
TABELA 10- CORRELAÇÃO DE SPEARMAN PARA T°C E OD. VALORES EM DESTAQUE APRESENTARAM CORRELAÇÃO SIGNIFICATIVA A P<0,05.....	74
TABELA 11- ESPÉCIES IDENTIFICADAS DE ACORDO COM A ZONAÇÃO EM CADA PRAIA. (N=149)	76
TABELA 12- ÍNDICE DE DIVERSIDADE EM RELAÇÃO À EXPOSIÇÃO E ZONAÇÃO	78

1. INTRODUÇÃO

Todos os seres vivos estão sujeitos a mudanças bruscas no ambiente em que vivem e que podem afetar seu modo de vida, trazendo consequências tanto positivas, quanto negativas, à sua abundância e diversidade. Para os micro-organismos isso não é diferente.

Os micro-organismos de vida livre, isto é, que não estão organizados em forma de colônias, estão sujeitos a inúmeros fatores que os colocam em risco, como a diminuição na concentração de nutrientes, incidência de raios solares, predação por outros organismos, entre outros, além de estarem sujeitos a estresse ambiental causado por impactos antrópicos.

Tais impactos podem alterar a diversidade de populações, diminuir a diversidade genética, inibir a atividade dos micro-organismos alterando o equilíbrio ecológico do sistema. Entretanto, os micro-organismos possuem respostas às mudanças no ambiente, tanto em nível celular quanto no populacional, possibilitando, por exemplo, a construção de uma “rede” de proteção específica.

Desta forma, o biofilme constitui uma resposta de adaptação das bactérias e outros micro-organismos fornecendo um microambiente protetor em sistemas como os entre-marés. Entre os sistemas entre-marés estão os costões rochosos que possuem uma grande diversidade de espécies e constituem um local propício para alimentação, crescimento e reprodução das mesmas.

7. CONCLUSÃO

- A variação temperatura e o oxigênio dissolvido foram parâmetros abióticos com reduzida influência sobre a composição no biofilme dos costões rochosos estudados uma vez que, a temperatura, apresentou correlação positiva para alguns micro-organismos enquanto que, o oxigênio dissolvido não apresentou correlação significativa com nenhum micro-organismo
- Os resultados indicam que os fatores **sazonalidade** e **exposição** influenciam na estrutura da comunidade microbiana do biofilme das praias estudadas.
- As maiores densidades dos micro-organismos estudados, de maneira geral, ocorreram durante o verão e nos costões considerados semi-expostos.
- Maior diversidade dos grandes grupos estudados foram observadas nas praias menos impactadas por efluentes orgânicos.
- A presença de organismos potencialmente patogênicos mostra que o biofilme de costões rochosos de áreas costeiras contaminadas pode atuar como um refúgio para micro-organismos, inclusive os potencialmente patogênicos tornando-se uma fonte de contaminação para as áreas adjacentes.
- Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a qualidade da água do entorno dos costões rochosos influencia não só na diversidade de espécies que habitam os costões rochosos, como também na sua estrutura e função, mostrando que a atividade antrópica pode alterar algumas funções do costão rochoso através da alteração do seu biofilme.

8. REFERÊNCIAS

- AIDAR, E.; GAETA, S. A.; GIANESELLA-GALVÃO, S. M. F.; KUTNER, M. B. B., TEIXEIRA, C. 1993. Ecossistema costeiro subtropical: nutrientes dissolvidos, fitoplâncton e clorofila-a e suas relações com as condições oceanográficas na região de Ubatuba, SP. **Publicação Especial Instituto Oceanográfico**, v.10, p. 9-43, 1993.
- ANDERSON, M. J. Variations in biofilms colonizing artificial surfaces: seasonal effects and effects of grazers. **J. Mar. Biol. Ass.** U.K. v. 75, p. 705-714. 1995.
- ANTONY, C.P., COCKELL, C.S., SHOUCHE, Y.S. Life in (and on) the rocks. **Journal of Biosciences**, v.37, n.1, p.3-11, 2012.
- APHA, American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA, AWWA, WEF. 22th Edition. 2012.
- AZAM, F. FENCHEL, T. FIELD, J. G. The ecological role of water-column microbes in the sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 10, n. 3, p. 257–263, 1983.
- BRASIL, IBGE. Censo demográfico. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 05 de junho de 2016.
- BRUNKE, M., FISCHER, H. Hyporheic bacteria – relationships to environmental gradients and invertebrates in a prealpine stream. **Arch. Hydrobiol.**, v.146, n.2, p.189-217, 1999.
- CAFNEY, H.M. Spatial and temporal variation in settlement and recruitment of intertidal barnacles. **Ecological Monographs**, v.55, p. 313-332, 1985.

