

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 BIOCIÊNCIAS – 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**

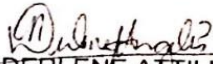


ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ALINE BARTELOCHI PINTO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS.

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.

Thaís 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, confiante, 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 microfitoplâncton (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.

Costões rochosos possuem uma vasta comunidade de micro-organismos organizados em um complexo biofilme e que contribui substancialmente para a produtividade primária tanto do ambiente quanto do ambiente costeiro adjacente.

Nesse sentido, estudos relacionados a este ambiente são necessários tanto visando a ampliação do conhecimento e estado da arte, quanto para contribuir com programas de conservação, uma vez que não existem, até o momento, ações conservacionistas voltadas a este importante ecossistema. Apesar da importância dos costões rochosos, é importante ressaltar a carência de estudos que envolvam o biofilme presente nos costões rochosos de áreas sub-tropicais e os poucos estudos para áreas temperadas.

O presente estudo objetivou avaliar a influência do ambiente circundante, na microbiota presente nos biofilmes de costões rochosos de uma região sub-tropical e, desta maneira permitir um melhor entendimento da ecologia deste ambiente bem como do seu papel como possível reservatório de micro-organismos patogênicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Grande parte da população mundial encontra-se na área próxima à zona costeira (ZC) (Fig.1). Podemos inferir que esta distribuição se deve a alguns fatores que tornam a ZC uma área altamente atrativa para ocupação como, por exemplo, sua beleza cênica e paisagística, sua proximidade com portos (facilitando o escoamento da produção industrial e grande oferta de trabalho) e seus atrativos turísticos.

Entretanto, essa distribuição cria uma mancha urbana que leva a uma pressão antrópica sobre o ambiente costeiro e seus ecossistemas. Dentre essas pressões podemos citar o uso e ocupação irregular do solo, a poluição atmosférica advinda da atividade industrial, o despejo de efluentes domésticos e industriais sem o devido tratamento.

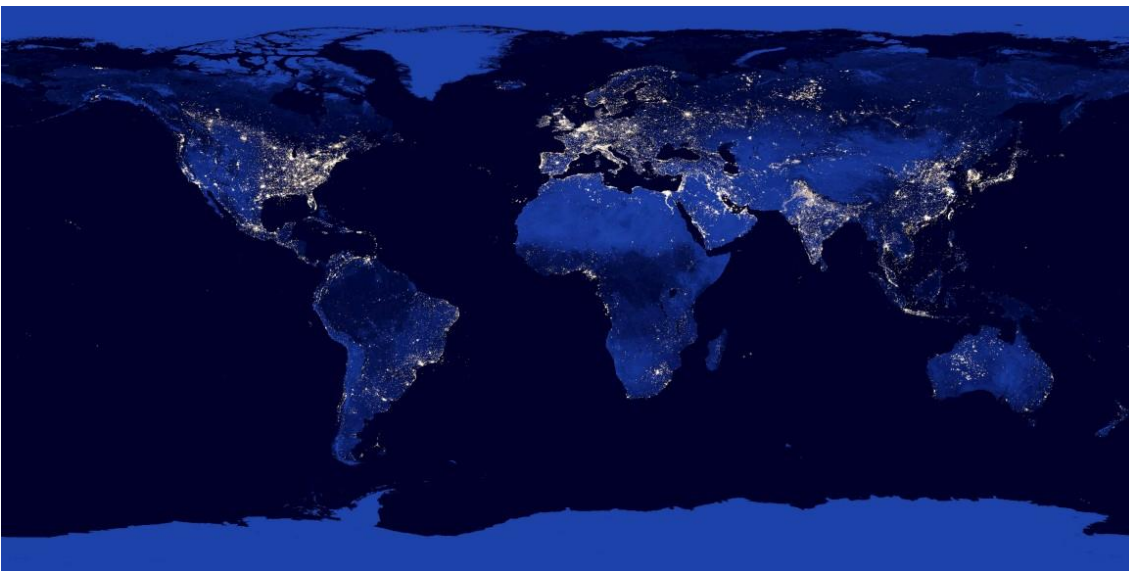


Figura 1- A terra vista à noite Créditos: C. Mayhew & R.Simmon (NASA/GSFC), NOAA/NGDC, DMSP

Os ambientes costeiros são vários tais como o bentônico, o planctônico, o pelagial, os oceânicos, os litorâneos entre muitas outras divisões que são definidas de acordo

com as características físicas, químicas, biológicas e climáticas formando diversos tipos de ecossistemas. Estes ecossistemas coexistem e, por serem dinâmicos, torna-se difícil, algumas vezes, estabelecer suas localizações e seus limites.

Tais ecossistemas detêm grande importância pois sua alta produtividade a qual suporta uma gama de atividades econômicas, além de sustentar comunidades biológicas e possibilitar a manutenção de muitas espécies residentes ou que utilizam a zona costeira como berçário para reprodução, beneficiando a biodiversidade. Possuem também elevado valor paisagístico, atraindo inúmeros habitantes para as zonas costeiras e, assim, contribuindo para o desenvolvimento das cidades litorâneas,

Sendo um ambiente de grande especulação imobiliária e de fácil acesso aos portos e marinas, se constitui numa área de grande pressão, já que muitas indústrias ali se instalam para aproveitar as facilidades para o escoamento da produção. Esse atrativo gera um aumento na população local em busca de trabalho e melhores condições de vida; entretanto, esse aumento populacional nem sempre é acompanhado por melhorias no sistema de saneamento básico, o que acarreta ligações clandestinas de esgoto que acabam por introduzir efluentes domésticos nesse ambiente, caracterizando um grave quadro de poluição ambiental (OLIVEIRA et al., 2008).

Dentre os ambientes que constituem a ZC e estão sujeitos às pressões antrópicas estão os costões rochosos que, por definição, são tidos como formações rochosas entre o sistema terrestre e marinho. De acordo com Suguio (1992), seriam afloramentos de rochas cristalinas encontradas em locais aonde falésias rochosas chegam ao mar.

Os padrões dos costões rochosos são discutidos em termos de manchas que são geradas pela variação espacial de processos como distúrbios físicos (PAINE & LEVIN,

1981) assentamento e recrutamento de organismos (CAFFEY, 1985; VADAS et al.1992), herbivoria (HAWKINS & HARTNOLL, 1983; JERNAKOFF, 1983), e predação (FAIRWEATHER, 1988).

A disposição dos organismos em um costão rochoso se dá em faixas horizontais distintas em toda sua extensão determinando um forte padrão de zonação (COUTINHO, 1995) (Fig.2) que é influenciada por fatores abióticos, como temperatura, umidade, radiação solar, latitude, níveis de maré e exposição ao ar, entre outros (COLMAN, 1933; UNDERWOOD, 1978) e por fatores bióticos como competição, predação, parasitismo e mutualismo (UNDERWOOD, 1979; UNDERWOOD & JERNAKOFF, 1981) e de acordo com STEPHENSON & STEPHENSON (1949) são divididos em infralitoral, mesolitoral e supralitoral.

O infralitoral é uma região permanentemente submersa, apresentando seu limite superior caracterizado pela zona da alga parda *Sargassum* sp. O limite inferior pode ser determinado pelo encontro das rochas com o substrato arenoso, perpendicularmente ao costão. Nesta região as relações bióticas (predação, herbivoria, competição) tem mais influência na determinação da distribuição espacial dos organismos, uma vez que os fatores ambientais são mais estáveis.

O mesolitoral (entremarés) é uma região sujeita às flutuações da maré, submersa durante a maré alta e exposta durante a maré baixa. Seu limite superior é caracterizado, geralmente, pela ocorrência de cirripédios do gênero *Chthamalus* (cracas) e o inferior pela alga parda *Sargassum* sp.

Por fim, o supralitoral constitui a região superior do costão rochoso sendo exposta ao ar permanentemente e onde somente chegam borrifos de água do mar. Esta área está

compreendida entre o limite inferior da distribuição da vegetação terrestre, que é representada por líquens ou plantas vasculares (bromeliáceas, cactáceas, entre outras) e o limite superior de ocorrência de cirripédios do gênero *Chtamalus* ou, por vezes, de gastrópodos do gênero *Littorina*.

Além da zonação, os costões rochosos também podem ser divididos de acordo com o grau de exposição às ondas. Isso ocorre, pois, o grau de exposição às ondas é um fator físico que pode controlar tanto a diversidade quanto a abundância dos organismos e, desta forma, dividir os costões em expostos e abrigados (FERGUSON, 1984; DENNY, 1988)

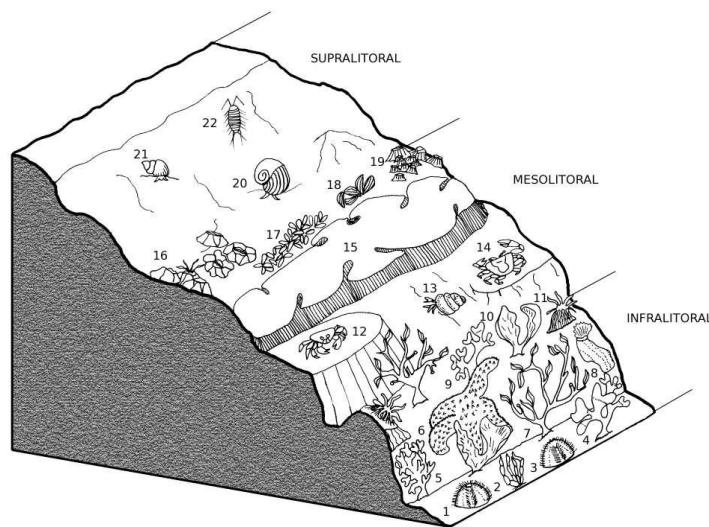


Figura 2- Zonação em costões rochosos (Fontes et al., 2008). 1 - Ouriço verde, *Lytechinus variegatus* (LAMARCK, 1816); 2 - Alga vermelha coralina, *Jania adhaerens* J.V. LAMOUROUX; 3 - Ouriço preto, *Echinometra lucunter* (LINNAEUS, 1758); 4 - Alga vermelha, *Porphyra acanthophora* E.C. OLIVEIRA & COLL; 5 - Alga vermelha, *Galaxaura marginata* (ELLIS & SOLANDER, 1786); 6 - Estrela vermelha, *Echinaster brasiliensis* MULLER & TROSCHEL, 1840; 7 - Alga parda, *Sargassum* sp.; 8 - Pepino-do-mar, *Holothuria grisea* SELENKA, 1867; 9 - Alga parda, *Dictyopteris delicatula* J.V. LAMOUROUX; 10 - Alga parda, *Padina gymnospora* (KÜTZING) SONDER; 11 - Anêmona vermelha, *Bunodosoma caissarum* CORRÊA, 1964; 12 - Caranguejo grapsídeo, *Pachygrapsus transversus* (GIBBES, 1850); 13 - Ermitão diogenídeo, *Calcinus tibicen* (HERBST, 1791); 14 - Caranguejo xantídeo, *Eriphia gonagra* (FABRICIUS, 1781); 15 - Aglomerado arenoso produzido por poliquetos sabelarídeos, *Phragmatopoma lapidosa* KINBERG, 1867; 16 - Craca, *Tetraclita stalactifera* (LAMARCK, 1818); 17 - Alga verde, gênero *Ulva* (LINNAEUS); 18 - Mexilhão, gênero *Mytilus*

LINNAEUS, 1758; 19 – Craca, *Chthamalus stellatus* (POLI, 1795); 20 - Caramujo, *Tegula viridula* (GMELIN, 1791); 21 – Gastrópodo, gênero *Littorina* FÉRUSAC, 1822; 22 - Barata-da-praia, gênero *Ligia* FÉRUSAC, 1822.

De acordo com Vilano (2012), os costões rochosos estão associados à história evolutiva da zona costeira, sendo importantes testemunhos erosivos das variações do nível relativo do mar que ocorreram durante o Quaternário.

Os costões rochosos possuem grande importância sócio-econômica visto que muitas comunidades tradicionais praticam ali atividades extrativistas (principalmente extração de mexilhões), possui importância ímpar para várias áreas das ciências ambientais e, pelo alimento que fornecem, para manutenção dos recursos pesqueiros.

Apesar de sua importância, os costões rochosos, à vista do poder público, não constituem um ecossistema definido (como ocorre para os manguezais e restingas, por exemplo). Isto evidencia a ausência de consciência acerca dos impactos aos quais este sistema está sujeito como vazamentos de derivados de petróleo, efluentes domésticos (muitas vezes *in natura*) e industriais. Somam-se a isso as pressões pelo uso inadequado como construção de infraestrutura de apoio náutico, habitações e estabelecimentos comerciais como bares e restaurantes.

Como já dito, os sistemas entre-marés (como é o caso dos costões rochosos), sendo uma interface entre ambientes terrestres, atmosféricos e oceânicos, sofrem flutuações frequentes na temperatura, concentração de íons, irradiação e ação de ondas. A frequência com que essas mudanças ocorrem caracterizam um desafio físico e bioquímico para as espécies ali presentes.

Micro-organismos possuem papel importante neste sistema transformando e remineralizando carbono orgânico, nitrogênio e outros nutrientes e participando ativamente da produtividade primária (HOLGUIN & BASHAN, 2001; KRISTENSEN et al., 2008; ANTONY et al.,2012). A maioria destes processos ocorre em microambientes como os biofilmes.

Nas zonas entre-marés dos costões rochosos ocorre a deposição de uma matriz de polímeros extracelulares mucilaginosos ou substâncias poliméricas extracelulares secretadas por células bacterianas (ANDERSON, 1995; COSTERTON & LEWANDOWISKI, 1995; DAVEY & O'TOOLE, 2000; MOLINO et al.,2009). Estas substâncias poliméricas conferem propriedades físico-químicas a matriz (estabilidade mecânica, tornar superfícies hidrofílicas e ligação das moléculas de água) (FLEMMING et al., 1999) e são principalmente polissacarídeos e proteínas com ácidos nucleicos e húmicos que, formando uma estrutura tridimensional composta também por bactérias, cianobactérias, diatomáceas, protozoários e esporos de macroalgas são denominados – BIOFILME.

Para que o biofilme exista é necessário um fluxo de água e um substrato para que haja o desenvolvimento. Estudos recentes demonstram que a formação do biofilme segue uma sequência de 5 estágios: os dois primeiros estágios referem-se a uma associação transiente com a superfície a ser colonizada seguida de uma adesão robusta; os estágios seguintes envolveriam a agregação de células em micro colônias e, por fim, o crescimento e a maturação definiriam o último estágio (STOODLEY et al., 2002; SAUER et al.,2002).

O desenvolvimento do biofilme em áreas entre-marés pode representar o resultado de uma comunicação química entre as células microbianas (DECHO, 1999), uma vez que pode ser mediado por sinais químicos liberados pelas bactérias. Esses sinais, chamados autoindutores, podem afetar as células de modo que acarretem em mudanças fisiológicas (DECHO, 2000). Este processo, chamado *quorum sensing* permite uma autorregulação nas comunidades microbianas (FUQUA et al., 1996).

Ecologicamente, a matriz exopolimérica presente no biofilme, torna possível para os micro-organismos formar agregados de diferentes células que sejam estáveis levando à ocorrência de um micro consórcio sinérgico (FLEMMING, et al., 1999). Esses agregados facilitam a degradação de substâncias que, do contrário, não seriam tão facilmente degradáveis e muitos poluentes provenientes das ações antrópicas estão nessa categoria. Além disso, os organismos presentes no biofilme podem suportar maiores concentrações de biocidas (LECHEVALLIER, et al., 1988).

Após o estabelecimento do biofilme pelas bactérias, outros micro-organismos colonizam o substrato sendo que essa colonização segue um processo de 4 estágios (WAHL, 1989). Esse processo se inicia com as bactérias, seguido pelas diatomáceas, cianobactérias e esporos de macroalgas. Entretanto, Pinto et al (2008), demonstraram que este processo pode ter uma pequena diferença sendo as cianobactérias os segundos colonizadores seguidas pelos nanoflagelados e por fim as diatomáceas.

Essas discrepâncias podem ser explicadas uma vez o tipo de substrato, o fluxo de água, a rugosidade e a química da superfície do substrato podem afetar esses estágios. Sendo assim, o tempo em que se inicia a colonização pode resultar numa variação desses estágios.

Mas porque os micro-organismos formam biofilmes? O biofilme pode representar uma estratégia de sobrevivência, uma vez que sua estrutura tridimensional pode constituir um microambiente favorável e fornecer proteção contra predação, radiação solar e outros fatores de estresse ambiental (DECHO, 1999; ESPELAND & WETZEL, 2001; TEITZEL & PARSEK, 2003; MCNEIL & HAMILTON, 2003; HALL-STOODLEY et al., 2004).

Nesse sentido, o biofilme pode atuar como refúgio para inúmeros micro-organismos inclusive os patógenos que chegam às águas marinhas através do despejo de efluentes provenientes de ambientes terrestres (DECHO, 1999), entre outras.

Bactérias patogênicas podem atingir a zona costeira através de fontes terrestres como os efluentes domésticos (PAYMENT et al., 1989). Quando lançadas em águas marinhas sofrem um estresse pela mudança brusca de salinidade e radiação UV, existindo algumas que conseguem sobreviver, gerando uma importante questão de saúde pública, principalmente em águas recreacionais e alimentos de origem marinha (STANWELL-SMITH, 1991).

A sobrevivência desses patógenos pode estar relacionada com sua associação a agregados marinhos. Quando as células estão enclausuradas na matriz de partículas exopoliméricas, tornam-se mais resistentes à antibióticos, metais tóxicos, cloração e outros agentes microbianos (DECHO, 1999; STEWART & COSTERTON, 2001). O aumento da resiliência das células em ambientes marinhos ainda não é bem compreendido, mas pode ser atribuído a fatores como a ligação direta entre os agentes tóxicos na matriz do biofilme, a redução nas taxas fisiológicas das células e um

aumento na transferência horizontal de plasmídeos de resistência (TEITZEL & PARSEK, 2003)

Além de refúgio para patógenos, o biofilme de área entre-marés também possui papel importante na seleção de habitat para larvas em fase de assentamento e propicia a principal fonte de alimento para uma variedade de animais forrageadores que vivem no costão rochoso (como o isópoda *Ligia exótica*, por exemplo) (HUANG & BONEY, 1984; HILL & HAWKINS, 1991; HUNG et al., 2007). Constituem também uma importante fonte de carbono orgânico para teias alimentares tanto do sistema bentônico quanto do pelágico (NAGARKAR et al., 2004; DOI et al., 2008).

Como visto, os costões rochosos são ambientes de extrema importância e o biofilme nele existente contribui para a manutenção de inúmeras espécies que ali vivem e para a produtividade primária local e adjacente. Entretanto, o mesmo biofilme, se proveniente de costões rochosos de áreas contaminadas por esgotos domésticos, pode concentrar vários tipos de micro-organismos, inclusive os patogênicos, tornando-se uma fonte de risco para saúde ambiental e para saúde pública, principalmente no que diz respeito ao consumo de alimentos pelas comunidades tradicionais.

O desenvolvimento desordenado das cidades nas zonas costeiras, o aumento populacional sem que haja aumento na infraestrutura de saneamento básico, bem como a ausência de políticas públicas definidas para preservação ambiental fazem com que, tanto este ambiente, quanto toda a zona costeira estejam constantemente sob forte influência de impactos antrópicos. Assim, torna-se de suma importância estudos que ajudem a compreender este ambiente e levem a considerações para sua preservação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da contaminação fecal na composição da microbiota de biofilmes em costões rochosos do município de Ubatuba, Estado de São Paulo.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a composição da microbiota (cianobactérias, bactérias heterotróficas) e microfitoplâncton (diatomáceas e nanoheterótrofos) do biofilme de costões rochosos com diferentes graus de impacto por despejo de efluentes domésticos
- Analisar a variação sazonal das espécies microbianas predominantes, de acordo com a zonação (meso e infralitoral) e com o grau de exposição às ondas (semi exposto e abrigado).
- Analisar a presença de indicadores de contaminação fecal no biofilme e sua relação com a zonação e águas adjacentes

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

A região costeira do Município de Ubatuba está localizada no Sudeste da costa brasileira a 23°S - 25°W, no Litoral Norte do Estado de São Paulo (Fig. 3). O sistema é considerado meso-oligotrófico, sendo caracterizado por temperaturas entre 14 e 24°C e salinidades entre 35 a 36,8 (CASTRO-FILHO et al., 1987). A produção primária é baixa, apresentando valores diários entre 400 e 600 mg.cm⁻² (GIANESELLA-GALVÃO & SALDANHA-CÔRREA, 1995), tendo o nitrogênio como fator limitante desta produção (AIDAR et al., 1993).

O regime hidrográfico dominante na região foi descrito por Castro-Filho et al. (1987), compreendendo três massas de água em sua plataforma continental: a Água Costeira (AC), a Água Tropical (AT) e a Água Central do Atlântico Sul (ACAS). A AC resulta da interação de água doce (oriunda de rios, córregos e chuvas) com a água da plataforma continental; a AT, que se encontra geralmente ao largo, apresenta salinidades mais elevadas; e a ACAS, caracterizada por salinidades e temperaturas relativamente baixas, penetra pelo fundo em direção à plataforma continental e desloca grandes quantidades de águas costeiras. A penetração da ACAS, mais fria e rica em nutrientes, é especialmente mais importante durante o período de verão, estratificando a coluna de água e causando efeito eutrofizante sobre a camada de mistura dominada pela AT (AIDAR et al., 1993). Durante o inverno, a coluna de água é homogênea e sem movimentos turbulentos (PIRES-VANIN et al., 1993). A precipitação média anual é de

2,154,2mm, sendo o período entre os meses de novembro a março o mais chuvoso (SÃO PAULO, 2011).

O município de Ubatuba possui cerca de 86,392 habitantes tendo uma densidade demográfica de 108,87 hab/km² e IDH de 0,751 (Brasil, 2015). Sua economia baseia-se no comércio, na prestação de serviços e no turismo, sendo um dos cinco destinos turísticos mais procurados do Estado de São Paulo e um dos 30 mais visitados do país (SÃO PAULO, 2011).

Segundo dados da Prefeitura de Ubatuba, o índice de atendimento do sistema de esgotamento sanitário é de 33,5%, dos quais 22,5% correspondem ao atendimento pela SABESP e 10% aos sistemas alternativos. O índice de tratamento de esgoto é de 100% em relação ao esgoto coletado.

