

REVISTA DE ARQUEOLOGIA

Volume 36 No. 3 Setembro - Dezembro 2023

DOSSIÊ

CONTRIBUIÇÕES DA BIOLOGIA MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE SAMBAQUIS EM ÁREAS ALTAMENTE IMPACTADAS PELA URBANIZAÇÃO

Daniela Leles*

Mariana Lopes**

Michelle Mayumi Tizuka***

Bruna Saldanha****

Sérgio Augusto de Miranda Chaves*****

Daniela Klokler*****

Kita Macário*****

Anderson Marques Garcia*****

MaDu Gaspar*****

* Universidade Federal Fluminense, Laboratório de Paleoparasitologia (PPGMPA).

E-mail: dleles@id.uff.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6495-1353>.

** Universidade Federal Fluminense. E-mail: lopes_mariana@id.uff.br.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4422-8651>.

*** Museu de Arqueologia e Itaipu. E-mail: mmtizuka@gmail.com.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6751-2738>.

**** Universidade Federal Fluminense, Laboratório de Paleoparasitologia (PPGMPA).

E-mail: brunamsrj@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4341-7693>.

***** Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca-Fiocruz.

E-mail: sdemirandachaves8@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5767-0713>.

***** Universidade Federal de Sergipe. E-mail: daniela.klokler@gmail.com.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2583-985X>.

***** Universidade Federal Fluminense, Laboratório de Radiocarbono. E-mail: kitamacario@id.uff.br.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0581-9854>.

***** Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Arqueologia (NuPAI).

E-mail: andersonmarquesgarcia@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5414-8084>.

***** Docente colaboradora voluntária da Universidade Federal do Rio de Janeiro/Museu Nacional (PPGARq). E-mail: madugasparmd@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5483-4495>.

RESUMO

A identificação taxonômica de ossos arqueológicos depende da integridade das peças, o que as vezes não ocorre em sítios altamente impactados pela urbanização. O objetivo da pesquisa foi elaborar um modelo experimental usando técnicas de biologia molecular para auxiliar na identificação de espécies de peixes possivelmente presentes no sambaqui da Prainha, localizado no centro da cidade do Rio de Janeiro, e de uma concreção do sambaqui de Camboinhas localizado na Região Oceânica de Niterói/RJ. Alvos moleculares universais para peixes foram usados no modelo experimental e material arqueológico. Não foi possível recuperar DNA de peixe do material arqueológico, mas isso não diminui os resultados encontrados. O modelo experimental se mostrou promissor, podendo ser aprimorado e usado futuramente em outras pesquisas zooarqueológicas. Trouxe à luz a complexidade do estudo de sedimentos pela biologia molecular, e que mesmo resultados inesperados auxiliam na compreensão dos processos tafonômicos que podem ocorrer ao longo do tempo.

Palavras-chave: sambaqui; DNA; zooarqueologia.

DOSSIER

CONTRIBUTIONS OF MOLECULAR BIOLOGY TO IDENTIFYING SHELL MOUND IN AREAS HIGHLY IMPACTED BY URBANIZATION

ABSTRACT

The taxonomic identification of archaeological bones depends on the integrity of the pieces, which sometimes does not occur in sites highly impacted by urbanization. The objective of the research was to elaborate an experimental model using molecular biology techniques to assist in identifying fish species possibly present in the sambaqui da Prainha, in the center of the city of Rio de Janeiro, and of a concretion of the sambaqui de Camboinhas in the Oceanic Region of Niteroi/RJ. Universal molecular targets for fish were used in the experimental model and archaeological material. We could not recover fish DNA from the archaeological material, but this does not diminishes the found results. The experimental model has shown promise and can be improved and used in future zooarchaeological research. It showed the complexity of the study of sediments by molecular biology, and that even unexpected results help in understanding the taphonomic processes that may occur over time.

Keywords: shell mound; DNA; zooarchaeology.

DOSSIER

APORTES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR A LA IDENTIFICACIÓN DE CONCHEROS EN ÁREAS MUY IMPACTADAS POR LA URBANIZACIÓN

RESUMEN

La identificación taxonómica de huesos arqueológicos depende de la integridad de las piezas, lo que a veces no ocurre en sitios muy impactados por la urbanización. Esta investigación tuvo por objetivo desarrollar un modelo experimental con las técnicas de la biología molecular para contribuir con la identificación de especies de peces posiblemente presentes en Prainha sambaqui, conchero ubicado en el centro de la ciudad de Rio de Janeiro, y en una concreción del sambaqui de Camboinhas, situado en la Región Oceánica de Niterói/RJ. Se utilizaron dianas moleculares

universales para peces en el modelo experimental y en el material arqueológico. No fue posible recuperar ADN de peces del material arqueológico, pero esto no afectó los resultados encontrados. El modelo experimental resultó prometedor y podría mejorarse y utilizarse en futuras investigaciones zooarqueológicas. Se sacó a la luz la complejidad de estudiar los sedimentos utilizando la biología molecular, e incluso los resultados inesperados ayudan a comprender los procesos tafonómicos que pueden producirse a lo largo del tiempo.

Palabras clave: concheros; ADN; zooarqueología.

INTRODUÇÃO

A identificação taxonômica “clássica” por meio dos ossos é permitida quando se tem peças “chaves” em que há preservação mínima de sua morfologia que permita o diagnóstico. Porém, muitas vezes esse não é o contexto com o qual nos deparamos em regiões altamente impactadas, por exemplo pela urbanização, o que dificulta até mesmo a caracterização do sítio arqueológico. Neste cenário a biologia molecular pode ser uma alternativa, pois não necessita da integridade morfológica das peças ósseas, e pode ser específica ao ponto de determinar a espécie biológica independente do seu táxon, usando-se por exemplo *primers* universais para grupos de espécie com seu posterior sequenciamento nucleotídico. Outra metodologia que tem sido aplicada à zooarqueologia é a espectrometria de massa (ZooMS), com a finalidade de auxiliar na identificação taxonômica principalmente pelo estudo dos ossos, mas que também apresenta avanços e desafios (RICHTER *et al.*, 2022). A biologia molecular está cada vez mais presente na pesquisa arqueológica, e os sequenciadores de nova geração (NSG) permitiram alcançar um nível de informação sem precedentes na história. O uso de NSG permitiram Slon e demais autores (2017) recuperarem DNA antigo de homínídeos e animais em sedimentos do pleistoceno. Contudo, muitas vezes é preciso se voltar ao básico, e experimentações mais simples também podem lançar luz a questões que ainda são desafiadoras para arqueologia, como compreender processos tafonômicos complexos que podem interferir nos resultados. Assim, análises microscópicas dos sedimentos pela palinologia e pela paleoparasitologia também podem ajudar a compreender estas interferências.