- CASTRO-FILHO, B.M., MIRANDA, L.B., MIYAO, S.Y. Condições hidrográficas na plataforma continental ao largo de Ubatuba: variações sazonais e em média escala. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 35, n.2, p. 135-151, 1987.
- CETESB (São Paulo). Relatório de qualidade das águas litorâneas do Estado de São Paulo: balneabilidade das praias 2015. 2015.
- CHAY, T. C. SURIF, S., HENG, L. Y. A Copper Toxicity Biosensor Using Immobilized Cyanobacteria, *Anabaena Torulosa*. **Sensor Letters**, **3**, v. 1, n. 4, p. 49–54, 2005.
- CHRISTOFOLETTI, R.A., ALMEIDA, T.V.V., CIOTTI, A.M. Environmental and grazing influence on spatial variability of intertidal biofilm on subtropical rocky shores. **Marine Ecology Progress Series**, v. 424, p.15-23, 2011.
- COLMAN, J. S. The nature of intertidal zonation of plants and animals. **J. Mar. Biol. Ass. U.K.**, v. 61, p. 71-93, 1933.
- COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z. Microbial Biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 711-745, 1995.
- COUTINHO, R. Avaliação Crítica das Causas da Zonação dos Organismos Bentônicos em Costões Rochosos. **Ecologia Brasilienses, Volume I: Estrutura, Funcionamento e Manejo de Ecossistemas Brasileiros**, p. 259-271. 1995.
- DAVEY, M.E., O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol Biol Rev.**, v. 64, p. 847-867, 2000.
- DAVIES, C.M., BAVOR, H.J. The fate of storm water associated bacteria in constructed wetland and water pollution control pond systems. **J. Appl. Microbiol.**, v.89, n.2, p.349-360, 2000.

- DAVIES-COLLEY, R.J, DONNISON, A.M., SPEED, D.J., et al. Inactivation of fecal indicator microorganisms in waste stabilization ponds: interactions of environmental factors with sunlight. **Water Research.**, v.33, n.5, p.1220-1230, 1999.
- DECHO, A.W. Chemical communication within microbial biofilms: chemotaxis and quorum sensing in bacteria cells. In: WINGENDER, J., NEU, T., FLEMMING, H.-C. (Eds.), **Microbial Extracellular Polymer Substances**. Springer-Verlag, Berlin, pp. 155-169, 1999.
- DECHO, A.W. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. **Continental Shelf Research**, v.20, p. 1257-1273, 2000.
- DENNY, M. W. *Biology and the mechanics of the wave - swept environment*. Princeton University Press, Princeton, NJ., 1988.
- DOBRETSOV, S. Marine Biofilms. In: **Biofouling**. DURR, S., THOMASON, J.C. (Eds), Wiley-Blackwell, UK. 2010.
- DOI, H., CHANG, K. H., OBAYASHI, Y., et al. Attached microalgae contribute to planktonic food webs in bays with fish and pearl oyster farms. **Marine Ecology Progress Series**, v. 353, p.107–113, 2008.
- ESPELAND, E.M., WETZEL, R.G. Effects of photosynthesis on bacterial phosphatase production in biofilms. **Microbiol. Ecol.**, v.42, n.3, p. 328-337, 2001.
- FAIRWEATHER, P.G. Consequences of supply-side ecology: manipulating the recruitment of intertidal barnacles affects the intensity of predation upon them. **Biol. Bull.**, v.17, n.5, p. 349-354. 1988.
- FENCHEL, T. Ecology of heterotrophic microflagellates: IV. Quantitative occurrence and importance as bacterial consumers. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v., p. 35-42, 1982.