As praias amostradas foram as praias de Itaguá, Praia Grande, Domingas Dias e Enseada. A escolha das praias amostradas se deu por conta de estudo prévio (Pinto et al 2008) que utilizou as mesmas praias sendo consideradas abrigadas as praias da Enseada e Domingas Dias e moderadamente expostas as praias Grande e Itaguá. De acordo com dados anuais de balneabilidade publicados pela Cetesb, as praias Domingas Dias e Enseada são consideradas próprias para banho enquanto que, a praia de Itaguá classifica-se como imprópria. A praia Grande é um caso à parte, pois, no geral, encontra-se própria para banho com exceção de algumas poucas amostragens tendo sido entretanto selecionada pela presença de uma condição de acúmulo de lixo o que pode acarretar em mudanças na qualidade do ambiente adjacente.

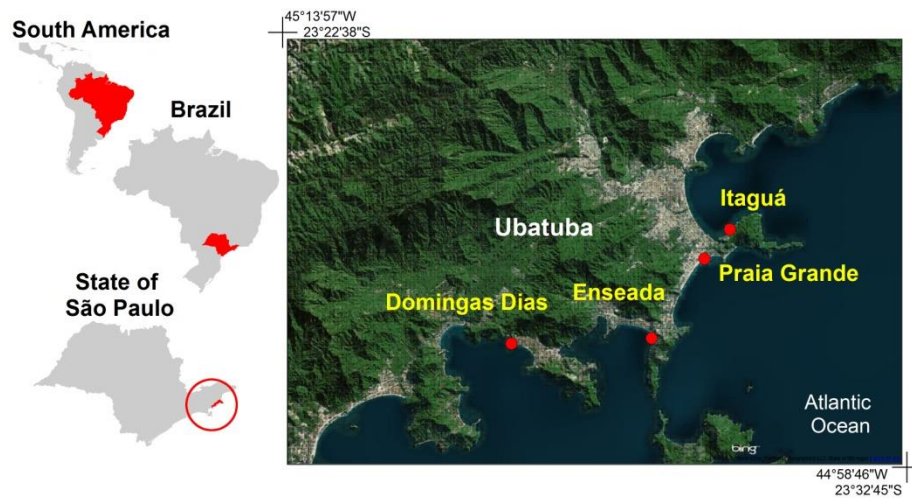


Figura 3-- Mapa da localização do Município de Ubatuba com as praias amostradas. (Note que o ponto de Itaguá foi considerado semi exposto por sua face noroeste, recebendo maior embate de ondas) (Imagem: Kaline de Mello)

4.2. Coleta de Amostras

Em cada um dos costões rochosos selecionados (abrigados: Enseada e Domingas Dias; e maior hidrodinâmica: Praia Grande e Itaguá), sempre em período de maré vazante, foram retiradas amostras de fragmentos rochosos, em triplicata, em pontos georeferenciados demarcados nas duas faixas de zonação (meso e infra-litoral) (Fig. 4).

Devido ao tempo necessário para a execução das técnicas de isolamento, identificação e quantificação dos micro-organismos estudados, as amostragens foram realizadas mensalmente no verão (dezembro/2012 a fevereiro/2013), bem como no inverno (junho a agosto/2013), totalizando seis coletas e 144 amostras. Adicionalmente,

, algumas recoletas foram necessárias ao longo do ano de 2014, com idêntica quantidade de amostras.

As amostras destinadas à quantificação por microscopia de epifluorescência foram colocadas em frascos contendo formaldeído a 5% de concentração final (v/v), para fixação dos micro-organismos.

As amostras destinadas ao isolamento de micro-organismos foram processadas para desagregação e extração dos micro-organismos, sendo colocadas em frascos contendo água do mar filtrada em 0,22 μ m e esterilizada, os quais em seguida foram submetidos à agitação para desagregação dos micro-organismos e plaqueamento pela técnica “spread plate”.

Para a determinação de bactérias indicadoras de contaminação fecal no biofilme, o mesmo foi raspado, com o auxílio de um bisturi estéril, e o material obtido foi acondicionado em frascos estéreis e mantidos sob refrigeração até o processamento das amostras.

Enquanto que, para as determinações nas amostras da água adjacente, as amostras foram coletadas com o auxílio de frascos esterilizados, contendo ETDA e Tiosulfato de Sódio. As análises das amostras foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Marinha (MicroMar), do Instituto de Biociências (IB), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus do Litoral Paulista (CLP).

Em cada ponto amostral foram determinados os fatores temperatura, oxigênio dissolvido (OD) e pigmento fotossintético (clorofila *a*). Todas as medidas foram feitas em triplicata. A temperatura foi medida, com um termômetro digital (precisão de 0,01°C e o oxigênio dissolvido, com uma sonda multiparâmetro HANA (precisão de 0,01 mg/L).

Para extração de clorofila-*a*, fragmentos de rocha de aproximadamente 1cm² foram removidos do costão e, imediatamente, imergidos em frascos contendo água do mar filtrada (0,2µm) (THOMPSON *et al.*, 1999). Após 30 minutos o material foi transferido para *vials* contendo acetona 90% (a -10°C). O pigmento foi quantificado em fluorímetro (Turner Trilogy) previamente calibrado com clorofila-*a* pura (Sigma®).

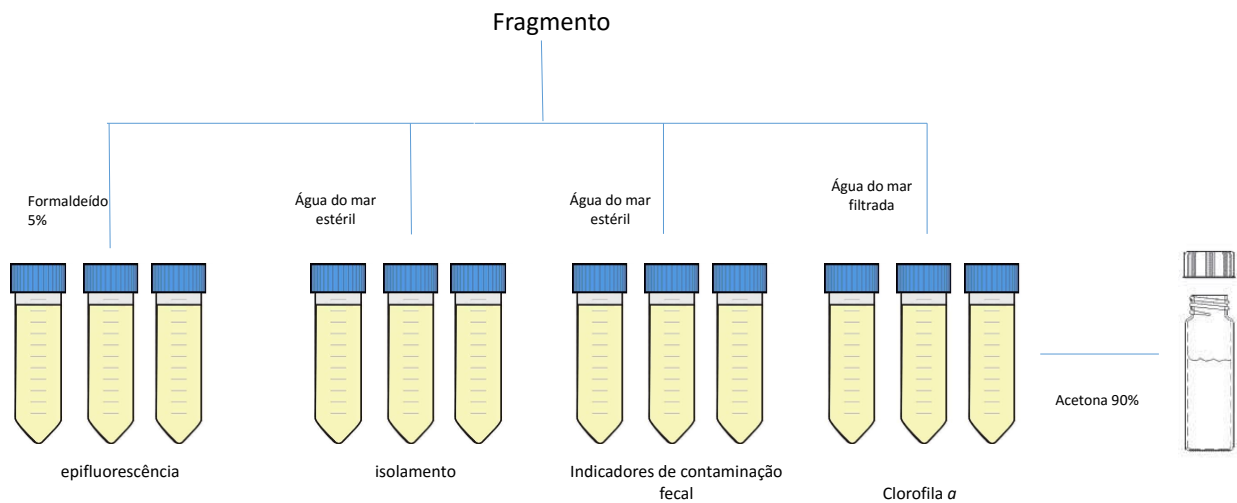


Figura 4- Esquema do processamento das coletas realizadas para amostragem dos micro-organismos e determinação da concentração de clorofila a. 3 amostragens no inverno e 3 no verão nos níveis de infralitoral e mesolitoral dos costões estudados, totalizando 144 amostras

4.3 Densidade dos Micro-organismos

O material fixado foi primeiramente agitado em agitador de tubos tipo Vortex, por 5 minutos (para desagregação dos micro-organismos), deixado em repouso por 2 minutos e, em seguida, filtrado (para a confecção das lâminas) (Fig.5). Estas, por sua vez, foram analisadas por contagem direta sob microscopia de epifluorescência (Fig.6).

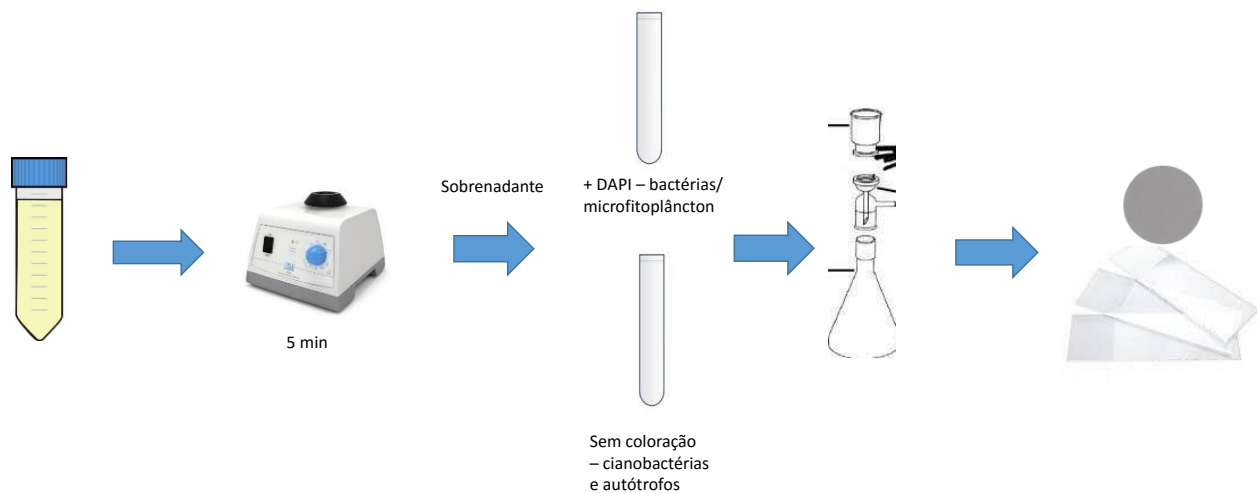


Figura 5 –Esquema da preparação das amostras para análise sob microscopia de epifluorescência



Figura 6-Equipamento de filtração e microscópio de epifluorescência similares aos utilizados no presente estudo

Alíquotas de 1mL do sobrenadante de cada amostra foram transferidas para tubos de ensaio e coradas com DAPI, 4',6-diamidino-2-fenolindol (PORTER & FIEG, 1980) e, então, filtradas em membranas Nucleopore Black (porosidade 0,22 μm), para a enumeração de bactérias heterotróficas (HOBBIE *et al.*, 1977). As membranas foram dispostas em lâminas, com a quantificação dos micro-organismos realizada em microscópio de epifluorescência Nikon® Eclipse 50i, sob luz ultravioleta (330 a 390nm)

utilizando uma câmera digital MoticamPro® 282B e software analisador de imagens Motic Advanced® 3.2.

Para enumeração das cianobactérias as amostras foram filtradas em membrana Nucleopore Black (0,22µm) e observadas em relação à autofluorescência dos pigmentos fotossintéticos. As membranas foram dispostas em lâminas e observadas em microscópio de epifluorescência sob luz azul (450 a 490 nm).

Para a contagem de nanoheterótrofos, alíquotas de cada amostra foram filtradas em membranas Nucleopore (8,0µm), para remover os micro-organismos de maior tamanho. Em seguida, o material foi previamente filtrado foi corado com DAPI e filtrado novamente em membrana Nucleopore 2,0µm (FENCHEL, 1982). Nanoflagelados foram discriminados como autótrofos e heterótrofos, de acordo com a coloração que apresentaram, avermelhada e azulada, respectivamente.

Os resultados obtidos foram expressos em células por mL, sendo calculados através da seguinte fórmula:

$$\frac{xcont * fct}{(vf * cf) * dil}$$

Onde:

xcont= média das contagens dos campos no microscópio

fct= fator calculado para o microscópio Nikon Eclipse 55i

vf= volume filtrado de cada amostra

cf= correção para 5% de formol

dil= diluição da amostra

Para contagem de diatomáceas alíquotas de 5,0 mL foram dispostas em câmara de sedimentação (câmara de Ütermohl) e analisadas sob microscópio invertido, sendo distinguidas aquelas cêntricas (DC) das penadas (DP). Foram contadas 400 células em cada amostra e calculada a porcentagem das DC e DP referente ao número total.

4.4 Indicadores de contaminação fecal

O grau de contaminação fecal das amostras de água e de biofilme foi determinado através da determinação das densidades de dois indicadores bacterianos (*Escherichia coli* e *Enterococcus* sp), utilizando a técnica de membrana filtrante (APHA, 2012), tendo como meio de cultura o Agar mEnterococos e o meio Agar MTec modificado.

Com o auxílio de um bisturi estéril, foram raspados 100g do biofilme de cada fragmento de rocha. Cada alíquota de 100g foi acrescida de água destilada estéril (colocar a proporção) e então submetida a agitação por 10 minutos em um agitador Kline (Nova Técnica), para a lavagem e completa extração das bactérias de cada amostra. Em seguida, cada solução foi filtrada em membrana 0,45 µm, as quais foram depositadas em placas contendo os meios de cultura supracitados.

Para a determinação da densidade de *Enterococcus* sp nas amostras, as placas de Agar mEnterococos foram incubadas (37°C por 24/48h), em uma incubadora bacteriológica modelo Binder. Após este período foram contadas como *Enterococcus* sp as colônias de coloração vermelho-amarronzadas.

Colônias consideradas com Enterococos selecionadas aleatoriamente (10% do total) foram transferidas, com auxílio de alça de platina, para tubos de ensaio contendo meio de cultura Enterococosele caldo para confirmação do gênero.

Já para a determinação de *Escherichia coli*, as placas de Agar MTec modificado foram incubadas em estufa (37°C por 02 h) e, após, em banho maria (44°C por 24/48h). As colônias de coloração vermelha ou magenta foram consideradas como *E.coli*, realizando-se a confirmação através da utilização de substrato de uréia

Para a água do mar adjacente, foram filtrados 100 ml de amostra, com os meios de cultura, incubação e contagem idênticos aos utilizados para as amostras de biofilme.

As densidades de bactérias foram expressas em Unidades Formadoras de Colônias por 100ml (UFC 100 ml⁻¹) para água do mar e Unidades Formadoras de Colônias por 100g (UFC 100 g⁻¹) para o biofilme.

4.5 Isolamento e identificação de bactérias cultiváveis

Para o isolamento das bactérias heterotróficas, 100µl da solução obtida para extração de bactérias, foram inoculados em placas com o meio de cultura Marine Agar 2216E I, preparado com água do mar envelhecida estéril, pela técnica de *Spread Plate*. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (36°C por 24/48 h) ou até que apresentassem um crescimento vigoroso.

Colônias de bactérias heterotróficas com aspectos morfológicos distintos quanto à coloração, tamanho e formato da colônia foram então isoladas, purificadas através da técnica de esgotamento e armazenadas em Marine Agar 2216E a -80°C, para uma

posterior identificação por testes bioquímicos segundo manual *Bergeys* e através de ferramentas moleculares.

Para a realização da identificação molecular foi feita uma extração do DNA genômico das colônias armazenadas, utilizando o PureLink® Genomic DNA Kit, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi analisado em gel de agarose 0,8% e, em seguida, quantificado.

O DNA genômico de cada isolado bacteriano foi utilizado como molde para amplificação da região do gene 16S rDNA através de reação de polimerização em cadeia (PCR). Foram utilizados oligonucleotídeos para o domínio Eubacteria fD1 "forward" (5'-17AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 "reverse" (5'AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG et al., 1991) e os oligonucleotídeos 8FPL "forward" (5' GCGGATCCGCGGCCGCTGCAGAGTTTG-3') E 149RPL "reverse" (5'-GGCTCGGAGCGGCCGCCCCGGGTTACCTT-3').

As reações foram realizadas em volume final de 50 µl, contendo 20 pmols de oligonucleotídeos, 200 µM de cada dNTP, 1X tampão da enzima (explicar a concentração), 2 U da enzima Taq DNA polimerase (FERMENTAS), 1,5 mM de MgCl₂ e 20 ng de DNA molde.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti-96 well thermal cycler (Applied Biosystems), dentro do programa 94°C/3 minutos, 30 ciclos de amplificação (94°C/1 minuto, 55°C/30 segundos, 72°C /30 segundos), 72°C/10 minutos.

A avaliação dos amplificons foi feita por eletroferese, em gel de agarose 0,8%. O DNA amplificado foi purificado usando o PureLink® Quick Gel Extraction and PCR purification Combo Kit (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Após a

purificação, foram retirados 5 µl do produto final, para avaliação por eletroforese em gel de agarose 0,8%, com a quantificação do DNA para realização da reação de sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit Sequencing - Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism versão 3 – Life Technologies. Cada reação de sequenciamento foi ajustada para um volume final de 10 µl, utilizando 20ng dos fragmentos de interesse, 3,2 pmols de oligonucleotídeos iniciadores, 2,0 µl de tampão 2,5x e 0,5 µl dos terminadores Big Dye. As condições de reação foram: 96°C/1 min.; 25 ciclos (96°C/1 min., 50°C/5s., 60°C/ 4 min.).

Após a reação foi realizada a precipitação adicionando-se 2,5 µl de EDTA 125mM, 30 µl de etanol 100%. A solução foi misturada por inversão e centrifugada por 20 min. (13.4000 rpm a 4°C). Depois do sobrenadante ter sido descartado, foi adicionado 30µl de etanol 70% e centrifugado novamente nas mesmas condições (reescrever). O sobrenadante foi novamente descartado, a amostra seca a temperatura ambiente e depois armazenada a 4°C.

O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano e células-tronco (CEGH-CEL), no Instituto de Biociências (IB), da Universidade de São Paulo (USP), através de sequenciador ABI, modelo 3130 (Applied Biosystems).

As seqüências encontradas foram alinhadas utilizando o programa *Clustal W 1.8*. Posteriormente, as sequencias foram ajustadas com o auxílio do programa *BioEdit*, de forma que todas tivessem o mesmo número de bases e estivessem completamente alinhadas.

Foi utilizado o programa *BLAST*, contra a base de dados do *NCBI* (*National Center of Biotechnology Information*) para determinar as espécies de bactérias referentes às sequências de DNA genômico encontradas. A análise de distância foi feita com base na região 16S rDNA, utilizando o programa Mega6. Cada sequência obtida neste trabalho foi alinhada às sequências semelhantes (selecionadas pela busca no *BLAST*), em um alinhamento múltiplo, o qual foi gerado automaticamente pelo Mega6. Em seguida, foi gerada a árvore pelo método de distância Neighbor-Joining, com base no modelo Tamura-Nei, para a confirmação da espécie identificada.

4.6 Análise estatística

Todos os dados gerados foram testados em relação à distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilks, bem como em relação à homocedasticidade pelo teste de Cochran.

Nos casos de normalidade, os dados foram submetidos a um teste paramétrico (ANOVA com contraste entre as médias “a posteriori” por Tukey). No caso de não normalidade, os dados foram submetidos a um teste estatístico não paramétrico (Kruskal-Wallis a 95% de significância, onde “Exposição” (fator fixo), foi estabelecido com 2 níveis (semi exposto e abrigado), “Sazonalidade” (fator aleatório) com 2 níveis (verão e inverno), “Zonação” (fator fixo) com 2 níveis (infralitoral e mesolitoral).

A influência da temperatura e do oxigênio dissolvido foi avaliada utilizando-se uma correlação de Spearman a 95% de significância.

A diversidade de bactérias cultiváveis foi determinada através do Índice de Simpson avaliando a abundância relativa de cada espécie identificada frente ao número total de isolados que puderam ser identificados. Para identificar quais fatores tiveram maior influência nas diferenças encontradas foi utilizada uma análise de componentes principais com um bootstrap de 10000 replicagens. As análises foram realizadas com os programas R 3.1.1 (R CORE TEAM, 2013) e PAST (HAMMER et al., 2001).

5. RESULTADOS

5.1 Indicadores de contaminação fecal nas águas adjacentes e biofilme

As tabelas 1 e 2 mostram as médias de densidade e os respectivos desvios padrão das bactérias indicadoras de contaminação fecal nas águas do entorno dos costões estudados, nas duas estações do ano (verão e inverno).

Em todas as amostras as densidades médias de *E. coli* foram maiores no verão, com as amostras dos costões rochosos da Praia Grande e Itaguá com maiores densidades bacterianas ($1063,33 \text{ UFC.mL}^{-1}$ e 1240 UFC.mL^{-1} , respectivamente), tendo, portanto, maior nível de contaminação fecal.

Tabela 1- Densidades de *E. coli* (média \pm desvio padrão) nas águas adjacentes aos costões rochosos das praias estudadas, em duas estações do ano (verão e inverno).

Exposição	Praia	Estação	<i>E. coli</i> UFC 100mL ⁻¹ média \pm desvpad
Abrigado	Enseada	verão	126,6 \pm 20,82
	Enseada	inverno	56,6 \pm 11,55
	Domingas Dias	verão	66,6 \pm 46,19
	Domingas Dias	inverno	43,3 \pm 32,15
Semi-Exposto	Praia grande	verão	1063,3 \pm 55,08
	Praia grande	inverno	533,3 \pm 41,63
Exposto	Itaguá	verão	1240 \pm 317,49
	Itaguá	inverno	740 \pm 55,68

Um padrão semelhante foi observado em relação a *Enterococcus* sp, com as maiores densidades médias observadas no verão e, principalmente, nas amostras de água de entorno dos costões da Praia Grande e Itaguá (2330 UFC.mL^{-1} e 630 UFC.mL^{-1}).

¹, respectivamente). No entanto, cabe ressaltar que no costão da Praia de Enseada houve uma inversão, ocorrendo a maior densidade média de *Enterococcus* sp no inverno.

Tabela 2- Densidades médias e desvio padrão (desvpad.) de *Enterococcus* sp nas águas adjacentes aos costões das praias estudadas, nas estações do ano.

Exposição	Praia	Estação	<i>Enterococcus</i> UFC 100mL ⁻¹	Média \pm desvpad
Abrigado	Enseada	verão	173,3	150,11
	Enseada	inverno	233,3	41,63
	Domingas Dias	verão	57,3	18,58
	Domingas Dias	inverno	37,6	4,16
Semi Exposto	Praia grande	verão	2330	252,39
	Praia grande	inverno	1083,3	47,26
	Itaguá	verão	630	375,10
	Itaguá	inverno	273,3	20,82

Foram detectadas diferenças significativas entre as densidades dos indicadores microbianos em relação às praias avaliadas (KW= 18,32, p= 0,00038, para *E. coli*; e KW = 18,60, p=0,00033, para *Enterococcus* sp) (Fig. 7), sendo as maiores densidades encontradas nas praias expostas e mais impactadas (Praia Grande e Itaguá). No entanto, não foram confirmadas diferenças sazonais entre as médias de densidade de cada bactéria (KW=2,61, p=0,106, para *E.coli* e; KW = 0,141, p=0,71, para *Enterococcus* sp).