Quando estamos diante de uma abordagem metodológica ainda não avaliada ou não validada para o estudo de possíveis amostras arqueológicas, se tornam imprescindíveis os modelos experimentais. Na paleoparasitologia, modelos experimentais começaram a ser usados desde o surgimento desta área do conhecimento, quando Ruffer (1910) propõe a reidratação de tecidos, e isso o permitiu visualizar ovos de *Schistosoma haematobium* em múmias egípcias. Já no Brasil na década de 1980 modelos experimentais foram propostos para avaliar alterações nos ovos dos parasitos e o quão isso comprometeria o diagnóstico (CONFALONIERI *et al.*, 1985). Atualmente, com o avanço e uso cada vez mais frequente de técnicas de biologia molecular aplicadas ao material arqueológico, os modelos experimentais têm sido usados para estudar parasitoses que à época ainda eram pouco estudadas ou ainda não haviam sido estudadas por métodos moleculares, estes foram o caso da Doença de Chagas, echinostomíase e toxoplasmose (BASTOS, 1996; TERRA *et al.*, 2004; LELES *et al.*, 2014, 2016). Ou, ainda, para avaliar metodologias mais adequadas para cada tipo de estudo, que melhoram o desempenho das técnicas moleculares e/ou ao mesmo tempo propiciam o uso de menores quantidades de amostras, contribuindo assim para preservação do material (FREIRE *et al.*, 2015; LELES *et al.*, 2018; PUCU *et al.*, 2019). Modelos experimentais em laboratório também já foram usados para o estudo de sambaquis do Brasil, com o intuito de

avaliar as melhores metodologias para o estudo de parasitos, observar possíveis contaminações com material moderno, e a preservação de DNA parasitário (CAMACHO *et al.*, 2013, 2016).

Assim, como estamos diante de um novo cenário para avaliar a aplicabilidade da biologia molecular para ajudar a identificar sambaquis ou vestígios de sambaquis em áreas altamente impactadas pela urbanização, traçamos uma abordagem metodológica para esta investigação. O objetivo foi avaliar se um material altamente fragmentado de natureza desconhecida e sedimento coletado no “Sambaqui da Prainha”, localizado no centro da cidade do Rio de Janeiro-RJ, e também de um pequeno bloco sedimentar de um remanescente do “Sambaqui de Camboinhas”, localizado da Região Oceânica de Niterói-RJ, poderiam se tratar de fragmentos ósseos de alguma espécie de peixe, ou mesmo se sua identificação seria possível no sedimento sem a evidência destes ossos, uma vez que a presença de peixes seria um forte indício da presença de um sambaqui nas regiões supracitadas.

Contextualizando ambos os sítios, pode-se falar, primeiramente, que o sítio arqueológico Sambaqui da Prainha possui como remanescentes duas possíveis áreas de atividades. A primeira delas foi interpretada como um espaço de produção de artefatos líticos de quartzo, e a segunda se enquadra no que se tem chamado de sambaquis residuais (SIMÕES, 1981; CHMYZ *et al.*, 2003; TAVARES, 2012; GASPAR *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2020). É desse segundo espaço que as amostras aqui discutidas provêm; mais especificamente, daquilo que foi denominado como unidade estratigráfica [100], identificada a 1,6 m abaixo do asfalto que revestia a via urbana e entendida naquele momento como majoritariamente constituída por silte e fragmentos de madeiras e ossos de peixes com tamanho de grânulos (GARCIA *et al.*, 2020).

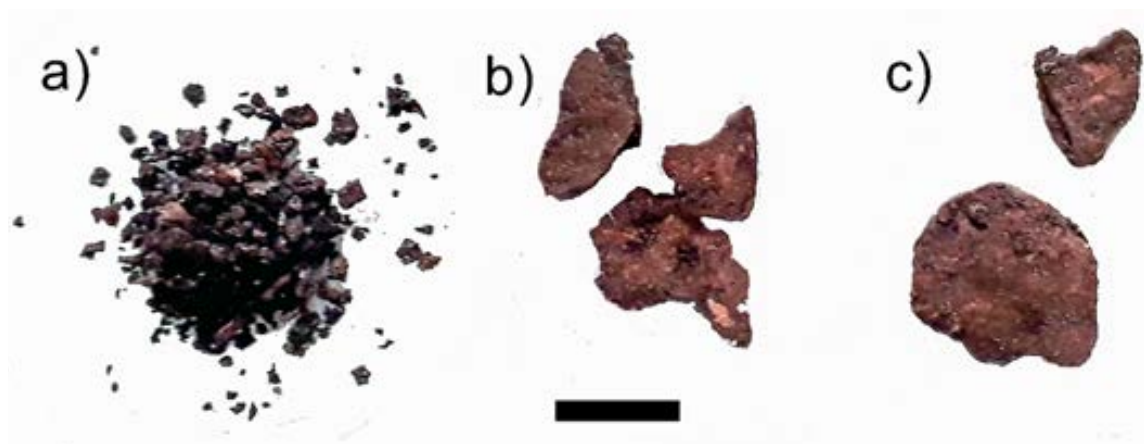
Já o Sambaqui de Camboinhas compõe uma paisagem sambaquieira conhecida há longa data, composta em conjunto com sítios Duna Pequena e Duna Grande/Itaipú (KNEIP *et al.*, 1981; DIAS JÚNIOR., 1992; RODRIGUES-CARVALHO e SCHEEL-YBERT, 2012; TIZUKA *et al.*, 2019). Esse sítio apresenta uma singular importância para o estudo de sambaquis, uma vez que possibilitou datações mais recuadas para o litoral fluminense, segundo Kneip e demais autores (1981) alcançaria 7958 ± 224 AP. A presença de concreções no Sambaqui de Camboinhas foi caracterizada inicialmente por Barcia e Andrade (1981), constituídas principalmente por “vértebras e ossos de peixes, fragmentos de conchas de moluscos bivalves e diminutos gastrópodes”. Guimarães e demais autores (2005) reconceituam o termo “concreção”, tendo em vista suas características em sítios arqueológicos. Nesse sentido, por concreção entendemos nesta pesquisa como um conglomerado de vestígios orgânicos de origem cultural (ossos, conchas, carvão e artefatos) e vestígios minerais (quartzo, sílica, argila e silte) originado de processos de formação antropogênicos (ação de fogo) ou naturais (ação da água), apresentando formas, dimensões e espessuras diversas.

METODOLOGIA

Amostras

Foram selecionados três tipos de amostras do Sambaqui Prainha (em frente ao imóvel n. 27 da Avenida Marechal Floriano, UTM 23K 686476/7466308), no centro da cidade do Rio de Janeiro (Figura 1); e uma amostra do remanescente do Sambaqui de Camboinhas (próximo ao PT-021, coordenadas UTM 23K 699815/7459253), localizado na região oceânica de Niterói-RJ (Figura 2). Uma vez selecionadas as amostras, traçamos um fluxograma de trabalho (Fluxograma 1), em que as amostras serão denominadas Sambaqui Prainha e Sambaqui Camboinhas, uma codificação para este artigo que também foi dada a fim de facilitar a apresentação dos resultados (Quadro 1).