- FERGUSON, A. The “turbulometer”, na apparatus for measuring the relative exposure to wave action on shores. **Zool. Afr.**, v. 3, p.115-18, 1984.
- FITT, W. Settlement behavior and metamorphosis of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in response to bacterial supernatants. **Mar. Biol.**, v. 106, p. 389-394, 1990.
- FLEMMING, H.C., WINGERDER, J., MORITZ, R., et al. Physico-chemical properties of biofilms – A short review. In: **Biofilms in the aquatic environment**. KEEVIL, C.W., GODFREE, A., HOLT, D., DOW, C. (Eds). The Royal Society of Chemistry, UK. 242p. 1999.
- FUQUA, C., WINANS, S.C., GREENBERG, E.P. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 727-751, 1996.
- GIANESELLA-GALVÃO, S.M.F., SALDANHA-CORREIA, F.M.P. A conceptual model for primary production in the Ubatuba region. Abstracts of the XII International Symposium on Environmental Biogeochemistry, Rio de Janeiro, Brazil, 125 pp., 1995.
- HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J.W., STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from nature environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p. 95-108, 2004.
- HAMMER, O., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v.4, n.1, 9pp. 2001
- HARLIN, M.M., LINDBERGH, J.M. Selection of substrata by seaweed: optimal surface relief. **Marine Biology**, v.40, p.33-40, 1977.

HAWKINS, S.J., HARTNOLL, R.G. Grazing of intertidal algae by marine invertebrates.

Oceanograf. Marin. Biol. Ann. Rev., v.21, p.195-285. 1983.

HILL, A.S., HAWKINS, S.J., MACLULICH, J.H. Colonization of bare rock surfaces by microflora in a rocky intertidal habitat. *Mar Ecol Progr Ser* v.40, p. 285-293, 1986.

HILL, A.S., HAWKINS, S.J. Seasonal and spatial variation of epilithic microalga distribution and abundance and its ingestion by *Patella vulgata* on a moderately exposed rocky shore. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, v. 71, p. 403-423, 1991.

HOBBIE, J.E., DALEY, R.J., JASPER, S. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 33, n. 5, p. 1225, 1977.

HOLGUIN, G. VAZQUEZ, P., BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biology and fertility of soils*, v. 33, n. 4, p. 265–278, 2001.

HUANG, R., BONEY, A.D., Growth interactions between littoral diatoms and juvenile marine algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v.81, p.21-46, 1984

HUNG, O.S., THIYAGARAJAN, V., ZHANG, R.; et al. Attachment of *Balanus* amphitrite larvae to biofilms originating from contrasting environments. *Mar Ecol Prog Ser*, v. 333, p.229–242, 2007.

HURD, C.L. Water motion, marine macroalgal physiology and production. *J. Phycol.*, v.36, p. 453-472, 2000.

JACKSON, A.C., MURPHY, R.J., UNDERWOOD, A.J. Biofilms on rocky shores: Influence of rockpools, local moisture and temperature. *J.Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v.443, p. 46-55, 2013.

- JENKINS, S.R., ARENAS, F., ARRONTES, J.; et al. European-scale analysis of seasonal variability in limpet grazing activity and microalgal abundance. *Mar Ecol Prog Ser*, v. 211, p.193–203, 2001.
- JERNAKOFF, P. Factors affecting the recruitment of algae in a midshore region dominated by barnacles. *J.Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v.67, p.17-31, 1983.
- KRISTENSEN, E., JENSEN, M.H., BANTA, G.T. et al. Transformation and transport of inorganic nitrogen in sediments of a southeast Asian mangrove forest. *Aquatic microbial ecology*, v. 15, n. 2, p. 165–175, 1998.
- KIM, B.Y. Community structure and photosynthesis of epilithic biofilm at Byeonsan Peninsula, Korea. M.Sc. Dissertation, University of Wonkwang, Iksan.
- KIM, B.Y., PARK, S.K., HEO, J.S., et al. Biomass and community structure of epilithic biofilm on the yellow and east coast of Korea. *Open Journal of Marine Science*, v.4, p. 286-297, 2014.
- LECHEVALLIER, M.W., CAUTHON, C.D., LEE, R.G. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.54, p. 2492-2499, 1988.
- LOCK, M.A. Attached communities in rivers. In: *Aquatic Microbiology*. FORD, T.E (Ed). Blacwell. p. 113-138, 1993.
- LYANTEY, E., LACOSTE, B., LOIC, T. et al. Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S r DNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Research*, v.39, n.2-3, p.380-388, 2005.
- MACLULICH, J.H. Variation in the density and variety of intertidal epilithic microflora. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, v. 40, p. 285-293, 1987.