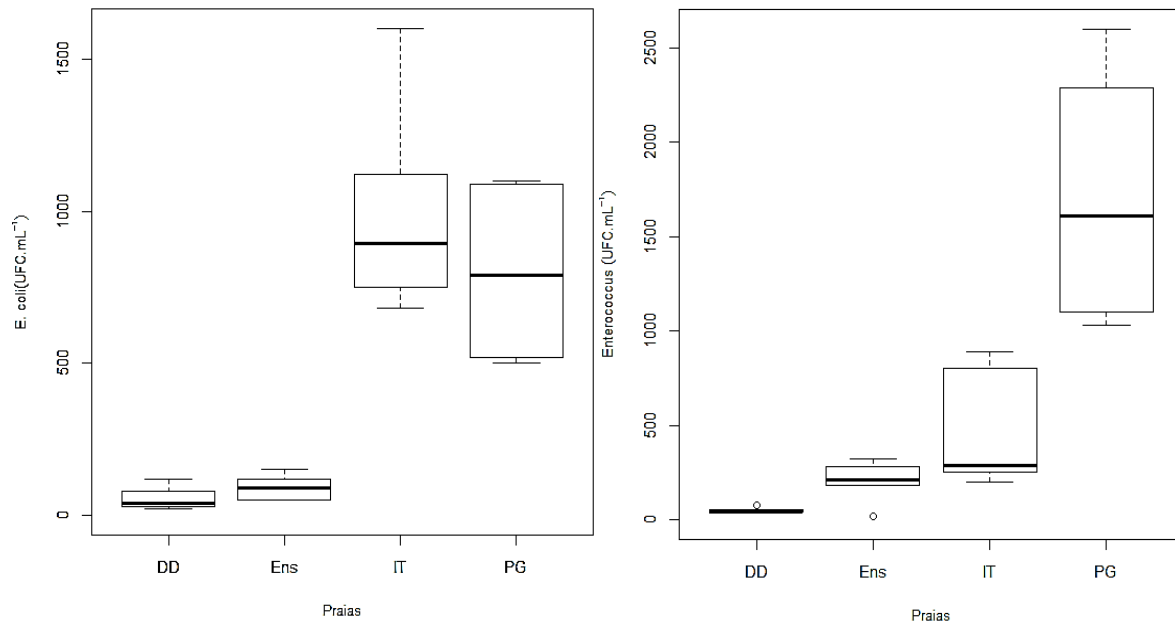


Figura 7- Densidades de *E. coli* e *Enterococcus* sp nas águas adjacentes aos costões rochosos das praias estudadas. (DD, Domingas Dias; ENS, Enseada; IT, Itaguá; e PG, Praia Grande). Onde: traço horizontal = média; box = média±desvio padrão; linhas limite verticais = média±1,96*desviopadrão; círculos brancos = outliers;)

Nas amostras de biofilme, em relação à *Escherichia coli*, foram observadas diferenças significativas em relação às praias (KW= 54,17, $p=1,03 \times 10^{-11}$) sendo que as maiores densidades médias foram obtidas nos biofilmes dos costões da Praia Grande e de Itaguá (5,02 UFC.mg⁻¹ e 10,5 UFC.mg⁻¹).

Também foram observadas diferenças significativas para a densidade em relação ao grau de exposição do costão rochoso (KW = 43,18, $p=4,9 \times 10^{-11}$), ocorrendo as maiores densidades naqueles mais expostos (7,76 UFC.mg⁻¹) (Fig. 8).

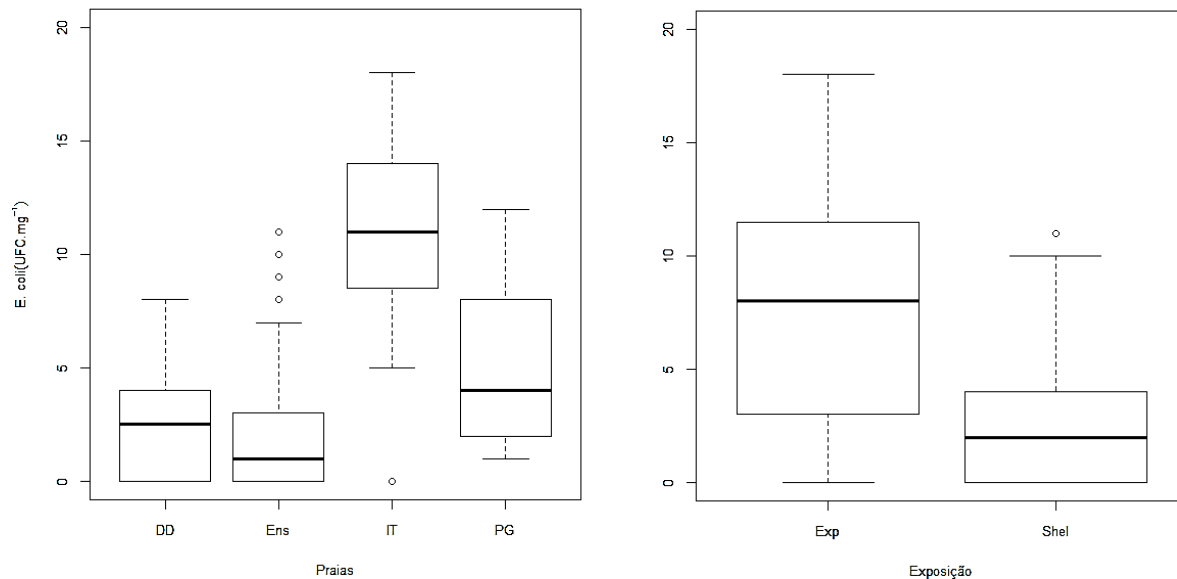


Figura 8- Densidades de *E.coli* nas amostras de biofilme. (DD-Domingas Dias, ENS-Enseada, IT-Itaguá e PG-Praia Grande; Exp-Semi-Exposto, Shel-Abrigado). Onde: traço horizontal = média; box = média±desvio padrão; linhas limite verticais = média±1,96*desviopadrão; circulos brancos = outliers; ***p<0.001 *p<0.05

Em relação às bactérias do gênero *Enterococcus* sp, também foi observado o mesmo padrão, com as maiores densidades também observadas nos biofilmes dos costões rochosos da Praia Grande e Itaguá (29,8 UFC.mg⁻¹ e 10,1 UFC.mg⁻¹), o mesmo ocorrendo nos ambientes semi- expostos (20 UFC.mg⁻¹) (Fig. 9).

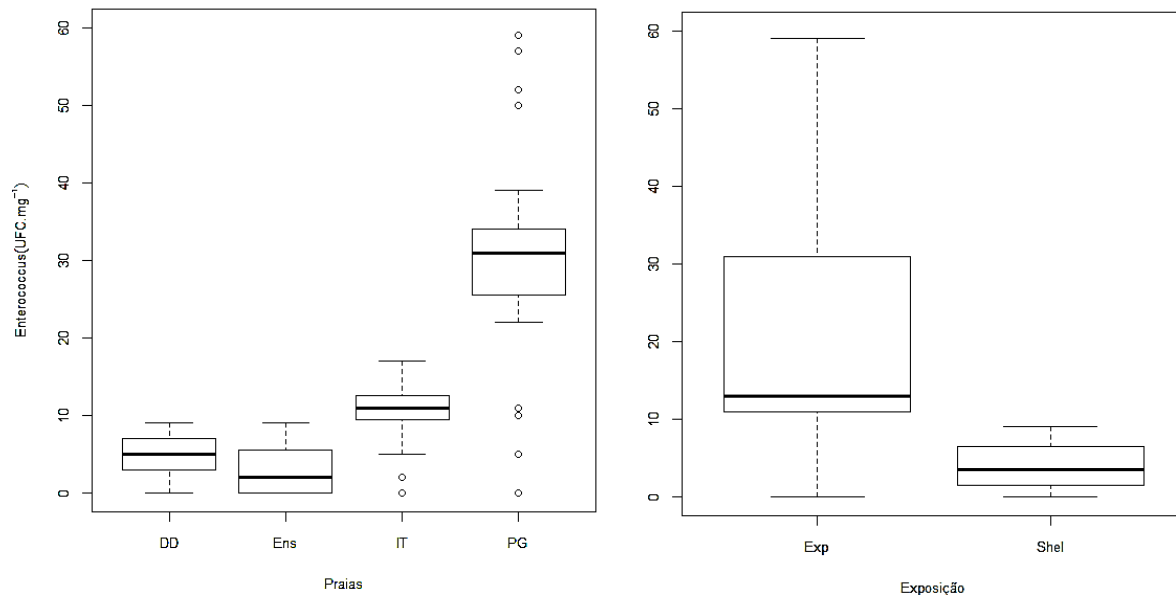


Figura 9- Densidades de *Enterococcus* nas amostras de biofilme. (DD-Domingas Dias, ENS-Enseada, IT-Itaguá e PG-Praia Grande; Exp-Semi Exposto, Shel-Abrigado). Onde: traço horizontal = média; box = média±desvio padrão; linhas limite verticais = média±1,96*desviopadrão; circulos brancos = outliers;

Não foram observadas diferenças significativas para os dois indicadores em relação à zonação (KW= 3,36, p=0,066, para *E.coli*; KW= 0,648, p=0,420, para *Enterococcus*) (Fig.10). Diferenças significativas entre o verão e o inverno foram observadas apenas para as médias de densidade de *E.coli*. (p=0,0217) (Fig.11).

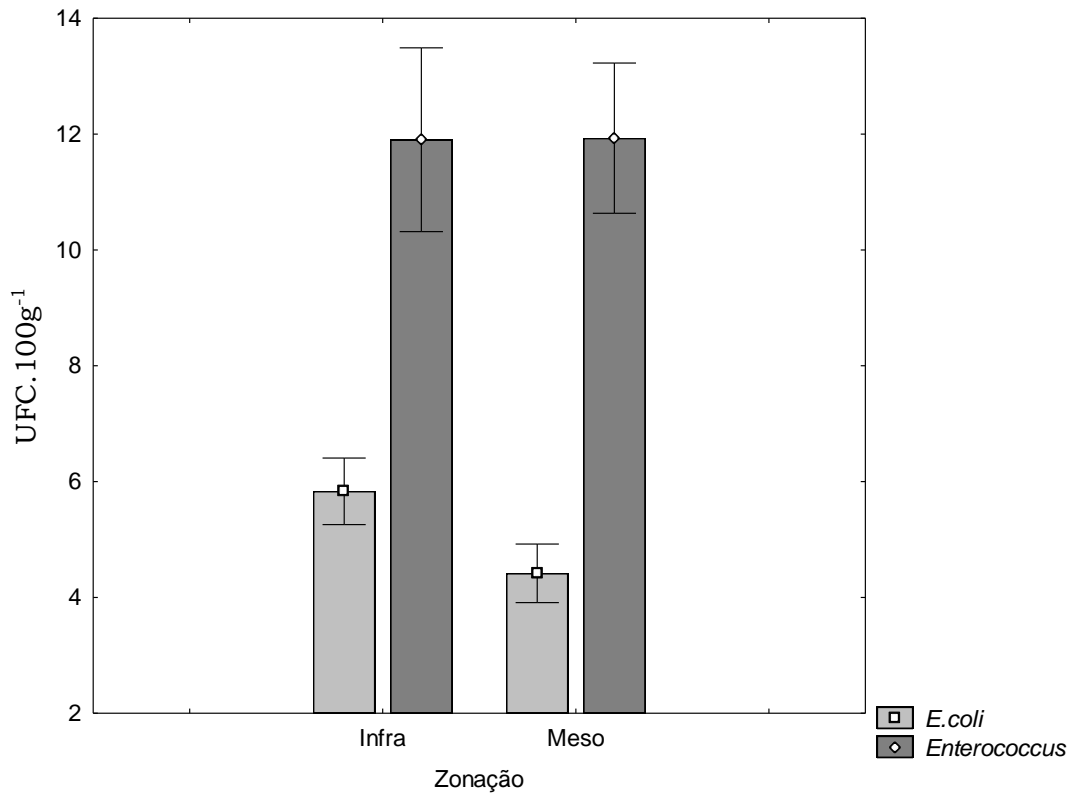


Figura 10- Densidade de *E.coli* e *Enterococcus* em relação à zonação. Média, Média \pm 0,95*SE

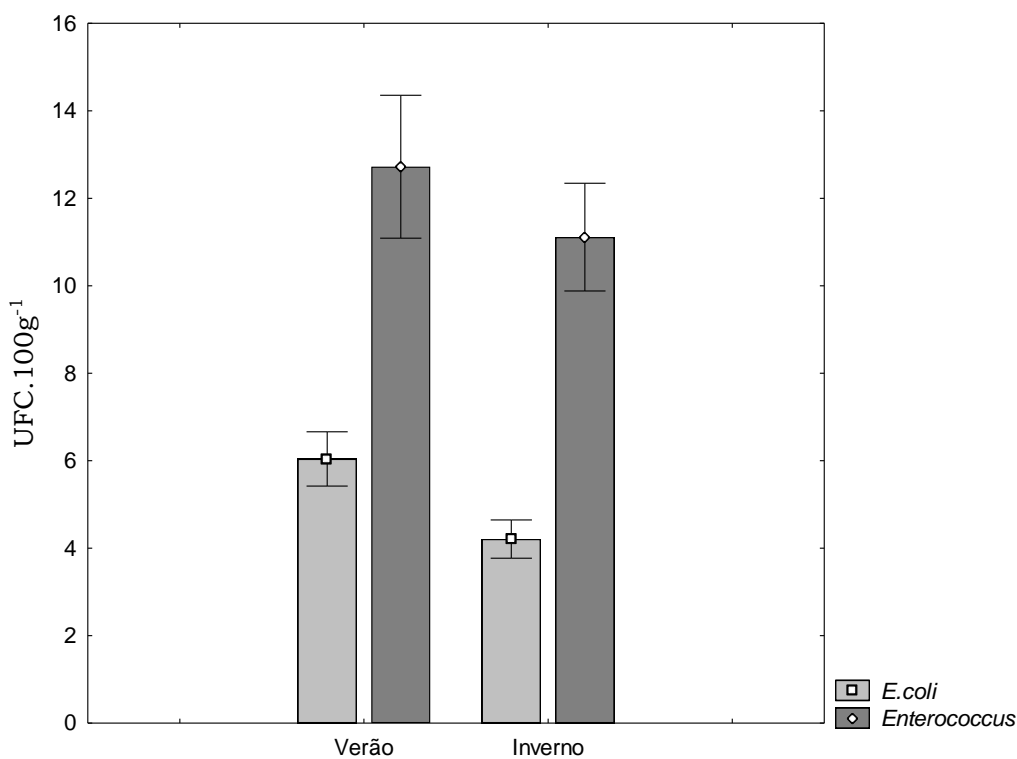


Figura 11-Densidade média de *E.coli* e *Enterococcus* em relação à sazonalidade. Média, Média \pm 0,95*SE

5.3 Clorofila-a

Os fatores exposição, zonação e costões rochosos (praias) influenciaram a concentração de clorofila-a presente no biofilme dos costões rochosos estudados. Em relação aos costões rochosos (praias) houve diferença significativa (KW = 117,45, $p=2,2 \times 10^{-16}$) nas concentrações de clorofila-a obtidas nas amostras de biofilme dos costões das praias da Enseada e Domingas Dias, sendo a maior média obtida para a Enseada (2,09 $\mu\text{g.cm}^{-2}$) e a menor na Praia Grande (0,20 $\mu\text{g.cm}^{-2}$). Observou-se, também, uma maior concentração de clorofila-a nos ambientes abrigados e no mesolitoral (Fig. 12).

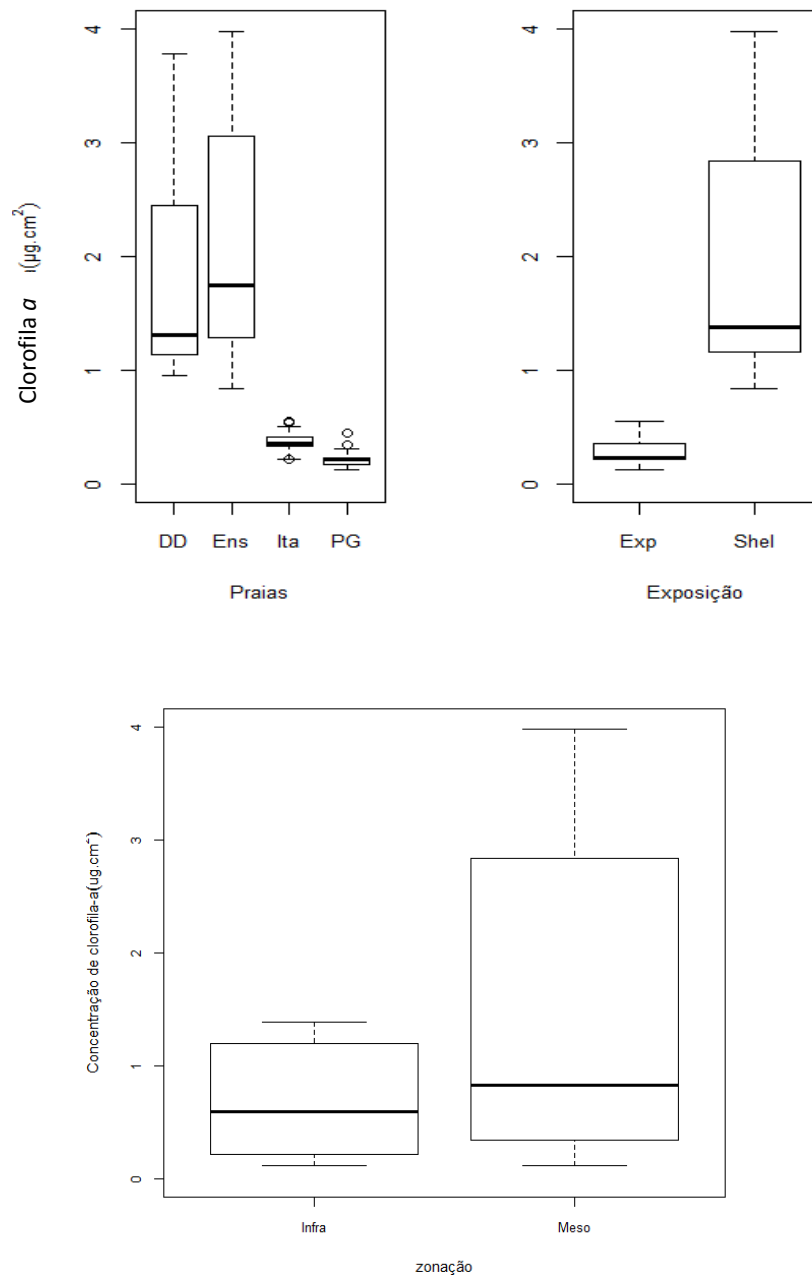


Figura 12- Concentração de clorofila-a nas amostras de biofilme em relação aos costões rochosos (praias), exposição e zonação do costão (infralitoral e mesolitoral). (DD-Domingas Dias, ENS-Enseada, IT-Itaguá e PG-Praia Grande; Exp-Semi Exposto, Shel-Abrigado). Onde: traço horizontal = média; box = média±desvio padrão; linhas limite verticais = média±1,96*desviopadrão; círculos brancos = outliers;

Não houve diferença significativa de clorofila a em relação à sazonalidade, sendo que, as maiores concentrações médias foram observadas no verão (Fig. 13)

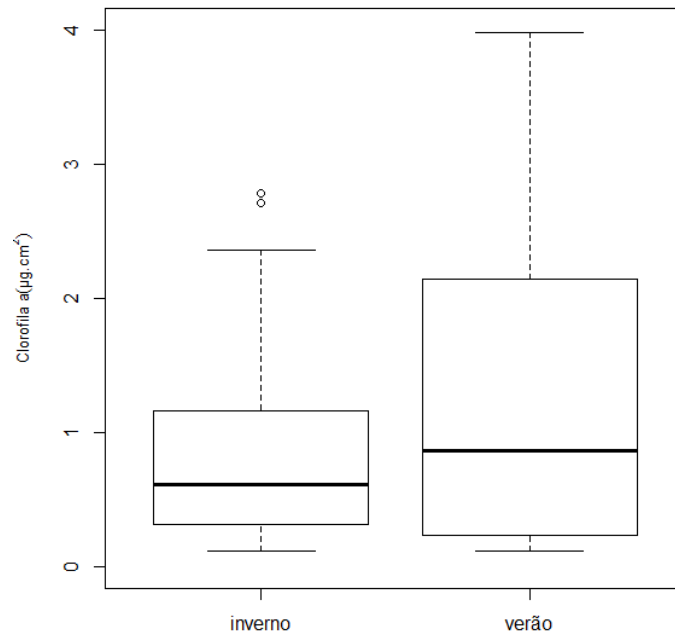


Figura 13- Concentração média de clorofila a no inverno e verão. Onde: traço horizontal = média; box = média \pm desvio padrão; linhas limite verticais = média \pm 1,96*desviopadrão; círculos brancos = outleiers;

5.4 Densidades de micro-organismos no biofilme

As imagens das bactérias heterotróficas obtidas por microscopia de epifluorescência são apresentadas na figura 14.

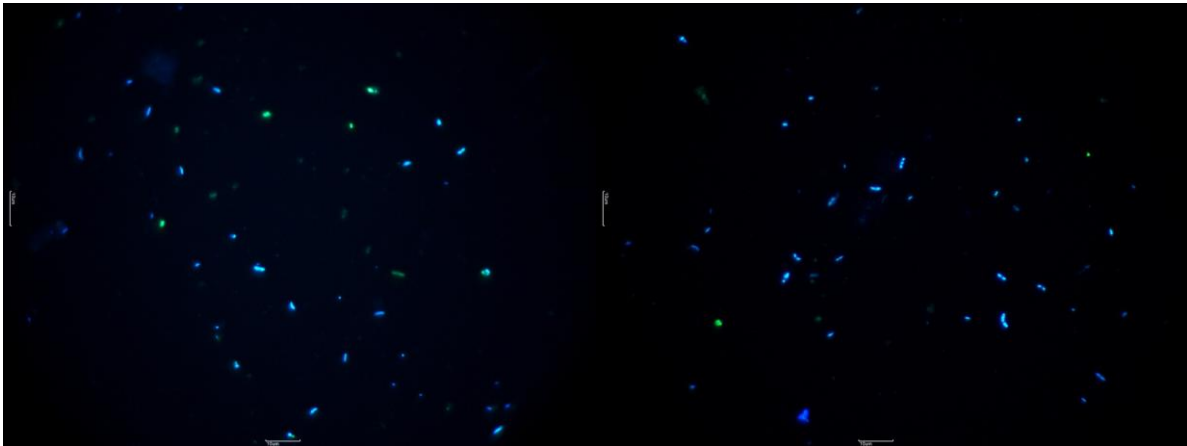


Figura 14-Bactérias coradas com DAPI. Imagens obtidas com Microscopia de Epifluorescência

A média de densidade de bactérias heterotróficas (Fig.15) foi maior nas praias Grande e Itaguá ($2,23 \text{ céls.mL}^{-1} \times 10^6$ e $2,27 \text{ céls.mL}^{-1} \times 10^6$).