Figura 1. Material de natureza desconhecida coletado no Sambaqui da Prainha, Rio de Janeiro-RJ. Legenda: a, b e c representam o material peneirado em malhas de 2, 4 e 5,6 mm, respectivamente. Escala de 1 cm.



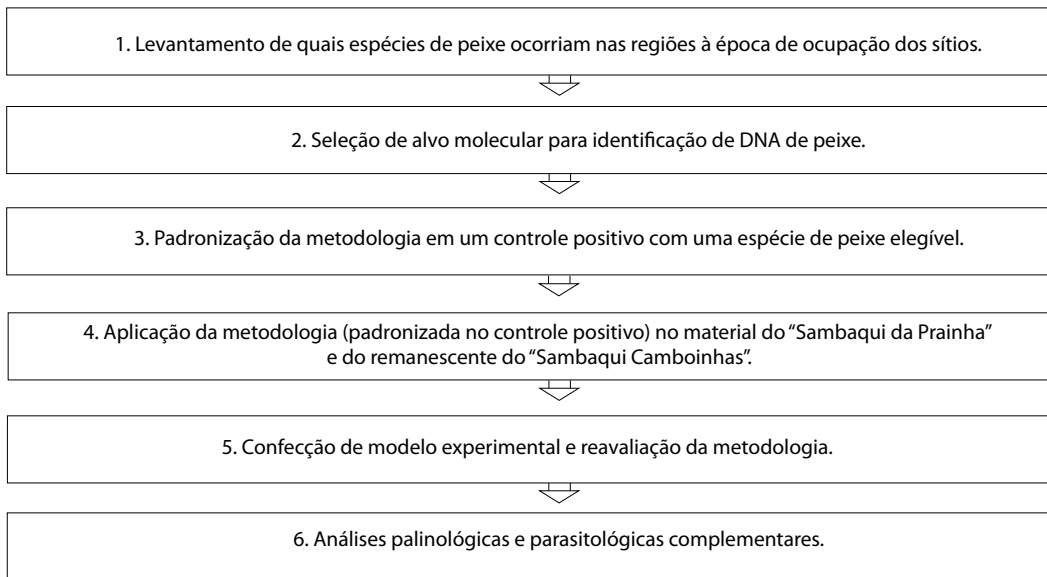
Fonte: Mariana Lopes.

Figura 2. Material do remanescente do Sambaqui Camboinhas, Niterói-RJ.



Fonte: Daniela Leles.

Fluxograma 1. Metodologia traçada para abordagem molecular para possível identificação de sambaquis em regiões altamente impactadas pela urbanização na região central da cidade do Rio de Janeiro-RJ e Região Oceânica da cidade de Niterói-RJ.



Fonte: Elaboração nossa.

Quadro 1. Descrição das amostras usadas no estudo e resultados obtidos por meio da microscopia e ensaio molecular.

Amostra (código usado no artigo)	Descrição	Análise molecular	Análise microscópica
C1	Controle positivo peixe fresco robalo	100% similar a <i>Centropomus parallelus</i>	NA
C2	Controle positivo peixe fresco tainha	100% similar a <i>Mugil liza</i>	NA
CEX1	Controle positivo peixe robalo modelo experimental dessecado	100% similar a <i>Centropomus parallelus</i>	NA
A1	Amostra arqueológica 16 sedimentos	<i>Salinimonas lutimaris</i> , <i>Shewanella</i> sp. e <i>Alteromonas</i> sp.	Presença de fungos (não identificados)
A2	Amostra arqueológica 16 fragmentos não identificados	Não amplificou	NA
A3	Amostra arqueológica 35 sedimentos	<i>Salinimonas lutimaris</i> , <i>Shewanella</i> sp. e <i>Alteromonas</i> sp.	Esporo trilete e presença de fungos (não identificados)

continua...

Quadro 1. Continuação

Amostra (código usado no artigo)	Descrição	Análise molecular	Análise microscópica
A4	Amostra arqueológica 35 fragmentos não identificados	NA (sequência nucleotídica com qualidade ruim para análise)	NA
A5	Amostra arqueológica 24 sedimentos	NA (mesmo após purificações adicionais continuou inibida)	Esporo trilete e presença de fungos (não identificados)
A6	Amostra arqueológica 24 fragmentos intermediários não identificados	Não amplificou	NA
A7	Amostra arqueológica 24 fragmentos maiores não identificados	Não amplificou	NA
A8	Amostra de sedimento de Camboinhas	Não amplificou	<i>Ascaris lumbricoides</i> , esporos de Polypodiaceae e trilete
CaEX1-5	Subamostras do modelo experimental (robalo+sedimento do sambaqui Camboinhas)	<i>Alcaligenes faecalis</i>	NA
PrEX1-5	Subamostras do modelo experimental (robalo+sedimento do sambaqui Prainha)	<i>Alcaligenes faecalis</i> ; <i>Glutaminicibacter creanolyticus</i> e <i>Camamonas</i> sp.	NA

Fonte: Elaboração nossa.

Legenda: NA (não se aplica ou não realizado).

Levantamento dos possíveis peixes que ocorreram nas regiões à época da possível ocupação

Famílias Albulidae, Ariidae, Carangidae, Centropomidae, Diodontidae, Haemulidae, Holocentridae, Mugilidae, Sciaenidae, Serranidae, Sparidae, Sphyraenidae, Tetrodontidae e gêneros *Archosargus*, *Caranx*, *Centropomus*, *Chilomycterus*, *Cynoscion*, *Epinephelus*, *Haemulon*, *Micropogonias*, *Mugil*, *Orthopristis*, *Pogonias*, *Sphyraena*, *Stellifer*. O levantamento dos peixes que ocorreram na época da possível ocupação do Sítio Prainha é resultado da identificação preliminar dos vestígios da ictiofauna encontrados nas ocorrências do centro do Rio de Janeiro durante o Programa de Gestão do Patrimônio Arqueológico e Histórico no trecho I900 sob coordenação da prof. Dra. MaDu Gaspar.

Todos os gêneros mencionados são atualmente comuns na região da Baía de Guanabara (MONTEIRO-NETO *et al.*, 2008), assim como em outros sambaquis ao longo do litoral do Rio de Janeiro (KNEIP, 2001; LOPES *et al.*, 2016), portanto também seriam espécies elegíveis para o estudo do remanescente do sambaqui Camboinhas. Trata-se de peixes demersais estuarinos costeiros, habitantes de fundos lamacentos de manguezais ou fundos arenosos, sendo que *Centropomus* sp. e *Mugil* sp. também podem adentrar em água doce.

Seleção do alvo molecular e peixes a serem usados como controle positivo

Elegemos como alvo molecular para busca de DNA de possíveis espécies de peixe um gene que é considerado “DNA barcoding”, o gene mitocondrial citocromo c oxidase, e que portanto estaria presente em uma grande variedade de espécies, otimizando as chances de identificação (WARD *et al.*, 2005), uma vez que não tínhamos como precisar qual a espécie seria detectada no material, isso só seria possível posteriormente com o sequenciamento nucleotídico. Devido à facilidade de compra em comércio local, adquirimos um espécime de “robalo” (*Centropomus* sp.) e um de “tainha” (*Mugil* sp.) frescos para serem usados como controle positivo.