- MCNEIL, K., HAMILTON, I.R. Effects of acid stress on the physiology of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v.150, p.735-742, 2003.
- MOLINO, P.J., CHILDS, S., EASON-HUBBARD, M.R., et al. Development of primary bacterial microfouling layer on antifouling and fouling release coatings in temperate and tropical environments in Eastern Australia. **Biofouling**, v. 25, p. 149-162, 2009.
- NAGARKAR S., WILLIAMS, G.A., SUBRAMANIAN, G., SAHA, S.K Cyanobacteria-dominated biofilms: a high quality food resource for intertidal grazers. **Hydrobiologia**, v. 512, p. 89–95, 2004.
- NAGARKAR, S., WILLIAMS, G. A. Comparative techniques to quantify cyanobacteria dominated epilithic biofilms on tropical rocky shores. **Mar. Ecol. Progr. Ser.**, v. 154, p. 281-291, 1997.
- NAGARKAR, S., WILLIAMS, G.A. Spatial and temporal variation of cyanobacteria-dominated epilithic communities on a tropical rocky shore in Hong Kong. **Phycologia**, v. 38, p. 385-393, 1999.
- OLIVEIRA, A.J. F.C., HOLNAGELL, H.C., MESQUITA, H.S.L, FONTES, R.F.C. Physical, chemical and microbiological characterization of the intertidal sediments of Pereque Beach, Guarujá (SP), Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v.54, n.7, p. 921–927, 2007.
- OLIVEIRA, A.J.F.C., PINHATA, J.M.W. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in southeastern Brazil. **Water Research**, v.42, n.8-9, p. 2242-2250, 2008.

- O'TOOLE, G.A., PRATT, L.A., WATNICK, P.I, et al. Genetic approaches to study biofilms. In: ***Biofilms. Methods in enzymology***, n 310. Academic Press, San Diego, CA, p.91-109, 1999.
- PAINE, R.T., LEVIN, S.A. Intertidal landscapes: disturbance and the dynamics of pattern. ***Ecological Monographs***, v.51, p. 145-178, 1981.
- PAYMENT, P.,GRAMADE, F., PAQUETTE G. Microbiological and virological analysis of water from two water filtration plants and their distribution systems. ***Canadian Journal of Microbiology***, v. 34, p. 1304–1309,1989.
- PIRES-VANIN, A. M. S., ROSSI-WONGTSCHOWSKI , B,C.L.D., AIDAR, E., et al. Estrutura e função do ecossistema de plataforma continental do Atlântico sul brasileiro: síntese dos resultados. ***Publicação especial do instituto oceanográfico***, v. 10, p. 217-231, 1993.
- PORTER, K. G., FEIG, Y. S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. ***Limnology and oceanography***, v. 25, n. 5, p. 943–948, 1980.
- POTTS, M. Blue green algae (Cyanophyta) in marine coastal environments of the Sinai Peninsula: distribution, zonation, stratification and taxonomic diversity. ***Phycologia***, v. 19,p. 60-73,1980.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. 2013
- RAILKIN, A. I. ***Marine biofouling***: Colonization processes and defenses. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 320 p., 2003.

ROCHEX, A., GODON, J., BERNET, N., ESCUDIÉ, R. Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. **Water Research**, v.42, n. 20, p. 4915-4922, 2008.