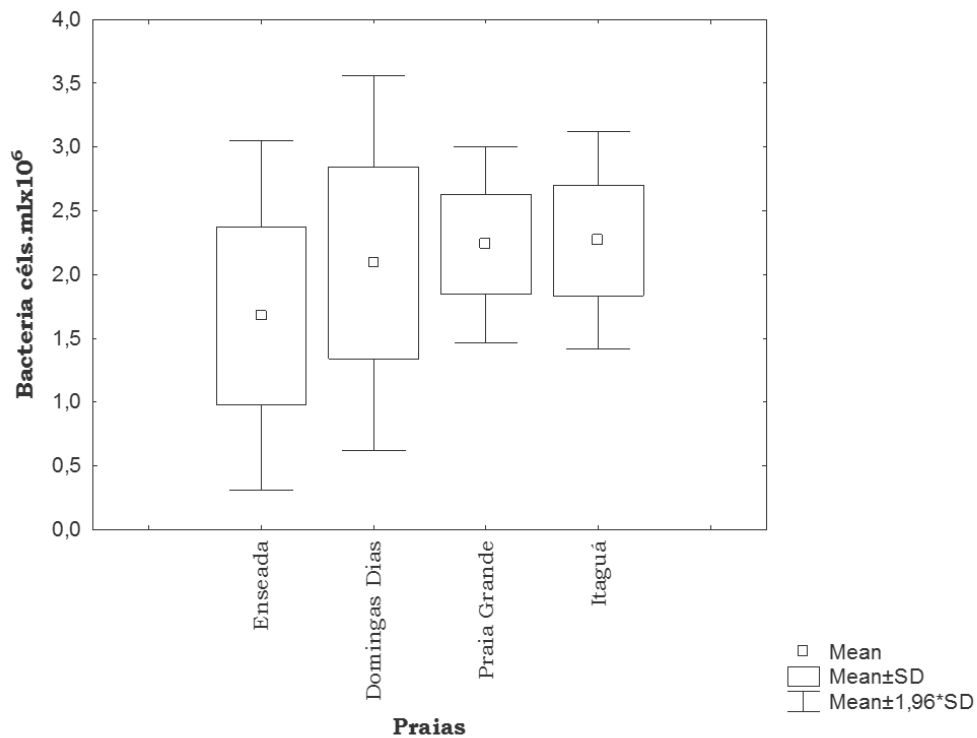


Figura 15- Densidades médias de bactérias heterotróficas nas praias estudadas; onde: marcador = média; box = média ± desvio padrão; linhas limite verticais = média ± 1,96*desviopadrão.

Houve diferenças significativas na interação dos fatores praia, estação e exposição (F=8,946, p=0,033) (Tab.3) sendo que as maiores densidades foram observadas nas praias semi-expostas durante o verão (Fig.16).

Tabela 3- Análise de Variância da densidade de bactérias heterotróficas com a interação dos fatores zonação, exposição e sazonalidade.

Fator	DF	MS	F	p
Zonação	1	0,0459	0,604	0,438364 ns
Exposição	1	4,8217	63,506	0,000000 ****
Sazonalidade	1	38,0381	500,992	0,000000 *
Zonação*Exposição	1	0,0298	0,392	0,532344 ns
Zonação*Sazonalidade	1	0,5916	7,792	0,006003 *
Exposição*Sazonalidade	1	2,1195	27,915	0,000000 ****
Zonação*Exposição*Sazonalidade	1	0,6793	8,946	0,003302 ***
Total	143			

****, p<0.001; ***, p<0.005; **, p<0.01; *, p<0.05; n.s, não significativo

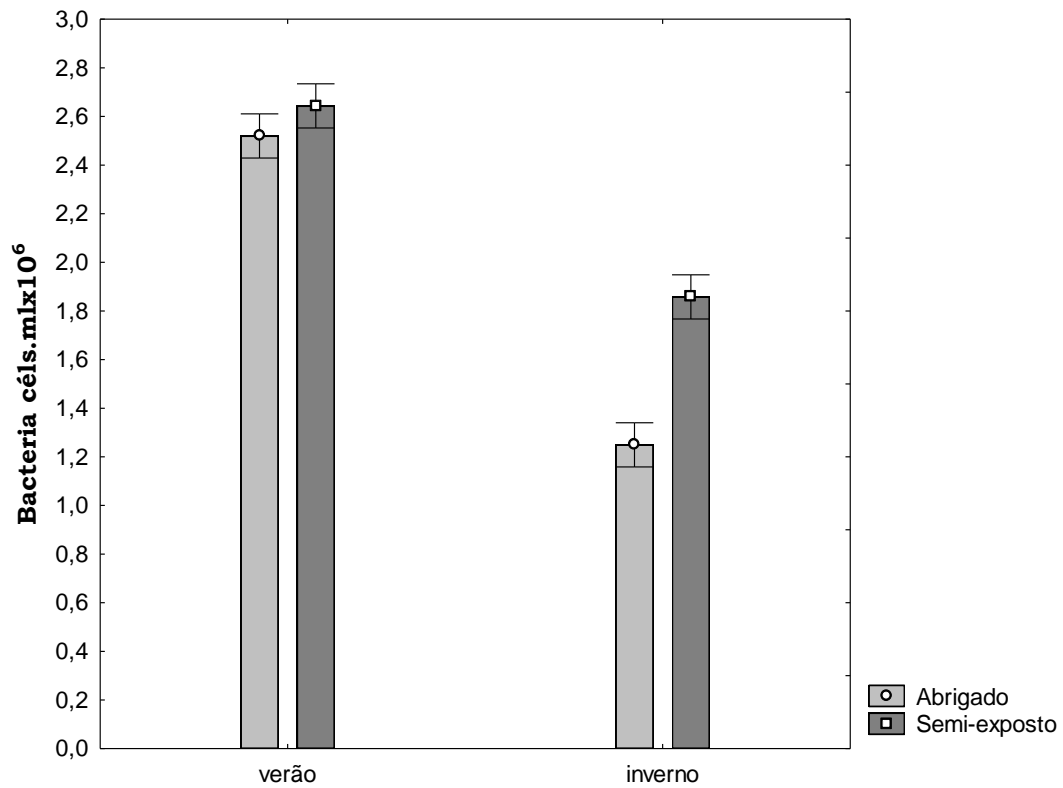


Figura 16- Densidade de bactérias nas amostras de biofilme no verão e inverno em relação à exposição às ondas (linhas verticais= intervalo de confiança a 95%)

A zonação teve influência apenas nos ambientes abrigados havendo diferenças significativas entre o infralitoral e o mesolitoral ($F= 27,915$, $p<0,01$) (Fig.17).

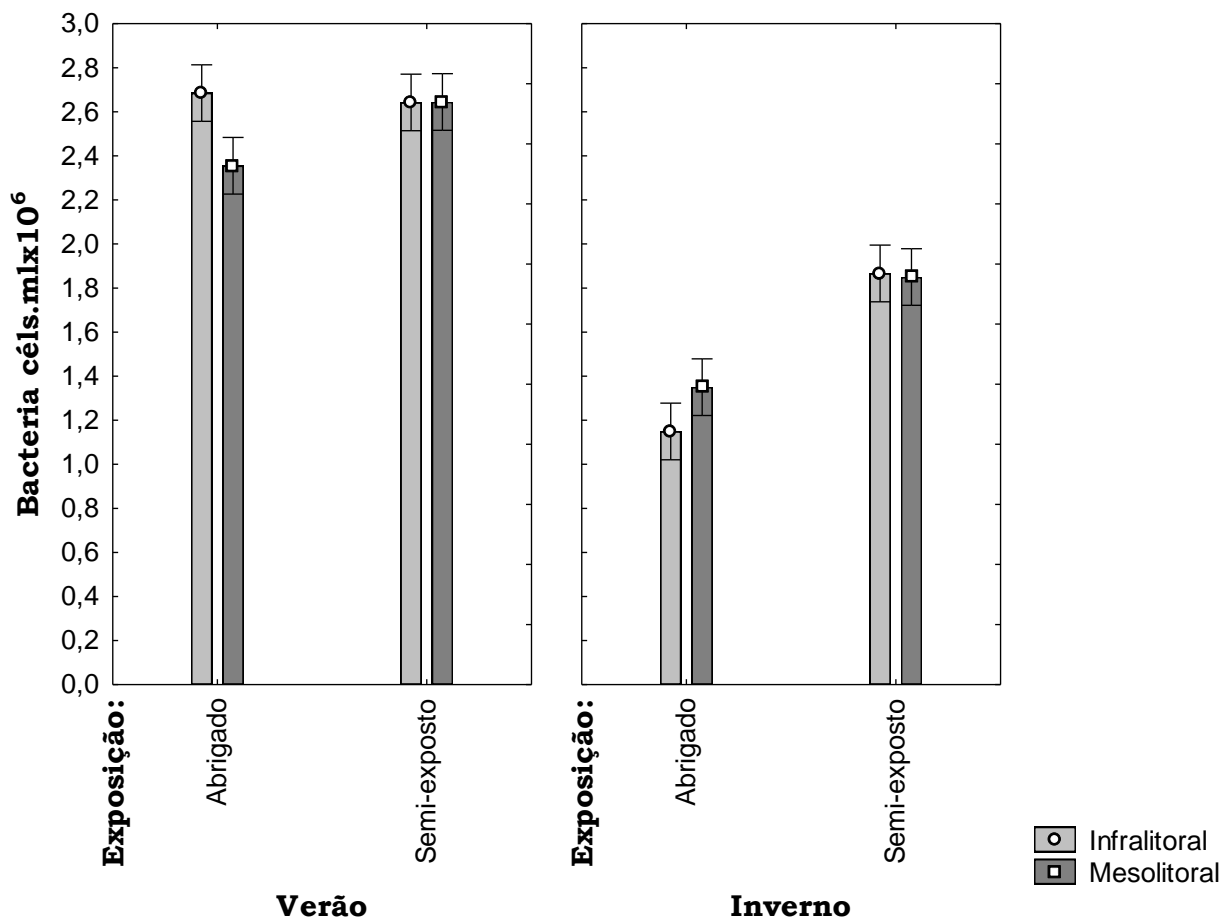


Figura 17- Densidade média de bactérias heterotróficas em relação aos fatores exposição, sazonalidade e zonação. (linhas verticais= intervalo de confiança a 95%)

As maiores médias de densidade de cianobactérias unicelulares (Fig.18) foram obtidas nos biofilmes da Praia Grande e da Enseada ($4,40 \text{ células.mL}^{-1} \times 10^3$ e $4,01 \text{ células.mL}^{-1} \times 10^3$, respectivamente).

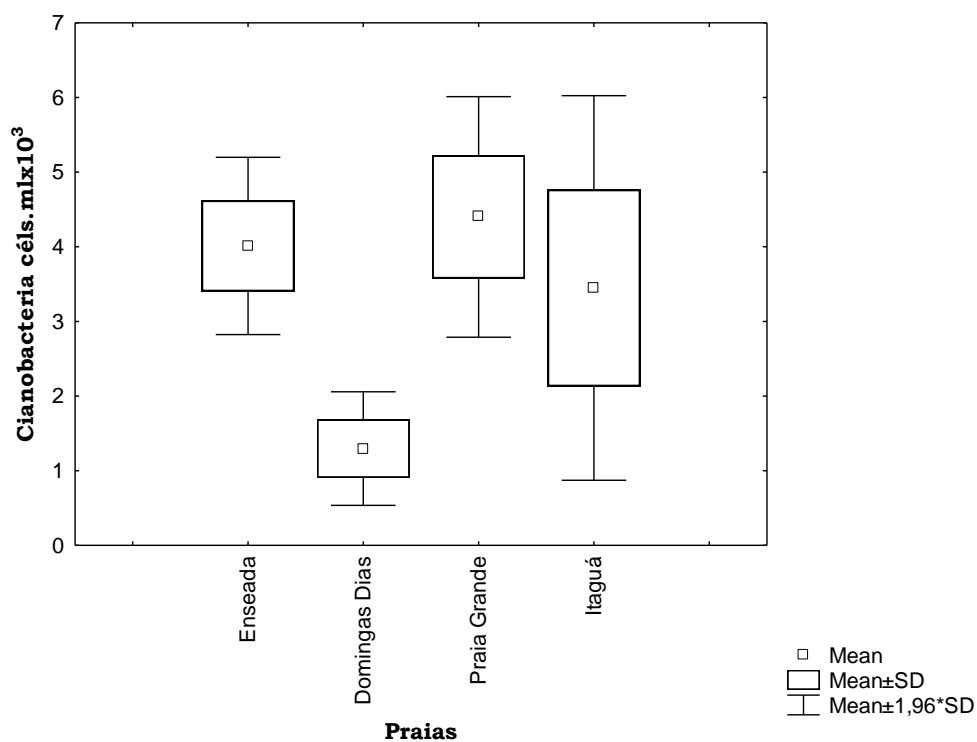


Figura 18- Densidade de cianobactérias unicelulares nas amostras de biofilme em relação às praias. Onde: marcador = média; box = média±desvio padrão; linhas limite verticais = média±1,96*desviopadrão.

Houve diferença significativa em relação à interação dos fatores exposição e sazonalidade ($F=5,6701$, $p=0,0186$) (Tab.4), sendo que as maiores densidades foram observadas nas praias semi-expostas no verão (Fig.19).

Tabela 4- Análise de Variância da densidade de cianobactérias unicelulares com a interação dos fatores zonação, exposição e sazonalidade

Fator	DF	MS	F	p
Zonação	1	0,881	0,686	0,408929 ns
Exposição	1	58,057	45,195	0,000000 ****
Sazonalidade	1	59,272	46,141	0,000000 ****
Zonação*Exposição	1	2,409	1,876	0,173103 ns
Zonação*Sazonalidade	1	2,583	2,011	0,158473 ns
Exposição*Sazonalidade	1	7,284	5,670	0,018642 *
Zonação*Exposição*Sazonalidade	1	4,123	3,210	0,075432 ns
Total	143			

****, p<0.001; ***, p<0.005; **, p<0.01; *, p<0.05; n.s, não significativo

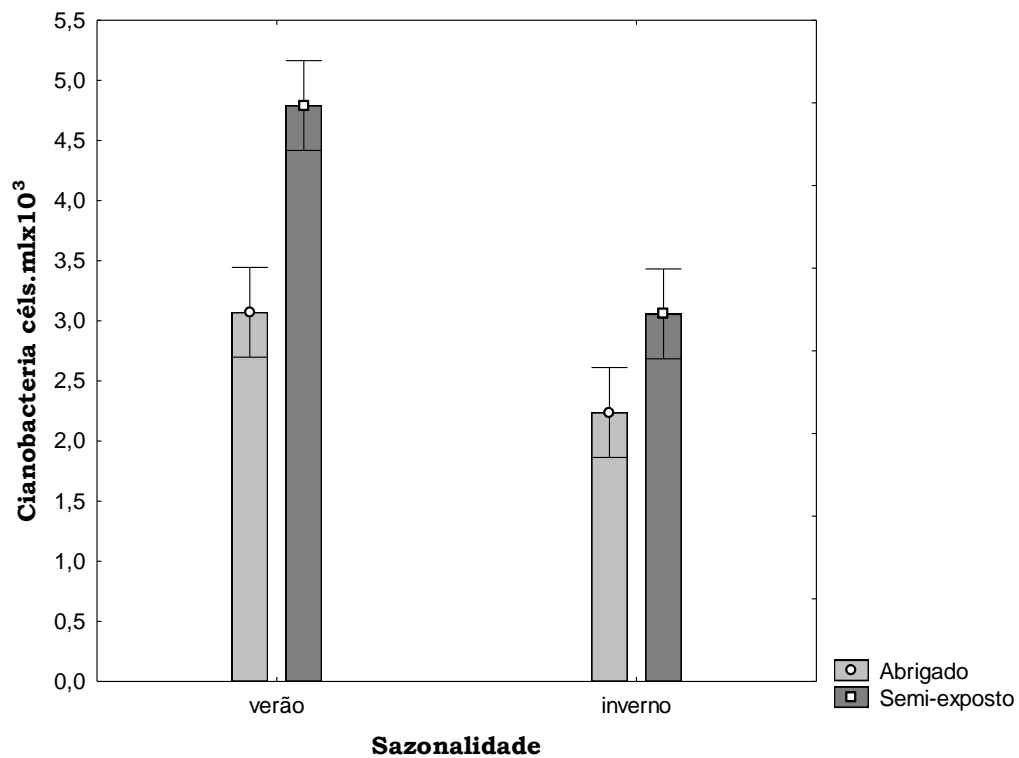


Figura 19- Densidade de cianobactérias unicelulares nas amostras de biofilme no verão e inverno em relação à exposição às ondas (linhas verticais== intervalo de confiança a 95%)

A zonação foi um fator de influência apenas dentro os costões, havendo diferença significativa apenas para os costões semi-expostos em relação ao meso e infralitoral ($F=94,493$, $p<0,01$) (Fig.20).

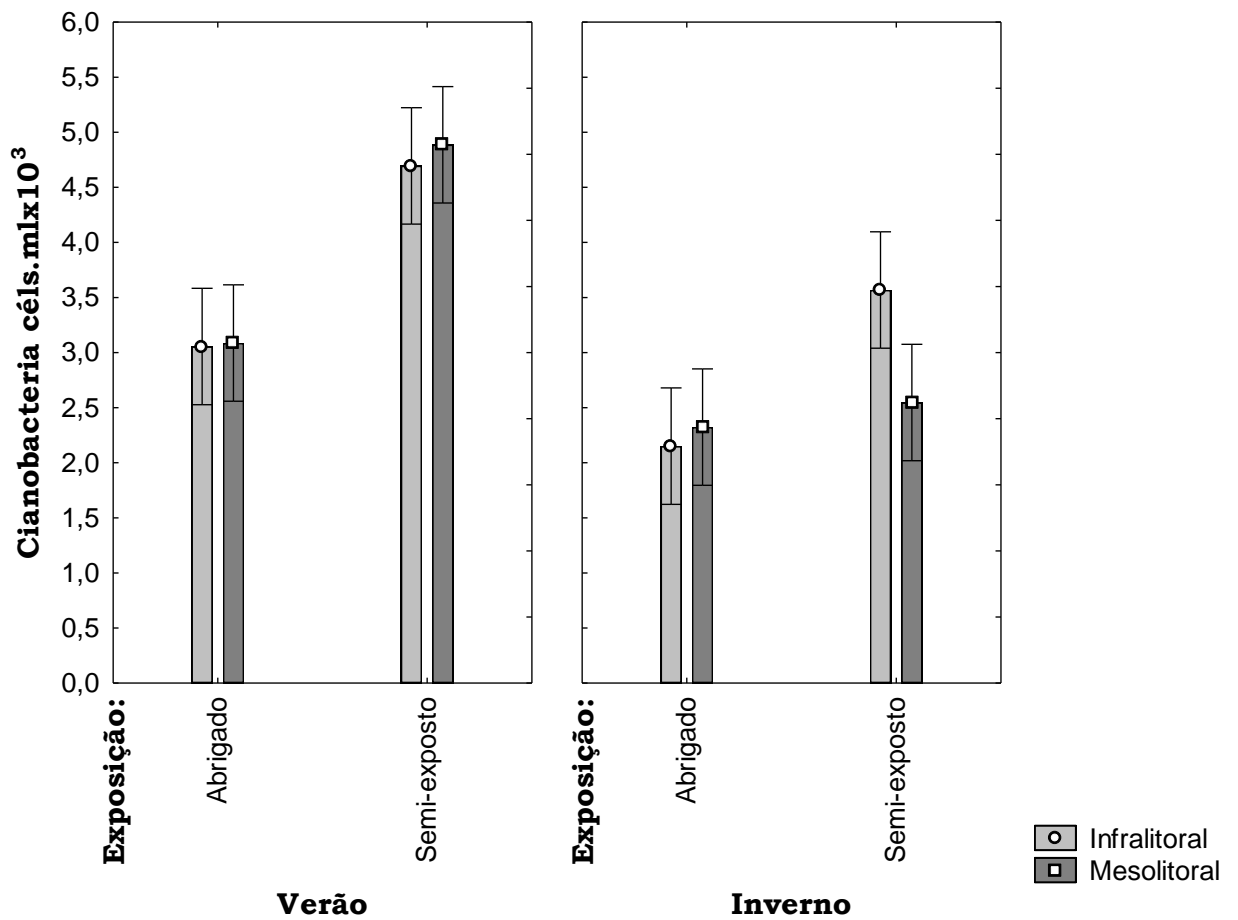


Figura 20-Densidade média de cianobactérias em relação aos fatores exposição, sazonalidade e zonação. (linhas verticais= intervalo de confiança a 95%)

Já para as cianobactérias coloniais, as maiores médias de densidade foram registradas nos costões rochosos das praias Grande e Itaguá ($6,25 \text{ céls.mL}^{-1} \times 10^3$ e $5,65 \text{ céls.mL}^{-1} \times 10^3$, respectivamente) (Fig. 21).