Ensaio molecular aplicado aos controles positivos

Removeu-se uma pequena parte da carne, a qual foi macerada com o auxílio de grau, pistilo e nitrogênio líquido, e procedeu-se com a extração do DNA total usando kit comercial Qiamp Mini Stool (Qiagen). O kit foi selecionado devido ao fato de posteriormente a metodologia ter que ser aplicada a sedimento que contém diversos inibidores da *Polymerase Chain Reaction* (PCR), e o kit Qiagen dispõe de componentes que ajudam na remoção de possíveis inibidores, além de ser usado por nosso grupo de pesquisa em estudos prévios com sucesso. A extração foi feita seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, com eluição final em 60 µl. Foram usadas as seguintes combinações de *primers* para o alvo citocromo c de peixe (WARD *et al.*, 2005): 1-F1/R1; 2-F2/R2; 3-F1/R2 e 4-F2/R1. As reações foram feitas em volume final de 50 µl usando-se 3 µl do DNA extraído: tampão [1x], Mg 2.5mM; 200 ng de cada primer e 2,5 u de taq polimerase (®Ludwig Biotec). A ciclagem foi feita em termociclador programável (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystem): 95°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos (94°C por 30”, 54°C por 30” e 72°C por 1’) e dez minutos de extensão a 72°C. A PCR foi acompanhada de um controle negativo para assegurar a validade do ensaio. Após a corrida eletroforética em gel de agarose 1,2% e visualização e fotodocumentação no sistema (L.Pix, Locus Biotecnologia), os *amplicons* foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e sequenciados na plataforma de sequenciamento que compõe a Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz. As sequências obtidas foram analisadas nos programas Chromas v. 2.6.6 e Bioedit v. 7.2.5 e comparadas àquelas depositadas no Genbank por meio da ferramenta Blast. Os experimentos estão dentro do escopo do projeto cadastrado no Sisgen sob o número A3AFFB8. Todos os ensaios moleculares foram realizados nos laboratórios de Paleoparasitologia, e de Biologia Molecular de Parasitos, localizado no Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense.

Ensaio molecular aplicado às amostras arqueológicas

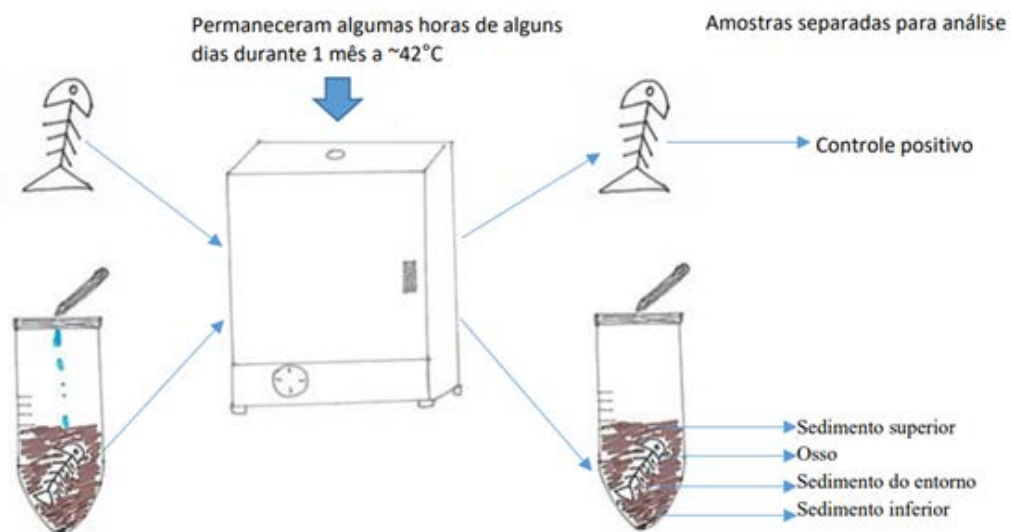
Para o Sambaqui Prainha foram subdivididas em duas partes as amostras de número 16 e 35 (sedimento desagregado e pedaços maiores que poderia se tratar de material ósseo), e a amostra 24 foi subdividida em três partes (sedimento desagregado, fragmentos intermediários e maiores). Para o remanescente do Sambaqui de Camboinhas foi analisada uma amostra do sedimento. Incluímos um controle negativo de extração do laboratório

(o qual era composto somente pelos reagentes). Em uma análise macroscópica de algumas amostras do Sambaqui Prainha, os pedaços maiores não se assemelhavam a ossos, fato que foi reforçado pela dificuldade de sua maceração, ainda assim prosseguimos com a análise de forma separada. Seguimos o protocolo de extração aplicado aos controles positivos, com a seguinte modificação, a reação ficou incubando em proteinase k por uma hora. Realizou-se previamente uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) competitiva com DNA sabidamente amplificável para avaliar a presença de inibidores. Uma vez detectada a inibição, foi feita uma purificação adicional do DNA com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Certificada a ausência destes, prosseguimos com a PCR para o alvo molecular citocromo c oxidase de peixe usando a combinação F2/R1, com a seguinte modificação em relação ao aplicado ao controle positivo: foram aplicados 5 µl do DNA extraído, a 45 ciclos no termociclador. A PCR foi acompanhada do controle negativo da extração e da PCR. Todas as ampliações obtidas foram purificadas e sequenciadas.

Confecção do modelo experimental e análises moleculares

Selecionamos para o modelo experimental o peixe robalo. Separamos um fragmento do peixe (tecido e osso) e o submetemos à dessecação artificial em estufa a 42°C por algumas horas do dia pelo período de aproximadamente um mês até sua completa desidratação, sendo então usado como controle positivo do modelo experimental. Em dois microtubos com um pequeno furo no fundo de cada, colocamos um pouco do sedimento do Sambaqui Prainha e no outro do Sambaqui de Camboinhas, e por cima dessas camadas um fragmento do osso ainda com a carne do robalo, e cobrimos o peixe com mais sedimento do sambaqui correspondente. O experimento foi submetido à desidratação em estufa conforme supracitado, e ocasionalmente molhado com água autoclavada durante algum tempo, com intuito de minimamente simular um cenário de “sítio a céu aberto” sujeito a ação da chuva. Após a dessecação artificial, as amostras de cada tubo foram divididas em cinco subamostras: o sedimento colocado superiormente ao peixe, somente o osso, sedimento que estava no entorno do peixe, sedimento inferior ao peixe, e a água que que passou pelo furo no inferior do tubo também foi coletada para análise. Seguimos com o protocolo conforme descrito no item 2.5. Um esquema do modelo experimental pode ser observado na Figura 4.

Figura 4. Esquema do modelo experimental para análise molecular.



Fonte: Elaboração nossa.