SANTOS, R., CALLOW, M.E., BOTT, T.R. The structure of *Pseudomonas fluorescens* biofilms in contact with flowing systems. **Biofouling**, v.4, p. 319-336, 1991.

SÃO PAULO. Plano municipal de saneamento básico de Ubatuba. Disponível em: <http://transparencia.ubatuba.sp.gov.br/>. Acesso em: 5 de junho de 2016.

SAUER, F.G., PINKNER, J.S., WAKSMAN, G., HULTGREN, S.J. Chaperone priming of prius subunits facilitates a topological transition that drives fiber formation. **Cell**, v.111, p. 543-551, 2002.

SHIKUMA, N.J., HADFIELD, M.G. Marine biofilms on submerged surfaces are a reservoir for *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. **Biofouling**. v.26, n.1, 39-46, 2010.

SIEBURTH, J.M., SMETACEK, V., LENZ, J. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size . **Limnology and Oceanography**. v.23, n.6, p.1256-1263, 1978.

SKULBERG, O. M. Biophotolysis, hydrogen production and algal culture technology. **Hydrogen energy system: production and utilization of hydrogen and future aspects**. Dordrecht: Kluwer Academy Publishers, p.95-110, 1995.

SOUTHWARD, A.J. Limpet grazing and control of vegetation on rocky shores. In: **Grazing in terrestrial and marine environments**. CRISP, D.J. (Ed). Blackwell Scientific Publ. Oxford, p. 265-273, 1964.

STANWELL-SMITH, R. **Recent trends in the epidemiology of waterborne disease**.

In: MORRIS, R., ALEXANDER, L.M., WYN-JONES, P., SELLWOOD, J. (Eds.),

Proceedings of the UK Symposium on Health Related Water Microbes, IAWPRC, Glasgow, pp. 44–52, 1991

STEPHENSON, T.A., STEPHENSON, A. The universal features of zonation on rocky shores. *Journal of Ecology*, v. 37, p.289– 305, 1949.

STEVENSON, J. P. A possible modification of the distribution of the intertidal seastar *Patiriella exigua* (Lamarck) (Echinodermata, Asteroidea) by *Patiriella calcar* (Lamarck). *J. exp. mar. biol. Ecol.*, v.155, p. 41-54, 1992.

STEWART, P. S., COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, v.358, p.135 -138, 2001.

STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D.G., COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*, v.56, p. 187–209, 2002.

SUGUIO, K. Dicionário de geologia marinha. São Paulo, TA Queiroz, 172p. 1992.

TEITZEL, G.M., PARSEK, M.R. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environm. Microbiol*, v.69, p.2313-2320, 2003.

THOMPSON, R.C., NORTON, T.A., HAWKINS, S.J. Physical stress and biological control regulate the producer-consumer balance in intertidal biofilms. *Ecology*, v.85, p.1372–1382, 2004.

THOMPSON, R.C., MOSCHELLA, P.S., JENKINS, S.R., et al. Differences in photosynthetic marine biofilms between sheltered and moderately exposed rocky shores. *Marine Ecology Progress Series*, v.296, p. 53-63, 2005.

TOMAS, C. R. Identifying Marine Phytoplankton. Academic Press. 858p. 1997.

UNDERWOOD, A.J. A refutation of critical tidal levels as determinants of the structure of intertidal communities on British shores. *J. exp. mar. biol. Ecol.*, v. 33, 261-76, 1978.

UNDERWOOD, A.J. The ecology of intertidal gastropods. *Oceanogr. Mar. biol. Ann. Rev.*, v.16, p.111-210, 1979

UNDERWOOD, A.J., JERNAKOFF, P. Effects of interactions between algae and grazing gastropods on the structure of a low intertidal algal community. *Oecologia*, v. 48, p.221-33, 1981.

VADAS, R. L.; JOHNSON, S.; NORTON, T. A. Recruitment and mortality of early post-settlement stages of benthic algae. *Brit. Phycol. J.*, v.27, p. 331-351, 1992.

WAHL, M. Marine epibiosis: Fouling and antifouling – some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series*, v.58, p. 175-189, 1989.

WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A., LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, v.173, n.2, p. 697-703, 1991.