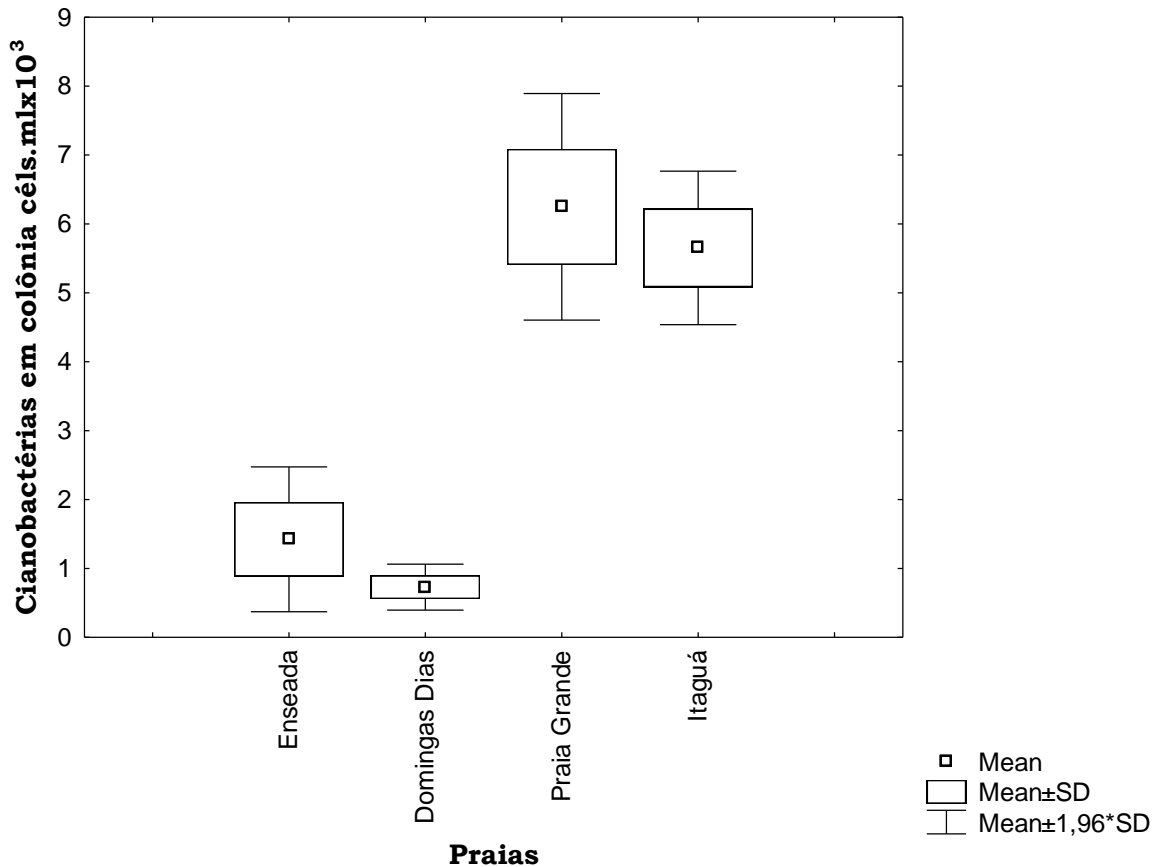


Figura 21-Densidade de cianobactérias coloniais nas amostras de biofilme em relação às praias. Onde: marcador = média; box = média±desvio padrão; linhas limite verticais = média±1,96*desviopadrão.

Diferenças significativas foram observadas para os fatores exposição e sazonalidade (Tab.5), com as maiores densidades registradas nos costões rochosos abrigados, durante o verão (Fig. 22).

Tabela 5-Análise de Variância da densidade de cianobactérias coloniais com a interação dos fatores zonação, exposição e sazonalidade

Fator	DF	MS	F	p
Zonação	1	0,130	0,564	0,454053 ns
Exposição	1	855,660	3722,010	0,000000 ****
Sazonalidade	1	28,090	122,188	0,000000 ****
Zonação*Exposição	1	0,207	0,901	0,344322 ns
Zonação*Sazonalidade	1	0,006	0,028	0,867735 ns
Exposição*Sazonalidade	1	2,397	10,428	0,001556 ***
Zonação*Exposição*Sazonalidade	1	0,021	0,091	0,762796 ns
Total	143			

****, p<0.001; ***,p<0.005; **,p<0.01; *,p<0.05; n.s, não significativo

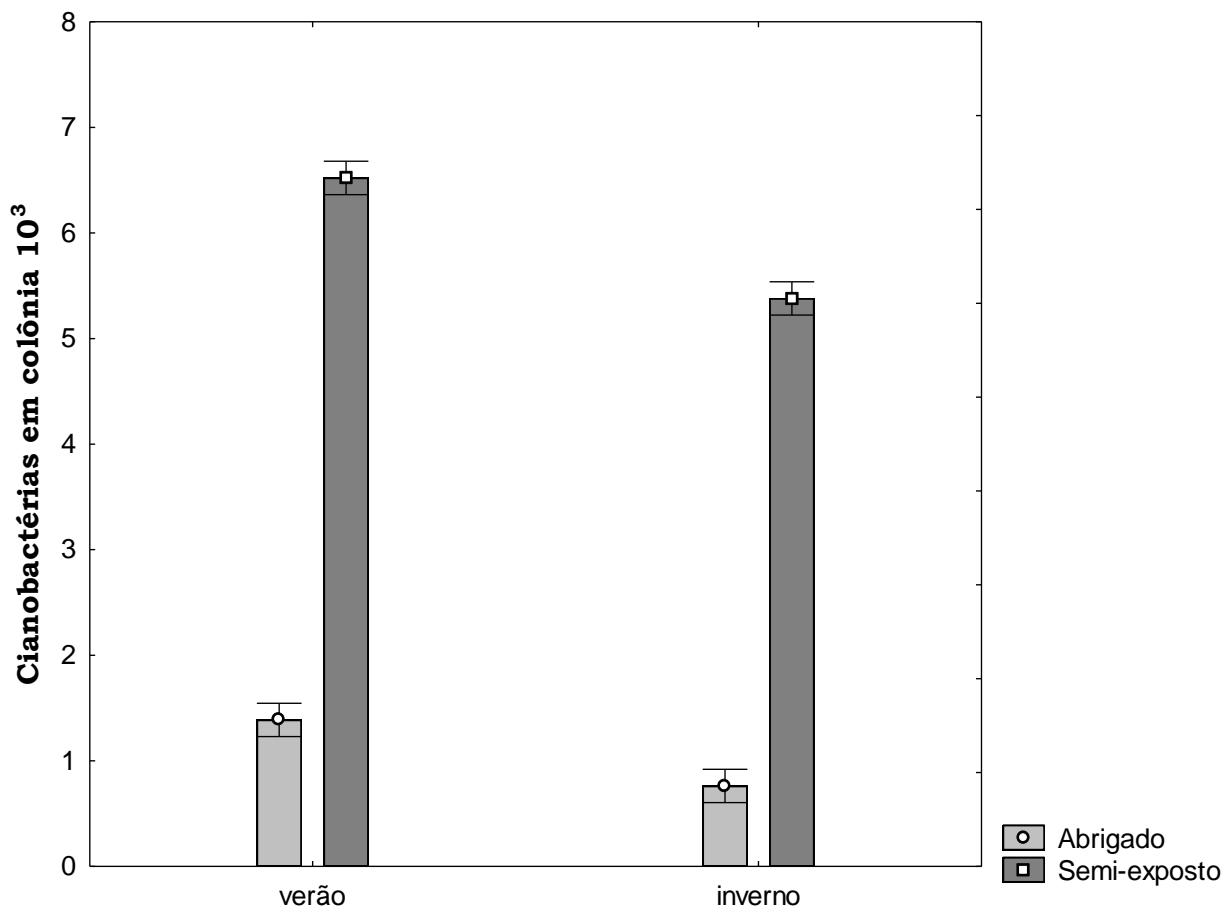


Figura 22-Densidade de cianobactérias coloniais nas amostras de biofilme no verão e inverno em relação à exposição às ondas (linhas verticais== intervalo de confiança a 95%)

Imagens das cianobactérias observadas nas amostras através de microscopia da epifluorescência são apresentadas na figura 23.

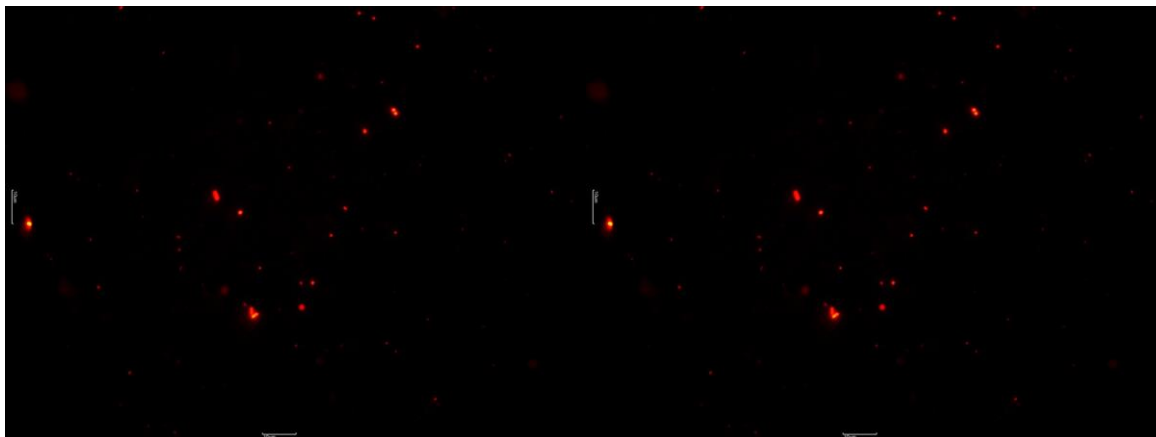


Figura 23- Cianobactérias nas amostras de biofilme. Imagens obtidas por microscopia de epifluorescência.

Não houve diferença significativa em relação ao mesolitoral e o infralitoral nos costões estudados para as cianobactérias coloniais ($F=0,914$, $p=0,762$) (Fig.24).

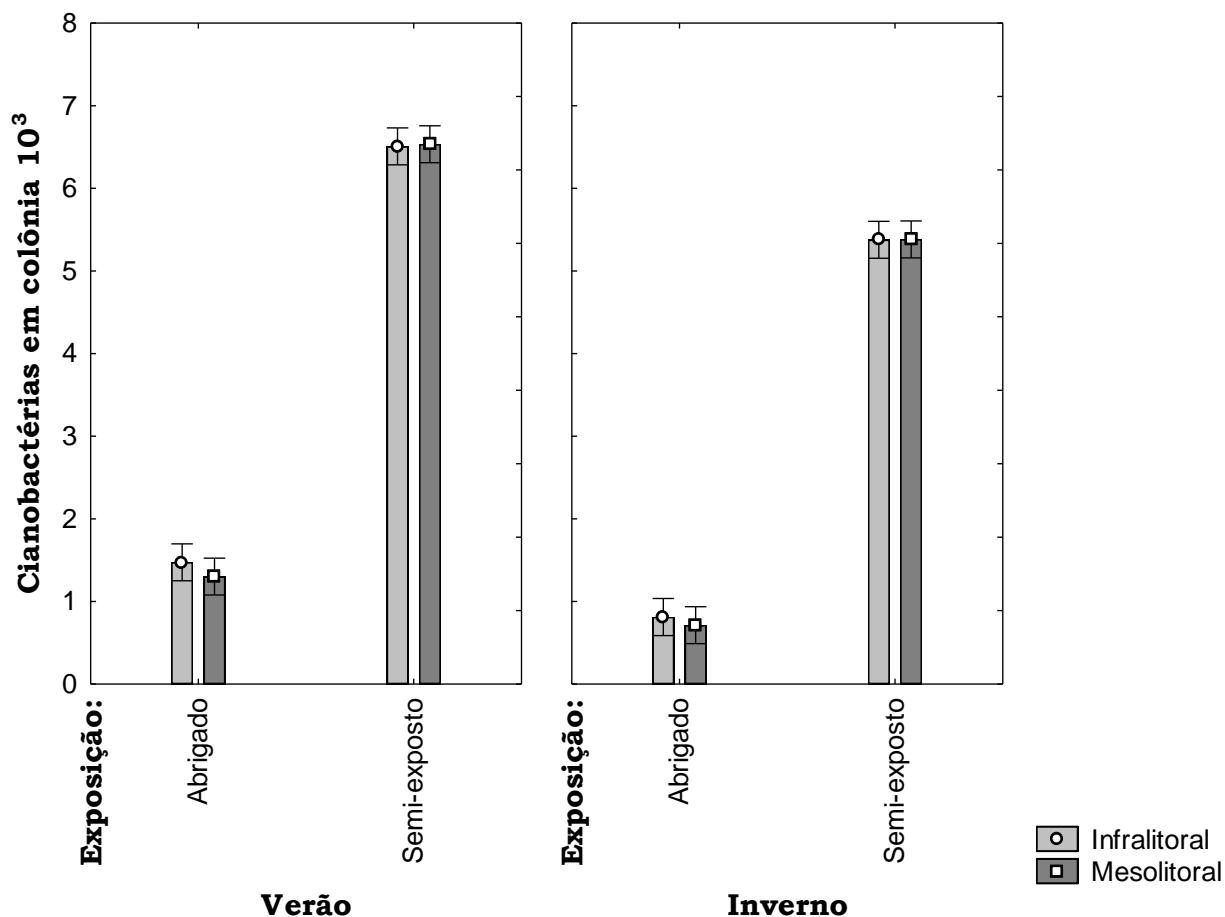


Figura 24-Densidade média de cianobactérias em colônia em relação aos fatores exposição, sazonalidade e zonação. (linhas verticais= intervalo de confiança a 95%).

Durante todo estudo os resultados evidenciam, seja para as bactérias, quanto para as cianobactérias, que a zonação não foi um fator de influência em suas densidades populacionais. Desta forma não existiram diferenças significativas entre o infra e o mesolitoral.

As maiores médias de densidade de diatomáceas foram obtidas nos biofilmes dos costões rochosos das praias da Enseada e Domingas Dias ($6,59 \text{ céls.mL}^{-1} \times 10^4$ e $2,62 \text{ céls.mL}^{-1} \times 10^4$, respectivamente) (Fig. 25).

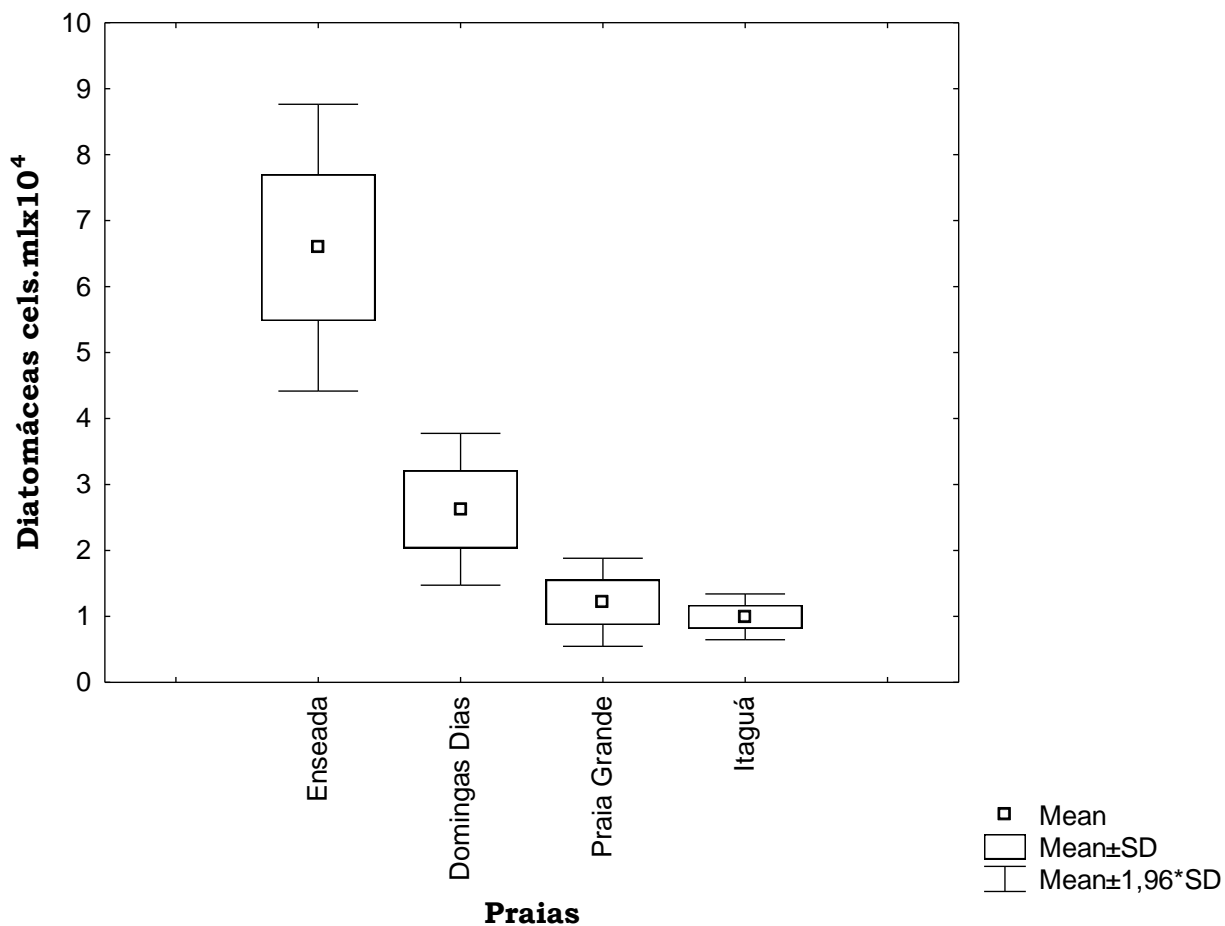


Figura 25-Densidade de diatomáceas nas amostras de biofilme em relação às praias. Onde: marcador = média; box = média±desvio padrão; linhas limite verticais = média±1,96*desviopadrão.

As densidades de diatomáceas foram influenciadas pelos fatores sazonalidade e exposição, não havendo diferenças significativas na interação entre todos os fatores (Tab.6).

Tabela 6- Análise de Variância da densidade de diatomáceas com a interação dos fatores zonação, exposição e sazonalidade

Fator	DF	MS	F	p
Zonação	1	0,004	0,0018	0,966641 ns
Exposição	1	441,665	198,4866	0,000000 ****
Sazonalidade	1	32,462	14,5884	0,000203 ***
Zonação*Exposição	1	0,090	0,0402	0,841347 ns
Zonação*Sazonalidade	1	0,000	0,0002	0,989767 ns
Exposição*Sazonalidade	1	8,985	4,0379	0,046468 *
Zonação*Exposição*Sazonalidade	1	0,020	0,0091	0,924036 ns
Total	143			

****, p<0.001; ***, p<0.005; **, p<0.01; *, p<0.05; n.s, não significativo

As maiores densidades de diatomáceas ocorreram nos ambientes abrigados (F=4,037, p=0,046) durante o verão (F=198,46, p<0,001), a exemplo do que ocorreu com as bactérias e cianobactérias, embora tenha ocorrido um padrão distinto pelos maiores registros, mas em praias menos impactadas e mais abrigadas (Fig. 26), sendo que a zonação não foi um fator determinante para as densidades observadas (Fig. 27).

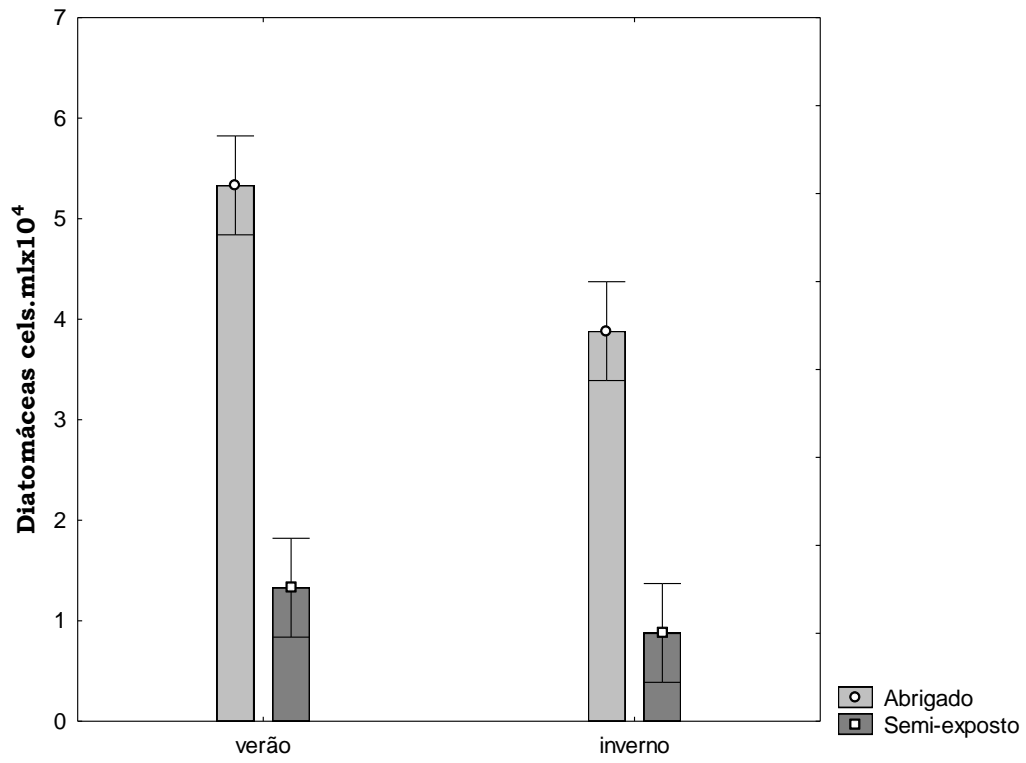


Figura 26- Densidade de diatomáceas nas amostras de biofilme no verão e inverno em relação à exposição às ondas(linhas verticais=- intervalo de confiança a 95%)

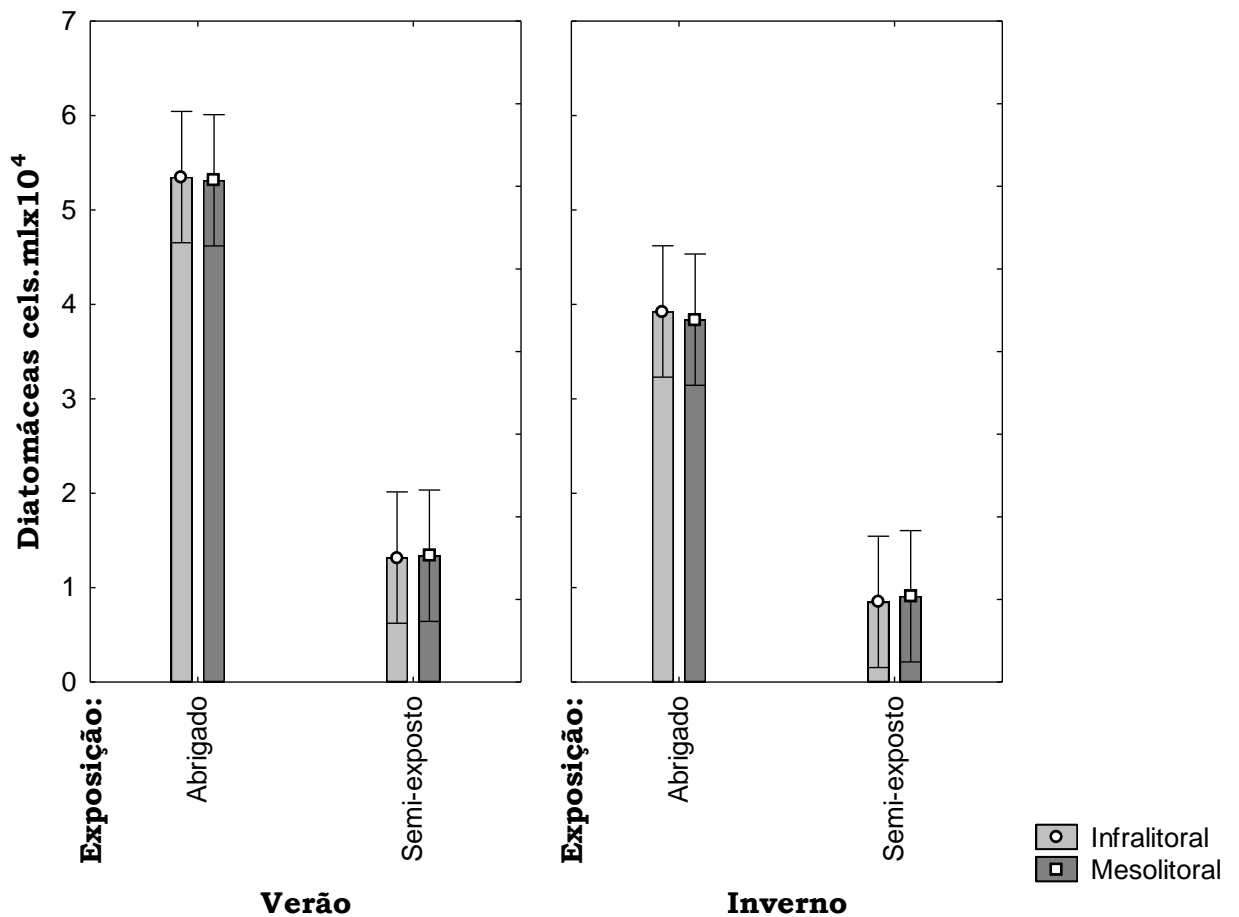


Figura 27- Densidade média de diatomáceas em relação aos fatores exposição, sazonalidade e zonação. (linhas verticais= intervalo de confiança a 95%)

Desta forma é possível inferir que, as diatomáceas conseguem ter maior sobrevivência em ambientes menos expostos ao embate das ondas e menos impactados por efluentes domésticos, por isto mesmo servindo como indicadores da saúde do ambiente em muitos estudos.