Análises parasitológicas e palinológicas complementares

Adicionalmente sedimentos das três amostras do Sambaqui Prainha (16, 24 e 35) e do Sambaqui de Camboinhas foram analisadas em busca de ovos, cistos e oocistos de parasitos, e pólen através de microscopia óptica, com o material sendo submetido a reidratação por fosfato trissódico (Na_3PO_4) a 0,5% por 72 horas (CALEN; CAMERON, 1960) e sedimentação espontânea proposta por Lutz (1919) por 24 horas. Foram preparadas entre 9-23 lâminas de cada amostra para análise paleoparasitológica e três lâminas para análise palinológica, as quais foram observadas em microscópio Nikon® Eclipse E200MV-R em aumento de 100x e fotografados em aumento de 400x. Esta etapa do projeto foi realizada nos Laboratórios de Palinologia, e Laboratório de Ecologia Gustavo de Oliveira Castro, ambos do Departamento de Endemias Samuel Pessoa, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP/Fiocruz). Um resumo com a descrição técnica, condições e reagentes usados em todos os experimentos se encontra no Quadro 2.

Quadro 2. Resumo das técnicas usadas, equipamentos e condições dos experimentos.

Ensaio realizado	Descrição
Extração de DNA	Kit comercial Qiamp Mini Stool (Qiagen)
Purificação do DNA e <i>amplicons</i>	Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)
PCR	Alvo molecular para peixe (F2/R1/WARD <i>et al.</i> 2005). Reação em volume final de 50 μl , 3 μl ou 5 μl do DNA, tampão [1x], Mg 2.5mM; 200 ng de cada primer e 2.5 u de taq polimerase (®Ludwig Biotec). Ciclagem em termociclador programável (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystem): 95°C por 5 min., seguido de 35 ou 45 ciclos (94°C por 30", 54°C por 30" e 72°C por 1') e 10' de extensão a 72°C.
Sequenciamento nucleotídico	SANGER (Sequenciamento de DNA por eletroforese capilar, com 96 capilares-3730xL).
Programas de Bioinformática	Chromas v. 2.6.6 e Bioedit v. 7.2.5, ferramenta BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov)
Análises microscópicas	reidratação em Na_3PO_4 0,5%/72 horas e sedimentação espontânea/24h, confecção de lâminas e análise em microscópio Nikon® Eclipse E200MV-R

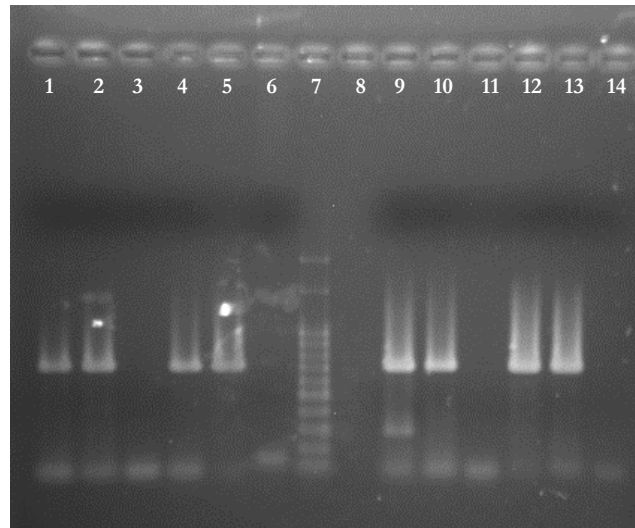
Fonte: Elaboração nossa.

RESULTADOS

As amplificações obtidas para o peixe fresco robalo (amostra C1) e tainha (amostra C2) estavam na altura esperada de aproximadamente 700 pb (Figura 4). O sequenciamento nucleotídico confirmou as espécies, mostrando 100% de similaridade com várias espécies depositadas no *GenBank* para *Mugil liza* (tainha) (UFRG521820; UFRG519373; UFRG516715) e *Centropomus parallelus* (robalo) (LBP29128; JQ365273), as sequências editadas deste estudo foram depositadas no Genbank sob os números de acesso: ON167514 e ON167518. Uma vez que obtivemos sucesso com o protocolo utilizado iniciamos os procedimentos com as amostras do Sambaqui da Prainha (amostras A1-A7) e de Camboinhas (amostra A8). Selecionamos a combinação de *primers* F2/R1 para os ensaios moleculares

seguintes, por ter apresentado um melhor rendimento, ampliações mais evidentes, e sem ampliações inespecíficas para ambas as espécies de peixe (Figura 5).

Figura 5. Amplificações obtidas para o alvo citocromo c oxidase de peixe com quatro diferentes combinações de *primers* a partir de amostras frescas dos peixes robalo e tainha.



Fonte: Elaboração nossa.

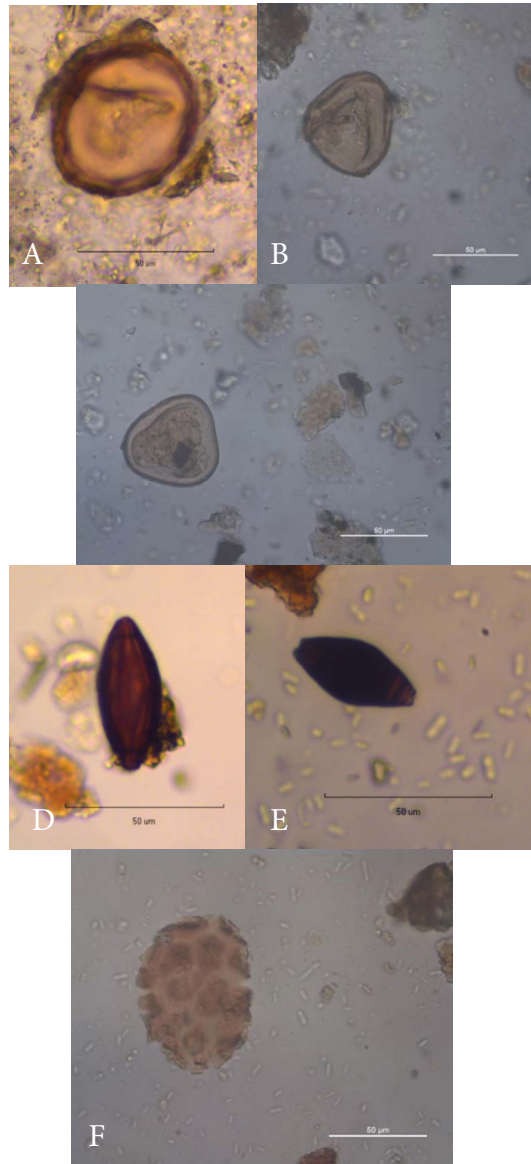
Legenda: 1, 2, e 3 (tainha, robalo e controle negativo da PCR, respectivamente com os *primers* F1/R1); 4, 5 e 6 (tainha, robalo e controle negativo da PCR, respectivamente com os *primers* F2/R2); 7: marcador molecular 100 pb (Ludwig Biotec); 8 (nada foi aplicado), 9, 10 e 11 (tainha, robalo e controle negativo da PCR, respectivamente com os *primers* F1/R2); 12, 13 e 14 (tainha, robalo e controle negativo da PCR, respectivamente com os *primers* F2/R1).