Os nanoflagelados autótrofos apresentaram maiores densidades médias nos biofilmes dos costões rochosos das praias da Enseada e Grande (1,21 e 4,12 céls.mL⁻¹x10³) (Fig. 28).

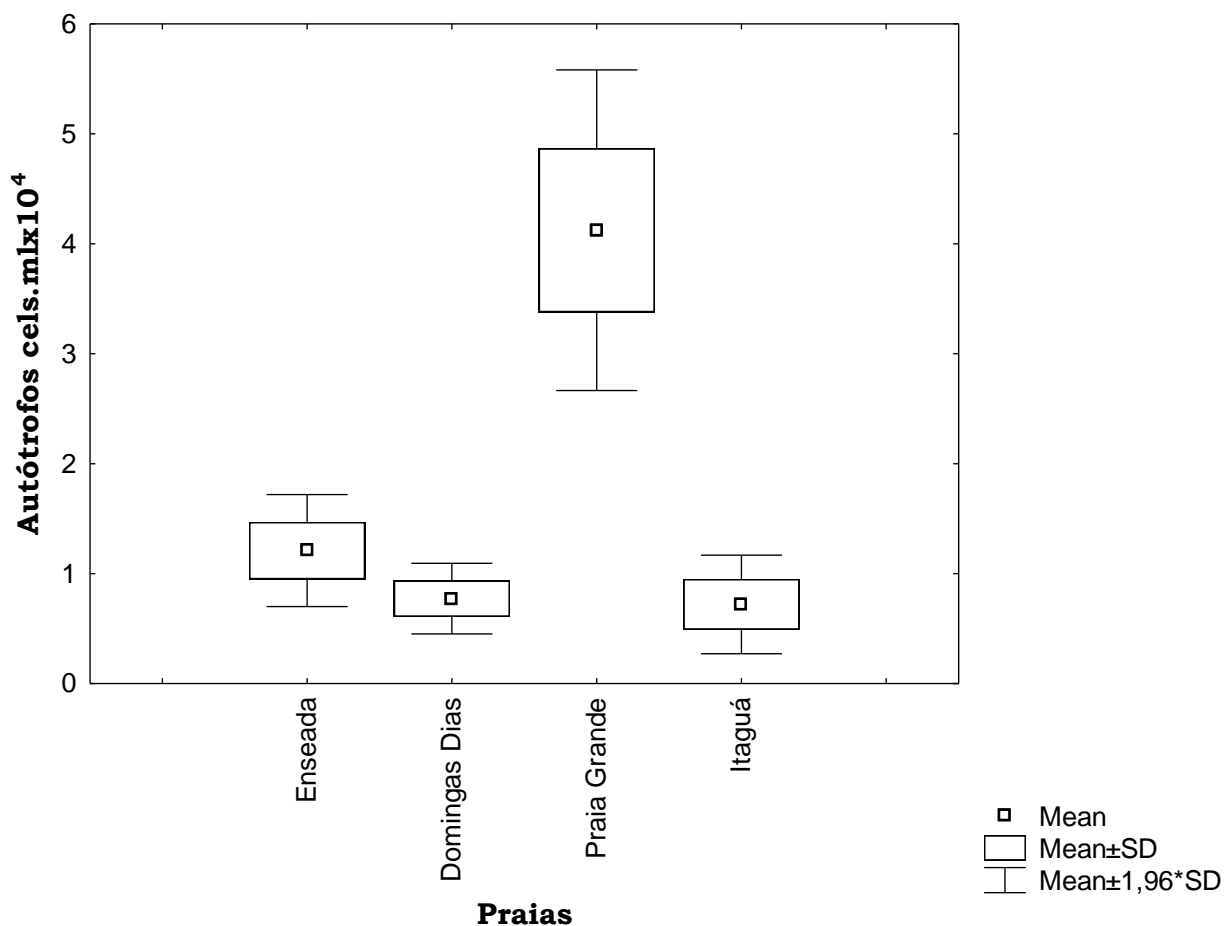


Figura 28-Densidade de nanoflagelados autótrofos nas amostras de biofilme em relação às praias. Onde: marcador = média; box = média±desvio padrão; linhas limite verticais = média±1,96*desviopadrão;

Para os autótrofos, os fatores sazonalidade e exposição tiveram influência sobre as médias ($F=9,351$, $p=0,002$; $F=45,89$, $p<0,001$, respectivamente) (Fig. 29), não havendo diferença significativa na interação de todos os fatores (Tab. 7).

Tabela 7-Análise de Variância da densidade de nanoflagelados autótrofos com a interação dos fatores zonação, exposição e sazonalidade

Fator	DF	MS	F	p
Zonação	1	0,0808	0,0503	0,822930 ns
Exposição	1	73,7165	45,8912	0,000000 ****
Sazonalidade	1	15,0221	9,3518	0,002683 **
Zonação*Exposição	1	0,0339	0,0211	0,884682 ns
Zonação*Sazonalidade	1	0,1785	0,1111	0,739379 ns
Exposição*Sazonalidade	1	2,5467	1,5854	0,210141 ns
Zonação*Exposição*Sazonalidade	1	0,0817	0,0509	0,821909 ns
Total	143			

****, p<0.001; ***,p<0.005; **,p<0.01; *,p<0.05; n.s, não significativo

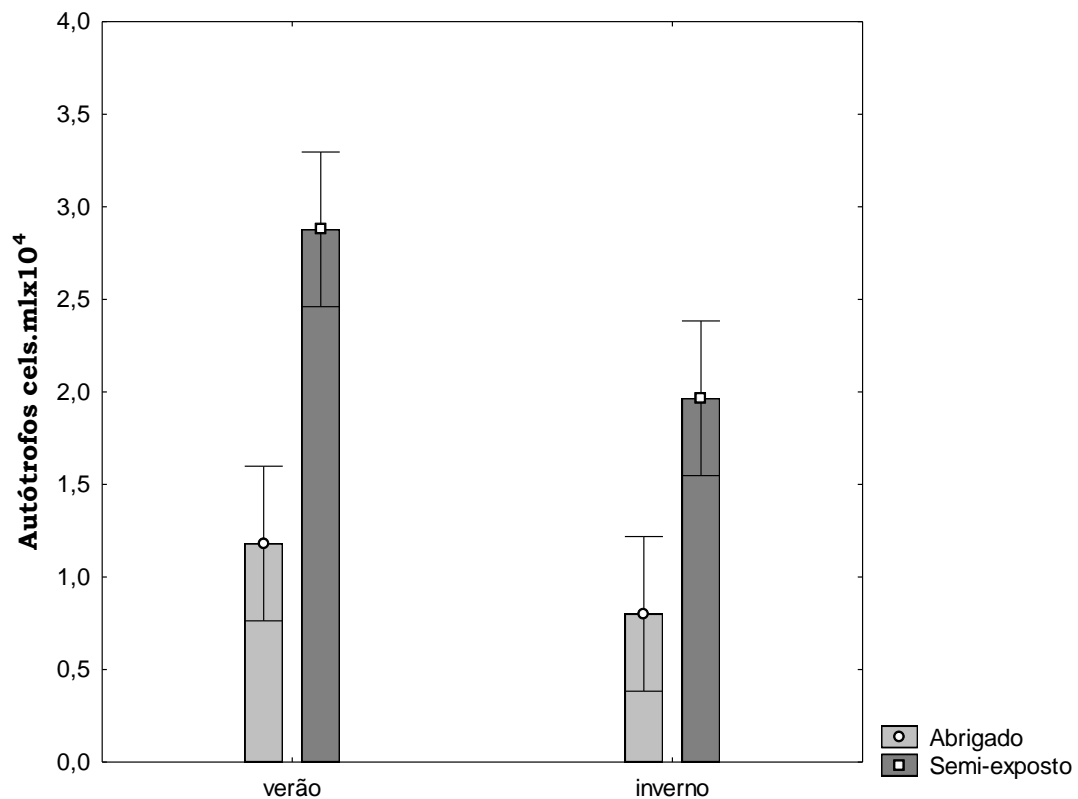


Figura 29- Densidade de nanoflagelados autótrofos nas amostras de biofilme no verão e inverno em relação à exposição às ondas (linhas verticais=- intervalo de confiança a 95%)

A zonação não foi um fator que influenciou a densidade de nanoflagelados nas praias estudadas (Fig. 30).

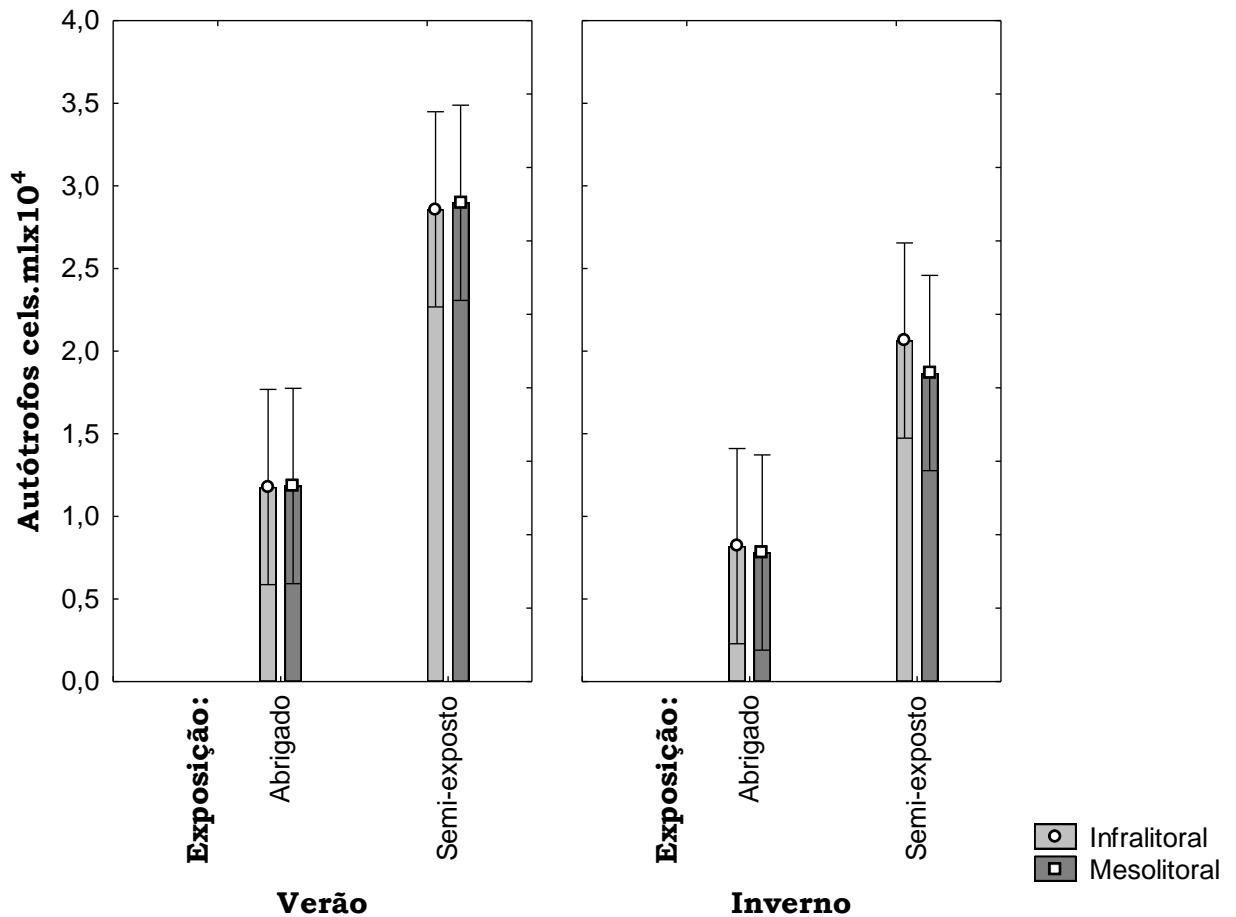


Figura 30-Densidade média de nanoflagelados autótrofos em relação aos fatores exposição, sazonalidade e zonação. (linhas verticais=- intervalo de confiança a 95%)

Por fim, para os nanoflagelados heterótrofos, as maiores densidades foram observadas nas praias Enseada e Grande (2,16 e 2,63 células.mL⁻¹x10³) (Figura 31). Os fatores que mais influenciaram as médias dos heterótrofos foram a sazonalidade e a exposição (Tab.8).

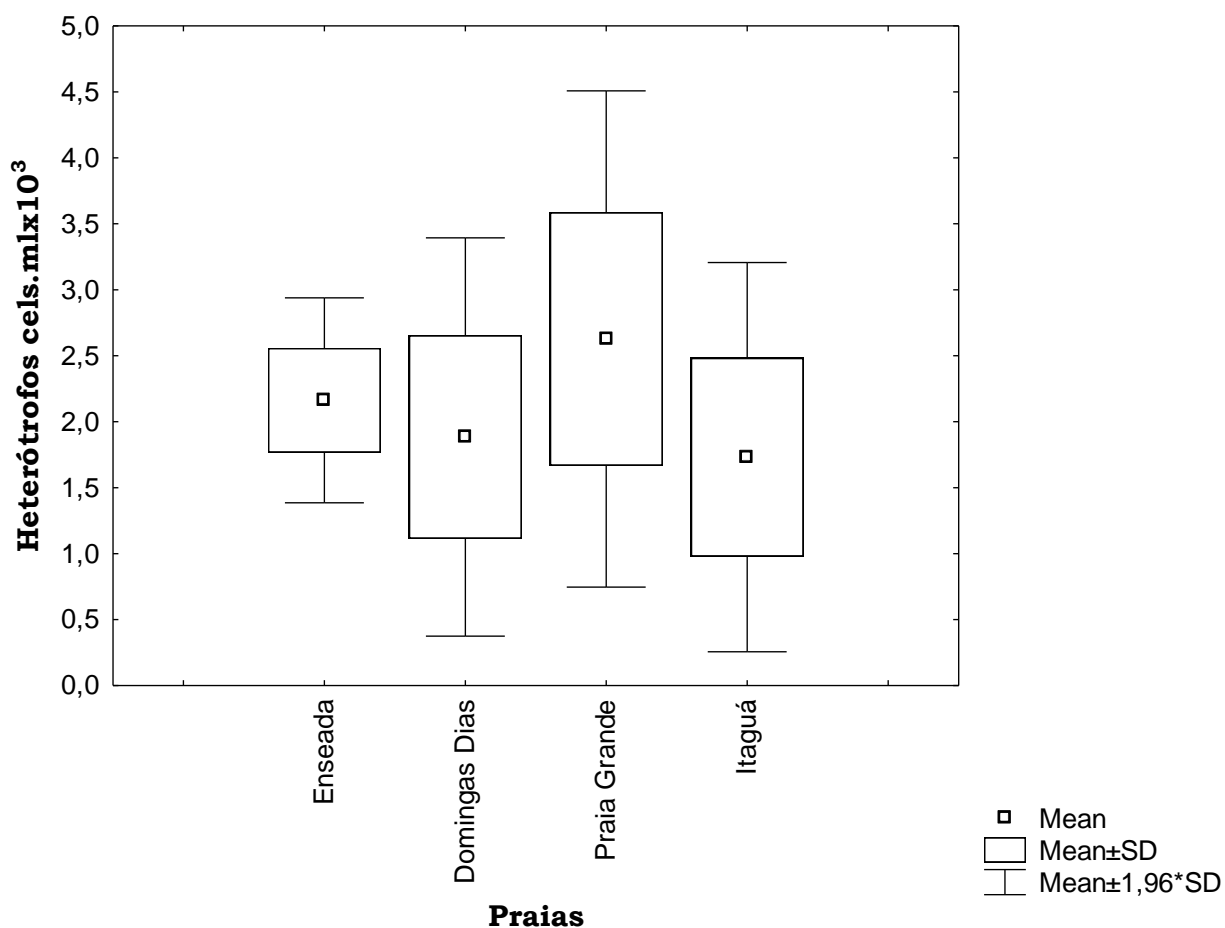


Figura 31-Densidade de nanoflagelados heterótrofos nas amostras de biofilme em relação às praias. Onde: marcador = média; box = média±desvio padrão; linhas limite verticais = média±1,96*desviopadrão;

Tabela 8-Análise de Variância da densidade de nanoflagelados heterótrofos com a interação dos fatores zonação, exposição e sazonalidade

Fator	DF	MS	F	p
Zonação	1	0,0012	0,006	0,938338 ns
Exposição	1	0,8758	4,506	0,035581 *
Sazonalidade	1	63,6671	327,600	0,000000 ****
Zonação*Exposição	1	0,2296	1,181	0,278991 ns
Zonação*Sazonalidade	1	0,0021	0,011	0,917349 ns
Exposição*Sazonalidade	1	3,7153	19,117	0,000024 ****
Zonação*Exposição*Sazonalidade	1	0,1173	0,604	0,438557 ns
Total	143			

Diferenças significativas foram observadas em relação aos ambientes semi-expostos e abrigados ($F=4,506$, $p=0,035$) e em relação ao inverno e verão ($F=327,6$, $p<0,001$) (Fig. 32).