Para as subamostras arqueológicas avaliadas, inicialmente cinco amostras apresentaram inibição: Sambaqui Prainha (sedimento desagregado da n. 16/A1), sedimento desagregado da n. 24/A5), sedimento desagregado da n. 35/A3 e pedaços maiores da n. 35/A4) e também o sedimento do Sambaqui Camboinhas/A8). Após uma nova purificação, continuou inibida somente o sedimento desagregado da amostra 24/A5 que está associada ao Sambaqui da Prainha. Uma vez avaliadas apenas as amostras que não continham inibidores, obteve-se ampliações para três amostras (sedimento desagregado da n. 16 (A1) e n. 35 (A3); e pedaços maiores da n. 35 (A4) na altura do controle positivo, ressaltando-se que não houve ampliações para os controles negativos (da PCR e extração). Repetimos a PCR, e na repetição nenhuma amostra arqueológica amplificou, ainda sim sequenciamos os *amplicons* provenientes da primeira amplificação. Ainda que as sequências obtidas não apresentassem boa qualidade, estas revelaram similaridade entre 78 e 80% com algumas bactérias tais como *Salinimonas lutimaris*, *Shewanella* sp. e *Alteromonas* sp.

Quanto ao modelo experimental, foi possível recuperar o DNA do osso dessecado separadamente CEX1 (usado como controle positivo no modelo experimental) e confirmar a espécie pelo sequenciamento, *Centropomus parallelus*, a qual se mostrou totalmente similar ao peixe fresco. Contudo, quando o peixe foi associado ao sedimento proveniente de Sambaqui, não conseguimos recuperar DNA do peixe em nenhuma das amostras, mas sim principalmente da bactéria *Alcaligenes faecalis* em ambos os modelos, Prainha (PrEX1-5) e Camboinhas (CaEX1-5), sendo que para este último ainda apareceram bactérias como *Glutaminicibacter creanolyticus* e gênero *Camamonas*.

Nas análises paleoparasitológicas e palinológicas complementares, foi observado um ovo de *Ascaris lumbricoides* (Figura 6A) na amostra (A8) do possível remanescente do Sambaqui Camboinhas-RJ, e esporos de Polypodiaceae (Figura 6B e C). Nas amostras do “Sambaqui Prainha” foram encontrados muitos esporos de fungos (Figura 6D e E) e também esporo de Polypodiaceae (Figura 6F) (Quadro 1).

Figura 6. Estruturas observadas na microscopia óptica nas amostras do Sambaqui Camboinhas e Prainha.



Fonte: Elaboração nossa.

A: Ovo de *Ascaris lumbricoides*, B e C esporo de pteridófitas recuperado do possível remanescente do Sambaqui Camboinhas. D e E: esporos de fungos, e F: esporo de pteridófitas recuperado das amostras do Sambaqui Prainha. Fotos feitas usando o microscópio Nikon® Eclipse E200MV-R no aumento de 400x.

DISCUSSÃO

Com o emprego desta metodologia mostramos sucesso na recuperação do DNA tanto no material fresco quanto dessecado quando o peixe usado como controle positivo não estava em contato com o sedimento dos sítios arqueológicos. O fato de ter sido possível recuperar fragmentos de aproximadamente 700 pb em material dessecado artificialmente sugere ser possível recuperar fragmentos maiores que o pressuposto pela maioria dos estudos que usam PCR convencional em material arqueológico (DITTMAR, 2011), ainda que a condição aqui usada seja controlada em laboratório e jamais mimetize com exatidão a particularidade dos processos de preservação ao que o material esteve submetido ao longo dos anos, o que atesta mais uma vez a importância do uso de modelos experimentais. Quanto às ampliações obtidas para as amostras arqueológicas do Sambaqui Prainha, ainda que na repetição da PCR estas não tenham amplificado, revelaram similaridade entre 78 e 80% com algumas bactérias como *Salinimonas lutimaris*, *Shewanella* sp. e *Alteromonas* sp, bactérias que são comuns em ambientes aquáticos e marinhos, e inclusive algumas estão associadas à decomposição de peixes (ZANG *et al.*, 2020).

Foi evidente no estudo que o contato do peixe (usado como controle do estudo) com o sedimento provenientes dos sítios favoreceu a proliferação de bactérias que até mesmo poderiam estar presentes no peixe que foi introduzido no modelo experimental. *A. faecalis* é uma bactéria saprófita, que faz parte da microbiota entérica de humanos e animais domésticos principalmente, mas pode ser patogênica, e tem sido detectada em peixes (BINTA *et al.*, 1982; OLINDA *et al.*, 2014), sendo utilizada como probiótico e inibidor de atividades de bactérias patogênicas em algumas espécies de peixes (ANNAMALAI *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2020), além de poder estar presente também em águas fluviais e no solo. Albuquerque e demais autores (2020) citam a presença dessa bactéria na cavidade oral de pequenos primatas (calitriquídeos) da Mata Atlântica do Rio de Janeiro, mas estando ausentes do intestino destes. O fato desta bactéria ter aparecido no modelo experimental para os dois sítios Sambaqui Prainha e Camboinhas aponta para que esta tenha vindo do peixe fresco, e o contato com o sedimento e temperatura da estufa tenha favorecido seu crescimento. *A. faecalis* foi reportada no solo de um sítio arqueológico inundado na Polônia, localizado na península de Biskupin (KUBIAK *et al.*, 2010), porém os autores não encontraram nenhum registro publicado até o momento em sítios arqueológicos brasileiros. A hipótese de que a fonte de contaminação bacteriana pode ter vindo do peixe usado como controle positivo e propositalmente inserido no experimento é reforçada, uma vez que essa bactéria não foi detectada quando só o sedimento do “Sambaqui Camboinhas” foi usado, ou só o sedimento ou fragmentos coletados do “Sambaqui da Prainha” foram analisados separadamente, sem a presença do controle positivo; naquela ocasião foram outras as bactérias que apareceram. Possivelmente devido à alta quantidade desse microrganismo, *A. faecalis*, o seu DNA foi detectado em detrimento do DNA do peixe que possivelmente estava em menor quantidade, fruto da degradação sofrida devido ao efeito tafonômico proposto, água e calor. Isso pode demonstrar que o pouco tempo que o peixe foi submetido a tal condição já tenha sido suficiente para promover grande degradação do DNA. Ressaltamos também que mesmo alguns alvos moleculares (oligonucleotídeos) sendo considerados específicos para determinados grupos taxonômicos e usados como “barcoding” muitas vezes detectam outros organismos não esperados. O que leva a uma outra discussão, ainda que não seja o que se está procurando, continuamos com a opinião que dada a raridade do material toda informação recuperada deve ser relatada, e pode servir a outras pesquisas e colaborar para elucidar cenários arqueológicos (PUCU *et al.*, 2017). Assim é possível

notar que ambientes diferentes também promovem o crescimento de microrganismos diferentes, e podem ajudar nas interpretações sobre ambientes e efeitos tafonômicos pelos quais o material pode ter passado – uma vez que além de *A. faecalis* no sambaqui de Camboinhas, apareceram outras bactérias que não estavam presentes no modelo experimental do Sambaqui Prainha.