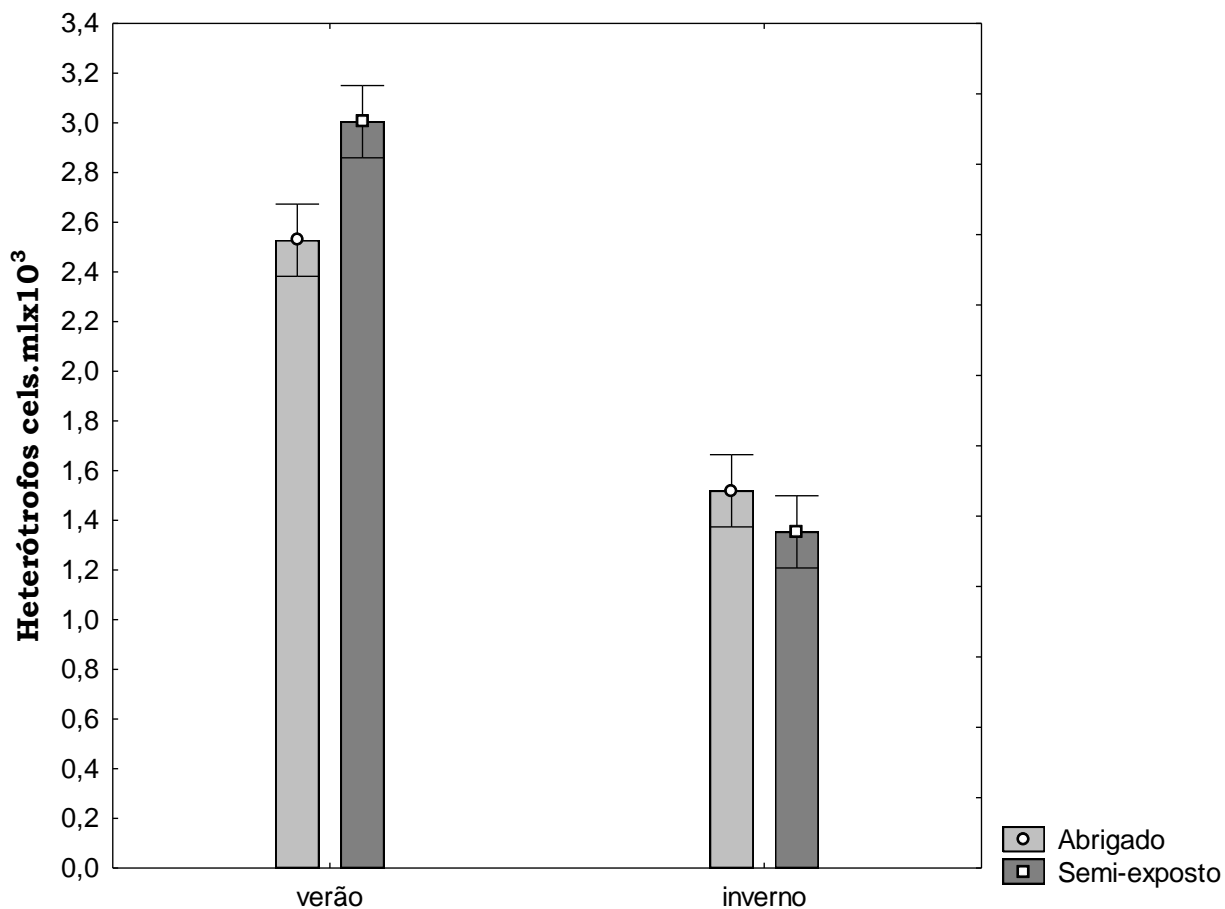


Figura 32-Densidade de nanoflagelados autótrofos nas amostras de biofilme no verão e inverno em relação à exposição às ondas(linhas verticais=- intervalo de confiança a 95%)

Não houve diferenças significativas na interação de todos os fatores bem como na zonação (Fig.33)

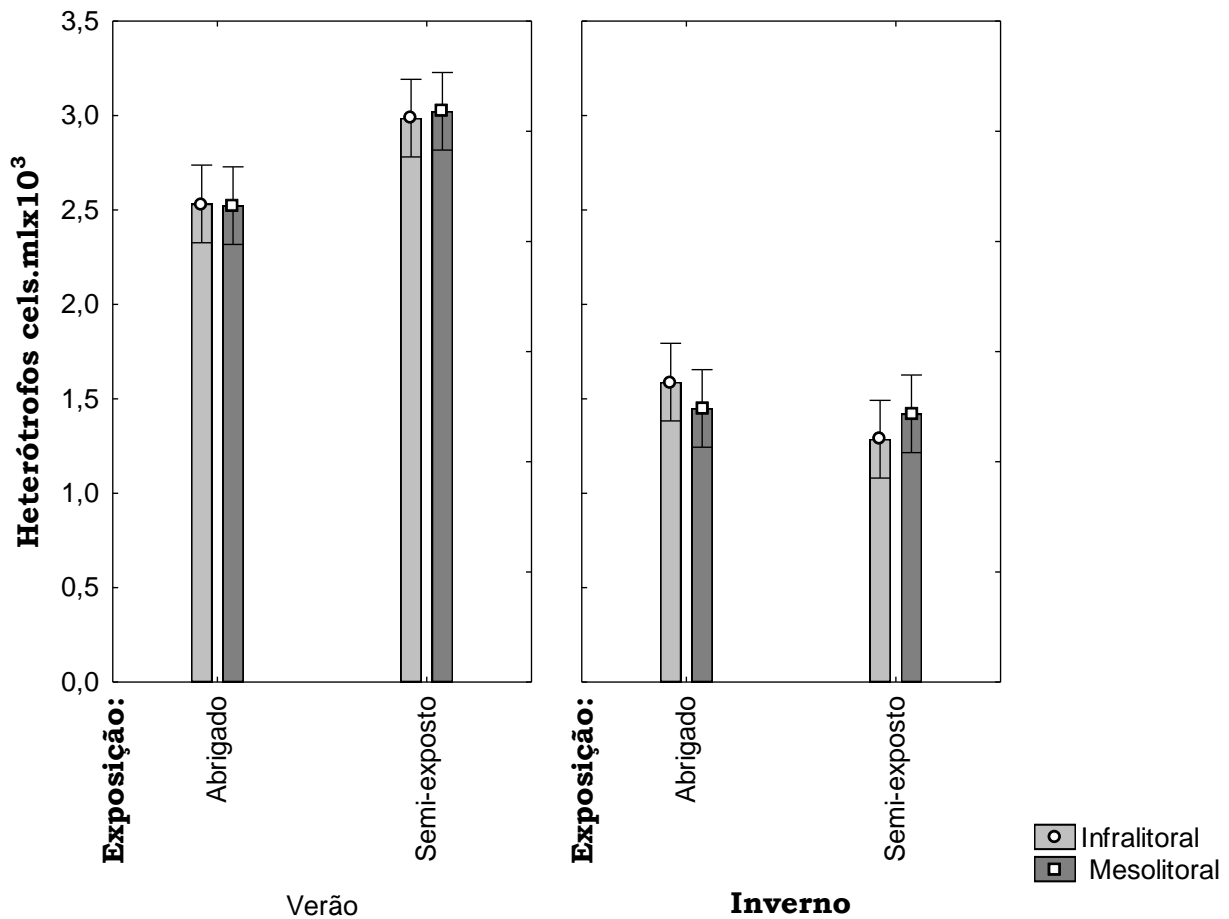


Figura 33-Densidade média de nanoflagelados heterótrofos em relação aos fatores exposição, sazonalidade e zonação. (linhas verticais= intervalo de confiança a 95%)

De maneira geral, podemos observar uma diferença entre o inverno e o verão para todos os micro-organismos estudados. Diferenças significativas foram observadas ($F=295,77$, $p<0,001$) sendo as maiores densidades observadas sempre no verão (Fig.34)

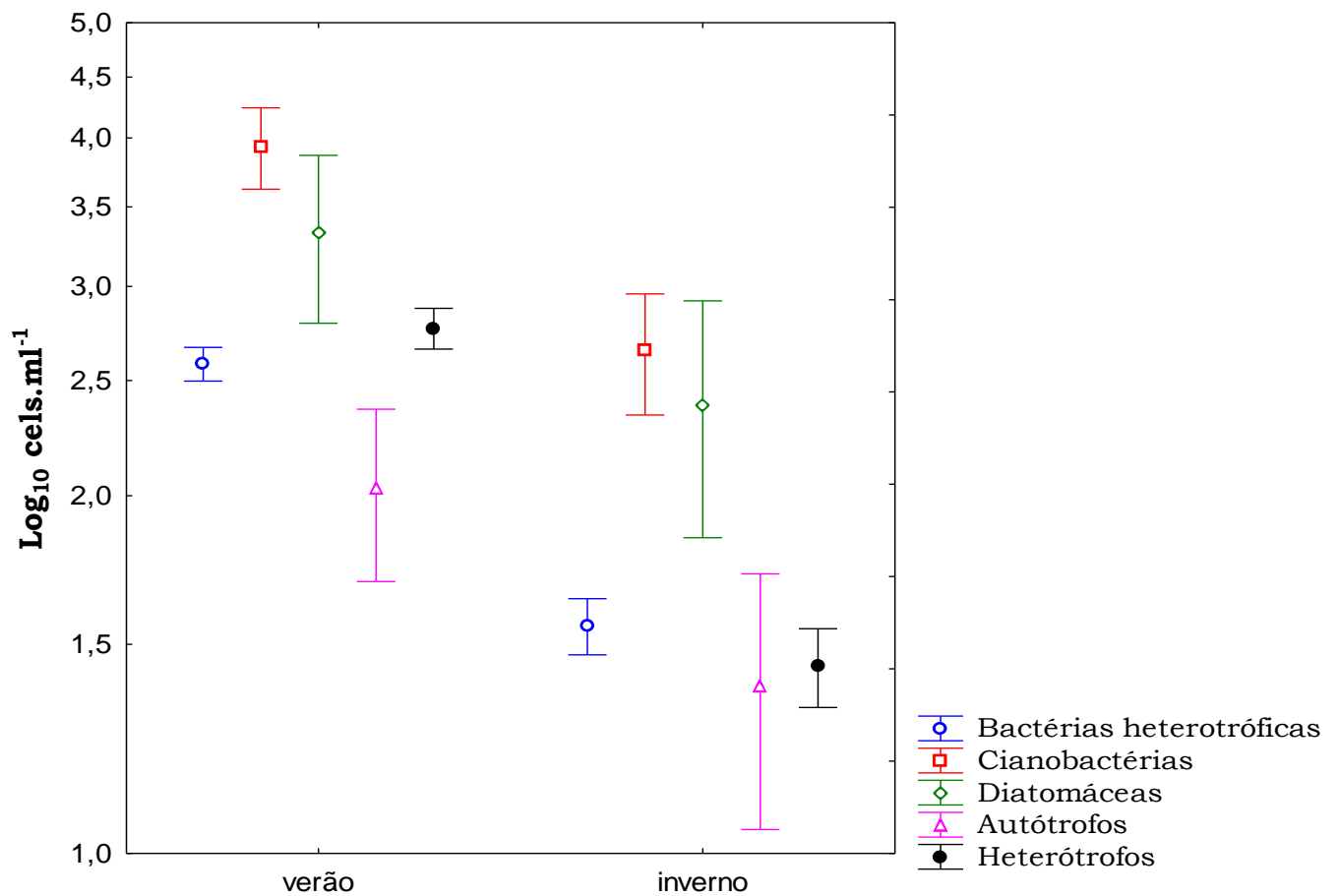


Figura 34- Comparação entre o verão e o inverno de todos os micro-organismos estudados. (linhas verticais== intervalo de confiança a 95%)

Para confirmar qual fator possuiu mais peso na explicação dos dados obtidos foi realizada uma análise de componentes principais (ACP) a qual corroborou os resultados obtidos através da análise multivariada onde, os fatores de maior peso foram a sazonalidade e a exposição.

Através da ACP nota-se que, mais especificamente, o verão e o semi-exposto foram os fatores mais determinantes para as diferenças encontradas entre os pontos

amostrados. As componentes 1 e 2 demonstraram maior força explicando, juntas, 99% da variância (sendo a componente 1, 74% e a componente 2, 22%)

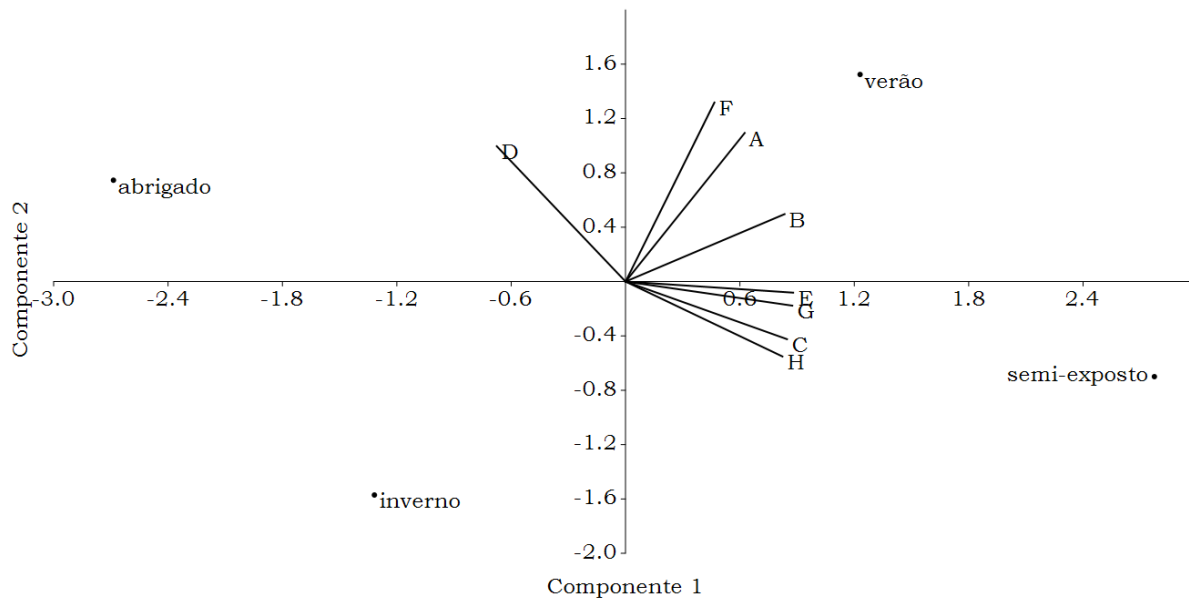


Figura 35- Biplot da análise de componentes principais onde (A)- bactérias, (B)- cianobactérias, (C)- cianobactérias em colônia, (D)- diatomáceas, (E)- autótrofos, (F)- heterótrofos, (G)- *E.coli* no biofilme, (H)- *Enterococcus* no biofilme

5.5 Identificação de Diatomáceas

De maneira geral, houve pouca variação nas amostras em relação à classificação das diatomáceas em penadas e cêntricas. No verão houve uma ligeira predominância de diatomáceas cêntricas nas praias abrigadas e daquelas penadas nas praias expostas enquanto que, no inverno, ocorreu uma ligeira predominância de diatomáceas penadas em todas as praias (Fig. 36). Essa pequena variação pode ter ocorrido por

conta da limitação do método ou pelo fato de ter sido necessário um tratamento mais vigoroso para eliminação da matéria orgânica presente no biofilme.

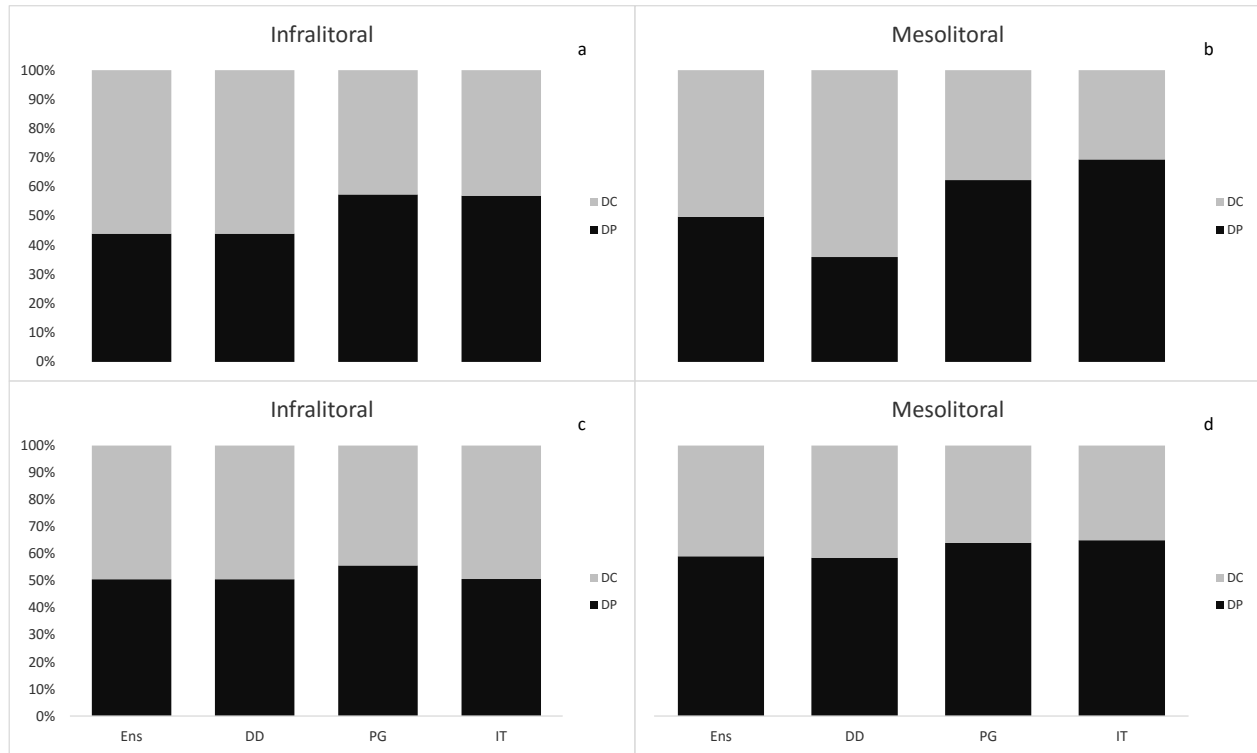


Figura 36 -Porcentagens de diatomáceas penadas e cêntricas (DP e DC) nas praias amostradas onde (a) e (b) são dados amostrados no verão e (c) e (d) dados do inverno. (DD-Domingas Dias, ENS-Enseada, IT-Itaguá e PG-Praia Grande)

Na figura 37 encontram-se algumas espécies encontradas nas amostras analisadas e visualizadas por microscópio invertido.

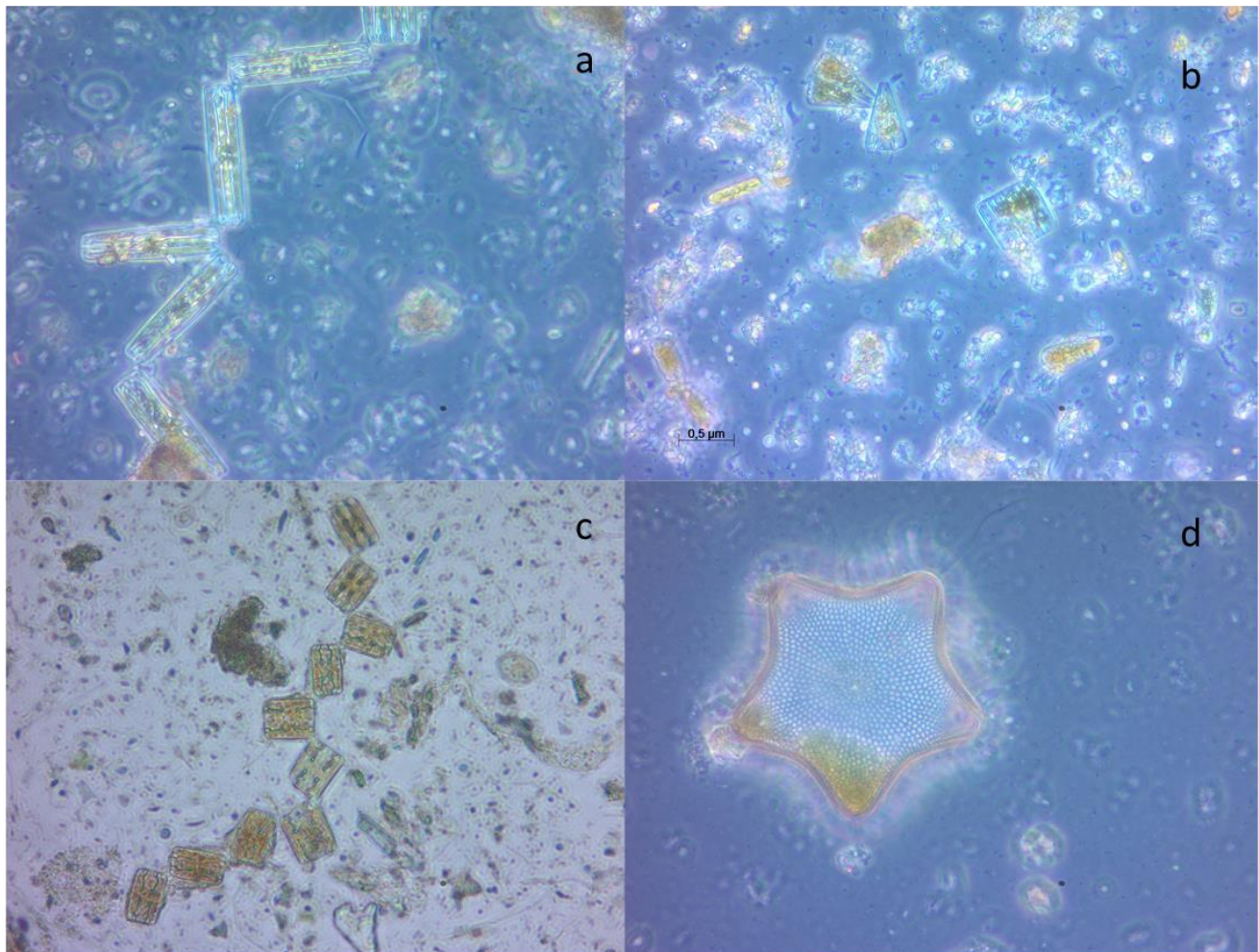


Figura 37-Diatomáceas visualizadas em microscópio invertido(400x) – (a)- *Fragillaria* sp (b)- *Meridon* sp. (c)- *Tabellaria* sp.(d)- *Triceratium* sp. a, b e c são diatomáceas penadas e d cêntrica.

5.6 Parâmetros físico-químicos

Não houve normalidade dos dados de temperatura e oxigênio dissolvido, sendo, desta forma, utilizado um teste não paramétrico para análise (Kruskal-Wallis –KW).

A tabela 9 mostra a temperatura média e a porcentagem de oxigênio dissolvido (OD), nos costões rochosos de cada praia e nas estações do ano. Nota-se que não houve grande variação de temperatura, nem do percentual de oxigênio dissolvido, com

ausência de diferenças significativas, exceto para a temperatura em relação ao inverno verão ($KW=7,70$, $p=0,0055$), sendo a temperatura no verão ligeiramente mais alta do que a de inverno.

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.

Exposição	Praia	Estação	T°C Médias ± desvpad	OD Médias± desvpad
Abrigado	Enseada	verão	27,9±0,70	54,8±6,65
	Enseada	inverno	24,3±1,02	52,6±0,3
	Domingas Dias	verão	26,1±1,88	53,1±5,13
	Domingas Dias	inverno	25,5±1,94	51,6±0,62
Exposto	Praia grande	verão	28,6±1,82	57,5±9,12
	Praia grande	inverno	24,4±0,76	54,1±0,49
	Itaguá	verão	27±1,80	52,9±6,29
	Itaguá	inverno	25,8±0,59	54±1,30

Para analisar a interação dos fatores temperatura e oxigênio dissolvido com as densidades dos micro-organismos estudados, foi realizado um teste de correlação de Spearman a um nível de 95% de significância. A variação da temperatura demonstrou uma correlação significativa com as densidades de bactérias, cianobactérias e nanoflagelados heterótrofos, enquanto que, a variação do oxigênio dissolvido não apresentou correlação significativa (Tab. 10).

Tabela 10- Correlação de Spearman para T°C e OD. Valores em destaque apresentaram correlação significativa a $p < 0,05$

Micro-organismo	T°C	OD
Bactérias	0,533 *	0,321
Cianobactérias	0,435 *	0,288
Cianobactérias em colônia	0,393	0,355
Diatomáceas	0,105	-0,059
Autótrofos	0,226	0,190
Heterótrofos	0,453 *	0,172
<i>E.coli</i> biofilme	0,01	0,231
<i>Enterococcus</i> biofilme	0,094	0,175
<i>E.coli</i> água	0,229	0,233
<i>Enterococcus</i> água	0,097	0,079

5.6 Identificação de bactérias cultiváveis

No presente estudo foram recuperados 371 isolados, embora somente 40,2% (149 cepas) puderam ser identificadas pela ferramenta Blastn. Aquelas não identificadas apresentaram algumas dificuldades na amplificação do DNA ou não obtiveram sequências compatíveis nos bancos de dados disponíveis, possivelmente se tratando de espécies ainda não descritas.

Na figura 38 têm-se um exemplo de imagem obtida como resultado da corrida de eletroforese depois de algumas extrações de DNA genômico, enquanto a figura 39 mostra o resultado da corrida de eletroforese depois da amplificação de DNA. A figura 40 mostra a imagem da saída do programa BioEdit, para a edição das sequências que foram, posteriormente, comparadas com a base de dados do *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*).

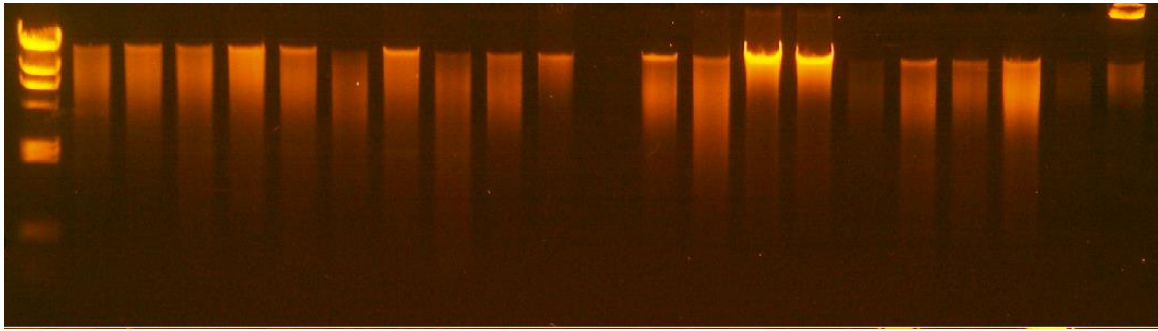


Figura 38-Exemplo de resultado da corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA genômico extraído das cepas isoladas (Crédito: Bruna Del Busso Zampieri).

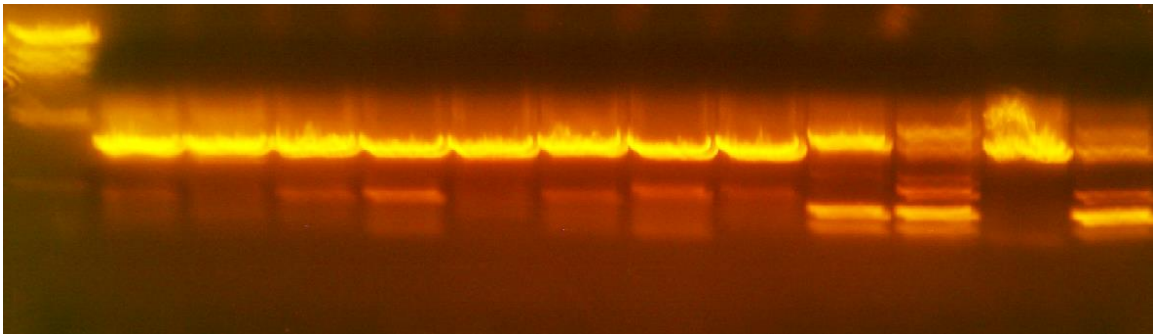
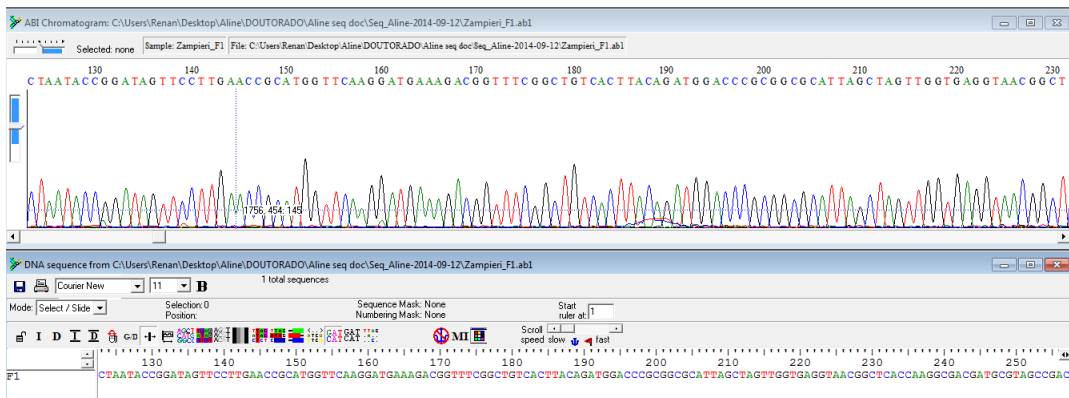


Figura 39-Exemplo de resultado da corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8%, depois da reação de polimerização em cadeia (PCR), do DNA genômico extraído das cepas isoladas (Crédito: Bruna Del Busso Zampieri).



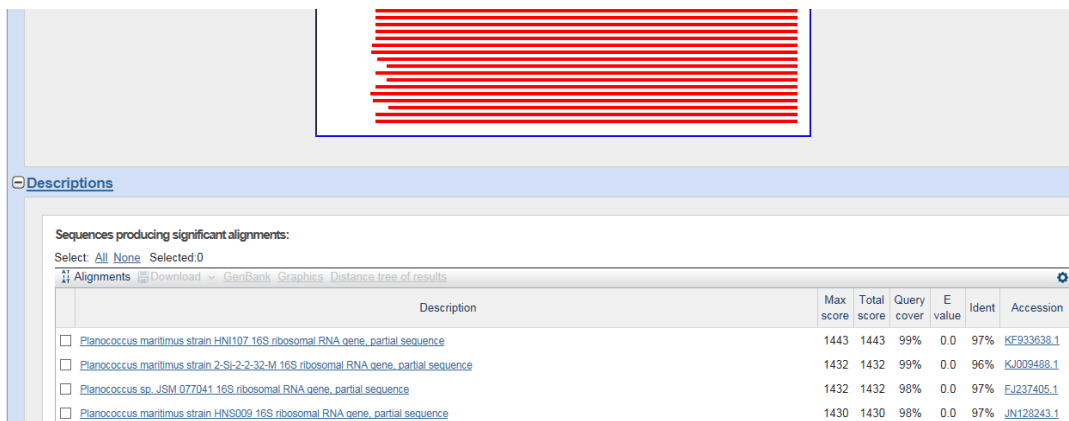


Figura 40 -Exemplo de saída do programa BioEdit e da base de dados do NCBI através da ferramenta Blastn

Foram identificadas 11 espécies sendo que, destas, 5 estavam presentes na região do infralitoral e 9 na região do mesolitoral. A praia com a maior quantidade de espécies foi a praia de Itaguá (Tab.11) enquanto que a praia de Domingas Dias apresentou a menor quantidade.

Tabela 11- Espécies identificadas de acordo com a zonação em cada praia. (N=149)

	Enseada	Domingas Dias	Praia Grande	Itaguá
Infralitoral	<i>Bacillus megaterium</i> (65) <i>Bacillus safensis</i> (1)	<i>Planococcus maritimus</i> (1)	<i>Bacillus subtilis</i> (5)	<i>Bacillus sp</i> (4)
Mesolitoral	<i>Bacillus flexus</i> (4) <i>Bacillus pumilus</i> (5)	<i>Bacillus horikoshii</i> (1)	<i>Bacillus pumilus</i> (1) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (16)	<i>Vibrio cholerae</i> (32) <i>Planococcus maritimus</i> (6) <i>Staphylococcus pasteurii</i> (1) <i>Bacillus safensis</i> (7)

Os resultados obtidos mostraram uma predominância do gênero *Bacillus* (62,42%) dentre os isolados recuperadas, tendo como espécie mais abundante *Bacillus megaterium* (43,6%). Outras seis espécies identificadas dentro do gênero *Bacillus* foram: *B. subtilis*, *B. flexus*, *B. pumilus*, *B. horikoshii* e *B. safensis*. O segundo gênero com maior predominância foi *Staphylococcus* (11,4%), com duas espécies: *S. pasteurii*

e *S. epidermidis* (Fig. 41). Outras espécies encontradas foram *Planococcus maritimus* e *Vibrio cholerae*.

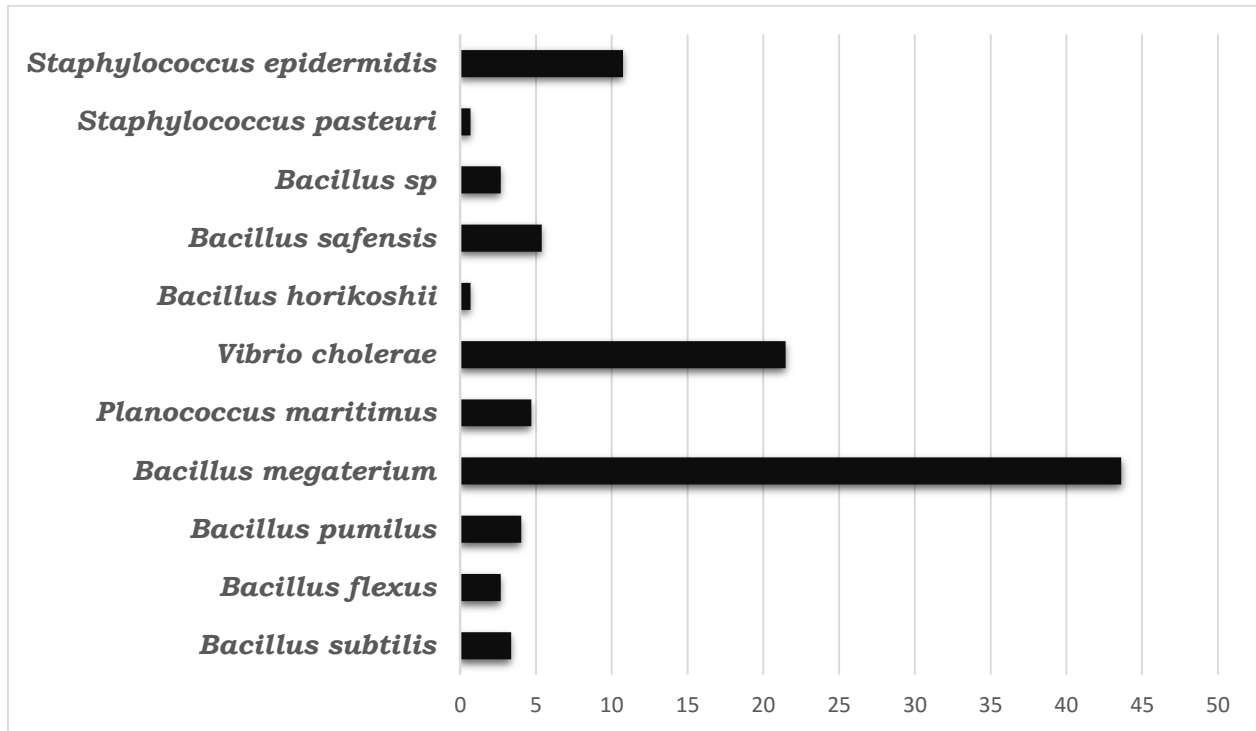


Figura 41- Porcentagens das espécies de bactérias isoladas e identificadas das praias amostradas

Para acessar a diversidade de bactérias cultiváveis foi utilizada a abundância relativa de cada espécie entre os isolados que puderam ser identificados. A diversidade foi calculada através do índice de Simpson com a seguinte fórmula:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \cdot \ln p_i$$

Onde:

S= número de espécies

π_i = abundância relativa (n_i/N)

n_i = número de indivíduos em cada espécie e N = total de indivíduos

Os ambientes semi-expostos ($H=1,22$) apresentaram maior diversidade em relação aos abrigados ($H=0,71$) e o mesolitoral ($H=1,14$) em relação ao infralitoral ($H=0,64$) (Tab.12).

Tabela 12- Índice de diversidade em relação à exposição e zonação

	$\pi_i \ln \pi_i$ abrigado	$\pi_i \ln \pi_i$ semi-exposto	$\pi_i \ln \pi_i$ infralitoral	$\pi_i \ln \pi_i$ mesolitoral
	-0,36188817	0	-0,36188817	0
	-0,033583532	-0,143666128	-0,033583532	-0,143666128
	-0,097118173	-0,097118173	0	-0,097118173
	-0,113909678	-0,033583532	0	-0,129349806
	-0,033583532	-0,129349806	-0,033583532	-0,129349806
	-0,033583532	0	0	-0,033583532
	-0,033583532	-0,113909678	-0,113909678	0
	0	-0,239608868	0	-0,239608868
	0	-0,097118173	-0,097118173	0
	0	-0,033583532	0	-0,033583532
	0	-0,330353912	0	-0,330353912
H	0,71	1,22	0,64	1,14

6. DISCUSSÃO

Fatores abióticos como temperatura e oxigênio dissolvido na água, proteção contra radiação, entre outros, possuem comprovado efeito sobre a sobrevivência de micro-organismos patogênicos no ambiente costeiro (BRUNKE & FISCHER, 1999; DAVIES-COLLEY et al., 1999; DAVIES & BAVOR, 2000). Entretanto, em relação ao microambiente dos biofilmes, o presente trabalho mostrou que todos os costões rochosos das praias estudadas apresentaram homogeneidade quanto a estes parâmetros físico-químicos. Ainda assim, a temperatura apresentou correlação significativa com a densidade de micro-organismos. Neste sentido, o presente estudo não corrobora os dados de Jackson et al. (2013), onde a temperatura não evidenciou efeito significativo sobre a condição do biofilme de costões rochosos. Entretanto, os estudos nesta área são ainda incipientes, requerendo maior número de ainda informações sobre este assunto, especialmente em micro-habitats (DOBRETSOV, 2010; JACKSON et al., 2013), como é o caso dos biofilmes.

As amostras de biofilme apresentaram maior concentração de clorofila-a nos costões rochosos de praias abrigadas, o que é antagônico ao esperado, pois deveria ocorrer uma maior concentração de clorofila-a em ambientes expostos quando comparado aos ambientes abrigados (MACLULICH, 1987; THOMPSON et al., 2005; KIM, 2011). Entretanto, Kim et al. (2014) não encontraram diferenças significativas entre na concentração de clorofila a no biofilme de costões semi-expostos e abrigados, indicando a existência de efeitos interativos e de maior complexidade para explicar este fato com maior confiabilidade.

A média de densidade de bactérias heterotróficas foi maior nas praias Grande e Itaguá. Esse resultado pode ser devido ao fato de que, as praias mais expostas foram justamente as praias que apresentaram maior densidade de indicadores de contaminação fecal, sugerindo uma maior influência de efluentes domésticos. Entretanto, como são as bactérias que produzem o biofilme, bem como por constituírem o primeiro estágio de sucessão, seria esperado que ocorressem em maior densidade do que os outros micro-organismos ali presentes. Convém ressaltar, também, que a alteração antrópica do ambiente pode acarretar em alteração da função do biofilme, passando de um sistema agregador de bactérias autóctones (que favorecem a produtividade) para outro que concentra bactérias fecais e outros micro-organismos presentes nos esgotos domésticos, inclusive os patogênicos, oferecendo riscos à saúde ambiental e pública.

No presente estudo foi possível observar que, de maneira geral, os micro-organismos estudados apresentaram maiores densidades médias nas praias semi-expostas durante o verão, à exceção das cianobactérias em colônia. Thompson et al. (2005), demonstraram o mesmo padrão em praias expostas, porém com maior biomassa registrada no inverno e não no verão. Não se sabe, ao certo, quais os motivos que causam esse padrão, uma vez que é inverso para as macroalgas, onde a abundância diminui em consequência do aumento do estresse físico por maior embate de ondas e maior intensidade de herbivoria por moluscos (SOUTHWARD, 1964; HAWKINS & HARTNOLL, 1983).

O aumento do fluxo de água por maior ação das ondas pode beneficiar a formação de biofilme (LOCK, 1993), que é um fato demonstrado em estudos com

microbiota marinha, onde esse aumento pode ser benéfico ao seu crescimento (HURD, 2000), explicando a maior densidade dos organismos estudados em praias expostas.

De maneira geral, os fatores de maior influência sobre a composição do biofilme foram o grau de exposição do costão rochoso às ondas, bem como a sazonalidade. Porém, ainda não foi possível estabelecer um padrão que explique a composição do biofilme, haja vista que ele se altera de acordo com condições ambientais, evidenciadas neste trabalho pelas diferentes praias estudadas, tendo sua composição em biomassa variando em ambientes abrigados ou expostos.

Thompson et al. (2005) demonstram uma maior biomassa em ambientes expostos, enquanto Jenkins & Hartnoll (2001) registraram isso em ambientes abrigados. Essas discrepâncias podem ser atribuídas a alguns fatores, como diferentes níveis de exposição às ondas das áreas estudadas e/ou intensidade da herbivoria por moluscos. O efeito da herbivoria por moluscos no crescimento de macroalgas, por exemplo, é reconhecido para praias do Atlântico Norte (SOUTHWARD, 1964; HAWKINS & HARTNOLL, 1983), existindo fortes evidências sobre o controle da biomassa microbiana que exercem em costões rochosos (HILL & HAWKINS, 1991; JENKINS et al., 2001; THOMPSON et al., 2001; THOMPSON et al., 2004). Christofolletti et al. (2011), demonstraram um aumento da pressão por herbivoria, causado por *Ligia exótica*, acarretando em diminuição significativa da biomassa microbiana em biofilmes de costões rochosos em áreas subtropicais.

No presente estudo, de modo geral, foi possível observar um predomínio de diatomáceas no biofilme dos costões rochosos em relação aos demais microorganismos (com exceção das bactérias). Esse resultado difere de outros estudos que

informaram um domínio de cianobactérias em biofilmes de áreas subtropicais, além de manchas esporádicas de bactérias heterotróficas, diatomáceas e estágios juvenis de macroalgas (POTTS, 1980; NAGARKAR & WILLIAMS, 1999). Entretanto, tal resultado se assemelha ao encontrado para áreas temperadas, com o biofilme sendo dominado por cianobactérias ou diatomáceas (MACLULICH, 1987; HILL & HAWKINS, 1991).

Essas discrepâncias podem ser resultantes de processos específicos, como o fluxo de água (SANTOS et al., 1991), rugosidade da superfície do substrato (HARLIN & LINDBERGH, 1977), química da superfície (RAILKIN, 2003) e diferenças de substrato, que podem afetar os estágios de colonização da superfície, levando à uma mudança na estrutura da comunidade microbiana dentro do biofilme.

Embora existam poucos estudos sobre a diversidade microbiana em biofilmes de costões rochosos a partir do cultivo dos micro-organismos, a maioria deles acessando a diversidade através dos perfis genéticos das comunidades (O'Toole et al., 1999; Lyantey et al., 2005; Rochex et al., 2008), os micro-organismos são conhecidamente utilizados em diversos setores econômicos, como na indústria de laticínios, na fabricação de vinagre, na produção do ácido glutâmico e na síntese de antibióticos e vitaminas, entre outros. Além disso, constituem alvo potencial para o isolamento de novos produtos bioquimicamente ativos, com aplicação na biorremediação, biodegradação e desenvolvimento de novos fármacos (SKULBERG, 1995; CHAY et al., 2005). Pelo exposto, tornam-se importantes estudos que recuperem esses micro-organismos do ambiente para seu uso na prospecção de novos produtos.

No presente estudo, houve predominância do gênero *Bacillus*, bem como a presença de espécies do gênero *Staphylococcus* e *Planococcus*. A baixa quantidade de

isolados, bem como a dificuldade em recuperar DNA de qualidade de todos os isolados obtidos, impediu uma maior acessibilidade à diversidade de bactérias cultiváveis isoladas do biofilme dos costões rochosos estudados. Entretanto, é interessante ressaltar a presença de *Vibrio cholerae* nas amostras de biofilme, que em associação a outros indicadores de contaminação fecal, indicam sua grande relevância como reservatório para espécies patogênicas.

De fato, Shikuma & Hadfield (2010) em estudo desenvolvido na baía de Pearl Harbour (EUA), encontraram esse mesmo patógeno em alta abundância nas amostras de biofilme, evidenciando ser fonte de disseminação de organismos potencialmente patogênicos para a coluna d'água adjacente.

Em relação às densidades de bactérias indicadoras de contaminação fecal utilizadas neste estudo. para avaliar o grau de contaminação das praias estudadas, podemos levar em conta duas legislações diferentes. A primeira trata dos critérios para a balneabilidade em águas brasileiras (CONAMA 274/2000), enquanto a segunda dispõe sobre sua classificação e diretrizes ambientais para enquadramento, além das condições e padrões de lançamento de efluentes (CONAMA 357/2005). Estas duas legislações abordam tanto amostras de água do entorno dos costões rochosos, quanto a análise do próprio substrato de rocha.

Segundo a legislação do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), as praias são classificadas em quatro categorias: excelente, muito boa, satisfatória e imprópria. Para a praia ser considerada imprópria para banho, é necessário que 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, haja no máximo 1.000 unidades formadoras de colônias (UFC) de

coliformes fecais (termotolerantes), 800 UFC de *Escherichia coli* ou 100 UFC de *Enterococcus* por 100 mililitros. Ou ainda, que as densidades sejam superiores a 2.000 UFC ml⁻¹ de *Escherichia coli* ou 400 UFC ml⁻¹ de *Enterococcus*, em uma única amostragem.

Desta maneira, ao considerarmos as legislações pertinentes, tanto Praia Grande quanto a Praia de Itaguá são classificadas como “imprópria”, embora esta última seja considerada “imprópria para contato primário no período de 2010-2014, enquanto para Praia Grande obteve a classificação “própria” na maior parte desse período amostrado pela CETESB”. Apesar disso, o presente trabalho, no período estudado, encontrou maiores densidades de indicadores de contaminação fecal na Praia Grande.

Os biofilmes dos costões das praias estudadas também continham bactérias indicadoras de contaminação fecal (*E. coli* e *Enterococcus* sp), com as maiores densidades obtidas para as praias Grande e Itaguá indicando que o biofilme pode ser considerado um refúgio para os organismos, bactérias, entre elas aquelas indicadoras de contaminação fecal e outras potencialmente patogênicas, encontrando nesta matriz o prolongamento de sua sobrevivência (ref ?). Importante ressaltar que a presença de bactérias indicadoras de contaminação e a ação do biofilme como protetor de bactérias, já foram citadas por SHIKUMA & HADFIELD (2010).

A presença de bactérias patogênicas nos biofilme de costões rochosos merece especial atenção, pois demonstra que os biofilmes de costões rochosos de áreas contaminadas podem atuar como (i) fonte de contaminação para a água adjacente e para os organismos marinhos que ali vivem e se alimentam, (ii) fonte de disseminação de microrganismos patogênicos, através dos processos de predação via alça

microbiana, aos níveis tróficos superiores da cadeia alimentar e (iii) um risco à saúde pública quando organismos extraídos destes ambientes são utilizados como fonte de alimento pelo ser humano, como, por exemplo, os mexilhões.

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.

HOBBIIE, 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.