O estudo paleoparasitológico de sambaquis tem sido desafiador, sendo raros os relatos de parasitos, dada a natureza e degradação dos vestígios orgânicos parasitários, como mostrado para o Sambaqui de Guapi-RJ (CAMACHO *et al.*, 2013). Outro fato a ser considerado é que o solo naturalmente contém substâncias inibidoras que dificultam alguns protocolos moleculares adotados, e nossa experiência mostra que em sedimento de sambaquis esses inibidores estão em maior quantidade, como demonstrado por meio também de um modelo experimental para o sambaqui de Sernambetiba-RJ (CAMACHO *et al.*, 2016). Não foi diferente com o “Sambaqui da Prainha e Camboinhas”, foram necessárias purificações adicionais do DNA.

No entanto, há de se lembrar que em um contexto real as camadas dispostas em um sambaqui são muito mais complexas, podendo haver conchas e outros itens que poderiam impermeabilizar ou formar uma camada de proteção ao material, contribuindo assim para uma melhor preservação e conseqüentemente a possibilidade de obtenção de DNA autóctone e contemporâneo à ocupação do sítio. Há trabalhos no Brasil que inclusive recuperaram DNA humano antigo de material ósseo proveniente do sambaqui Jabuticabeira II, localizado no sul do país (POSTH *et al.*, 2018).

As análises complementares aqui propostas foram no intuito de trazer luz acerca do tempo de ocupação dos sítios ou no envolvimento de processos tafonômicos que poderiam refletir nos resultados moleculares observados. Na análise palinológica por exemplo, poderia trazer informações sobre plantas que hoje não são tão comuns na região, e no caso dos parasitos, para verificar se havia a existência de parasitos humanos, que poderiam indicar a ocupação antiga do sítio, contaminação com ocupações mais recentes, ou ainda da existência de parasitos espécie-específicos de animais. Além de ajudarem elucidar aspectos tafonômicos que poderiam impactar nas análises paleoparasitológicas, como o encontro de fungos coprofágicos ou helmintofágicos que poderiam destruir estruturas parasitárias, por ventura presente no material, a presença desses fungos é constantemente encontrada em sítios arqueológicos e em estruturas de fossas e latrinas (REINHARD *et al.*, 1988; MOTA *et al.* 2003). No Sambaqui de Camboinhas foi encontrado um ovo de *Ascaris lumbricoides*, parasito tipicamente de humanos. No entanto, é difícil avaliar se este parasito é contemporâneo à ocupação do sítio, ou poderia se tratar de contaminação com material moderno. Porém, Camacho e demais autores (2016), por meio de modelo experimental usando o parasito *A. lumbricoides*, mostra que a percolação de ovos de camadas superiores para camadas inferiores é baixa, minimizando as chances de contaminação. Ressaltamos a alta presença de fungos no material do sambaqui Prainha, o que poderia sugerir uma alta umidade do ambiente, porém não foi possível a sua classificação. Em ambos os sambaquis, ainda que as amostras tenham sido negativas para análise de pólen, destacamos os esporos de pteridófitas, o que poderia indicar um ambiente brejoso e úmido, mas este resultado deve ser visto com muita ressalva, uma vez que pouco material foi analisado, e somente três lâminas foram confeccionadas.

CONCLUSÃO

Ainda que não tenhamos comprovado a existência de DNA de peixe nas amostras de origem desconhecida do Sambaqui Prainha, sedimentos deste mesmo Sambaqui e do remanescente do Sambaqui Camboinhas, concluímos que o sucesso da metodologia aplicada

ao material dessecado do peixe mostra ser possível a recuperação do seu DNA e em maior tamanho que o pressuposto na maior parte dos estudos paleoparasitológicos moleculares, desde que este se encontre preservado e na ausência de outros microrganismos que são detectados pelo alvo molecular usado. Para o Sambaqui de Camboinhas, foram coletadas outras amostras de concreções pelo Projeto “Recadastramento dos Sítios Arqueológicos de Duna Pequena e Camboinhas por meio de pesquisa *in loco*” (Processo Iphan nº 01500.001659/2022-29) e, assim, pretende-se dar continuidade às futuras pesquisas em busca de novas evidências para a contribuição da metodologia aqui explorada. Assim, o modelo experimental se mostrou promissor, podendo ser aprimorado e usado futuramente como um complemento a pesquisas zooarqueológicas em que a taxonomia clássica não é eficiente para identificação dos espécimes. Porém, ressaltamos que como qualquer modelo experimental, este estudo tem limitações, e em pesquisas futuras pode-se por exemplo escolher outros alvos moleculares, incluir mais amostras provenientes de outros sítios, usar outras espécies de peixe como controle positivo, incluir outras análises moleculares e estatísticas. A principal mensagem desta nota de pesquisa, entretanto, é reforçar que “modelos experimentais básicos” continuam a ser fundamentais na arqueologia, e o uso do modelo nos permitiu observar processos tafonômicos que interferiram diretamente nos resultados esperados, e isso não seria possível analisando somente as amostras arqueológicas.

AGRADECIMENTOS

FAPERJ, PDPA-FEC-UFF-Prefeitura de Niterói, PROEX-UFF, CAPES, Laboratório Multiusuário de Criogenia da Universidade Federal Fluminense (CrioUFF), Laboratório Multiusuários em Microbiologia e Parasitologia (LMMP), Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, Daniela *et al.* Microbiota oral e retal de calitriquídeos (*Callithrix* sp.) em área antropizada de Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 72, n. 4, p. 1113-1121, 2020.
- ANNAMALAI, N. *et al.* Characterization of protease from *Alcaligenes faecalis* and its antibacterial activity on fish pathogens. *Journal of Environmental Biology*, v. 32, n. 6, p. 781-786, 2011.
- BARCIA e ANDRADE, Amaro. Concreções do Sambaqui de Camboinhas. In: KNEIP, Lina M.; PALLESTRINI, Luciana; CUNHA, Fausto L. S. (coord.). *Pesquisas arqueológicas no litoral de Itaipu, Niterói, RJ*. Rio de Janeiro: Luna, 1981. p. 151-153.
- BASTOS, Otílio M. *et al.* Experimental paleoparasitology: identification of *Trypanosoma cruzi* DNA in desiccated mouse tissue. *Paleopathology Newsletter*, v. 94, p. 5-8, 1996.
- BINTA, G. *et al.* Market fish hygiene in Kenya. *The Journal of Hygiene*, v. 89, n. 1, p. 47-52, 1982.
- CALLEN, E. O.; CAMERON, T. W. M. Prehistoric diet revealed in coprolites. *The New Scientist*, v. 8, p. 35-40, 1960.
- CAMACHO, Morgana *et al.* Lutz’s spontaneous sedimentation technique and the paleoparasitological analysis of sambaqui (shell mound) sediments. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 2, p. 155-159, 2013.
- CAMACHO, Morgana *et al.* Investigation of biodegradation in three different sediment cores from a shellmound (sambaqui) of Brazil, using *Ascaris lumbricoides* eggs as a model. *Journal of Archaeological Science: Reports*, v. 9, n. 6, p. 358-365, 2016.

- CHMYZ, Igor; SGANZERLA, Eliane M.; GOMES CHMYZ, João C. Novas contribuições para o estudo do sambaqui de Matinhos, no estado do Paraná. *Arqueologia*, v. 1, n. 1, p. 1-55, 2003. Suplemento.
- CONFALONIERI, Ulisses *et al.* The experimental approach to palaeoparasitology: desiccation of *Trichuris trichiura* eggs. *Paleopathology Newsletter*, v. 51, p. 9-11, 1985.
- DIAS JÚNIOR, Ondemar. A tradição Itaipu, costa central do Brasil. In: MEGGERS, Betty (ed.) *Prehistoria Sudamerica: nuevas perspectivas*. Washington (DC): Smithsonian, 1992. p. 161-176.
- DITTMAR, Katharina. Paleoparasitologia e DNA antigo. In: FERREIRA, Luiz F.; REINHARD, Karl; ARAÚJO, Adauto (org.). *Fundamentos da paleoparasitologia*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2011. p. 287-299.
- FREIRE, Andressa *et al.* It is needless to rehydrate archeological samples to extract ancient DNA. *Parasitology International*, v. 64, n. 5, p. 303-304, 2015.
- GARCIA, Anderson *et al.* Tecnologia lítica e cadeias operatórias no sítio Sambaqui da Prainha. *Habitus*, v. 18, n. 2, p. 562-592, 2020.
- GASPAR, Maria Dulce *et al.* A ocupação sambaqueira no entorno da baía de Guanabara. *Revista de Arqueologia*, v. 32, p. 36-60, 2019.
- GUIMARÃES, Márcia; GASPAR, Maria D.; SCHELL-YBERT, Rita. Da presença de concreções em sambaquis brasileiros: o caso dos sambaquis Boa Vista da Planície Costeira do Rio São João, RJ. *Abequa*, 2005. Disponível em: http://abequa.org.br/trabalhos/0163_resumo_abequa.pdf.
- KNEIP, Lina. O sambaqui de Manitiba e outros sambaquis de Saquarema, RJ. Documento de trabalho Série Arqueologia, n. 5, p. 1-91, 2001. Disponível em: https://obrasraras.museunacional.ufrj.br/o/DTSA_5/COMPLETO_DTSA_N5.pdf.
- KNEIP, Lina m.; MORAIS, José Luiz; CUNHA, Fausto Luiz. The radiocarbon dating of the Sambaqui de Camboinhas. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 53, n. 2, p. 339-343, 1981.
- KNEIP, Lina M.; PALLESTRINI, Luciana; CUNHA, Fausto L. S. (coord.). *Pesquisas arqueológicas no litoral de Itaipu, Niterói, RJ*. Rio de Janeiro: Luna, 1981.
- KUBIAK, Katarzyna *et al.* Identyfikacja molekularna bakterii wyizolowanych z wody Jeziora Biskupińskiego oraz współczesnego drewna dębu i sosny zalegającego w glebie na stanowisku archeologicznym w Biskupinie. *Nauka Przyroda Technologie*, v. 4, n. 6, p. 102, 2010.
- LELES, Daniela *et al.* Recovery of *Toxoplasma gondii* DNA in experimentally mummified skin and bones: prospects for paleoparasitological studies to unveil the origin of toxoplasmosis. *Experimental Parasitology*, v. 168, p. 51-55, 2016.
- LELES, Daniela *et al.* Insights about echinostomiasis by paleomolecular diagnosis. *Parasitology International*, v. 63, n. 4, p. 646-649, 2014.
- LELES, Daniela *et al.* Methodological innovations for the study of irreplaceable samples reveal giardiasis in extinct animals (*Nothrotherium maquinense* and *Palaeolama maior*). *Parasitology International*, v. 67, n. 6, p. 776-780, 2018.
- LOPES, Mariana *et al.* The path towards endangered species: Prehistoric fisheries in Southeastern Brazil. *PLoS ONE*, v. 11, n. 6, e0154476, 2016.
- LUTZ, Adolpho. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações, feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 11, n. 1, p. 121-198, 1919.
- MONTEIRO-NETO, Cassiano *et al.* Associações de peixes na região costeira de Itaipu, Niterói, RJ. *Iheringia, Série Zoologia*, v. 98, n. 1, p. 50-59, 2008.

- MOTA, Marcelo; CAMPOS, Artur; ARAÚJO, Jackson. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 23, n. 3, p. 93-100, 2003.
- OLINDA, Roberio *et al.* Isolamento de *Alcaligenes faecalis* em peixe *Betta splendens* Regan, 1910 no Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 81, n. 4, p. 360-362, 2014.
- POSTH, Cosimo *et al.* Reconstructing the deep population history of Central and South America. *Cell*, v. 75, n. 5, p. 1185-1197, 2018.
- PUCU, Elisa *et al.* Finding the unexpected: a critical view on molecular diagnosis of infectious diseases in archaeological samples. *Journal of Archaeological Science: Reports*, v. 13, p. 666-668, 2017.
- PUCU, Elisa *et al.* Identification of arthropods by polymerase chain reaction as probes for infectious disease studies in experimental coprolites. *Journal of Parasitology*, v. 105, n. 1, p. 133-134, 2019.
- REINHARD, Karl *et al.* Recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. In: FERREIRA, Luiz F.; ARAÚJO, Adauto; CONFALONIERI, Ulisses (ed.). *Paleoparasitologia no Brasil*. Rio de Janeiro: PEC/ENSP, 1988. p. 83-108.
- RITCHER, Kristine *et al.* A primer for ZooMS applications in Archaeology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 119, n. 20, p. e2109323119, 2022.
- RODRIGUES-CARVALHO, Claudia; SCHEEL-YBERT, Rita. Salvamento arqueológico em Duna Grande, Itaipu, Niterói/ RJ. In: REUNIÃO DA SAB-SUDESTE, 4., Rio de Janeiro, 2012. *Anais*. Rio de Janeiro: SAB, 2012. p. 1-x.
- RUFFER, Armand. Note on the presence of *Bilharzia haematobia* in Egyptian mummies of the Twentieth Dynasty (1250-1000). *British Medical Journal*, v. 2557, n. 1, p. 16, 1910.
- SIMÕES, Mario. Coletores-pescadores ceramistas do litoral do Salgado (Pará). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, n. 78, 1981.
- SLON, Viviane *et al.* Neandertal and Denisovan DNA from Pleistocene sediments. *Science*, v. 356, n. 6338, p. 605-608, 2017.
- TERRA, Marcia A. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by polymerase chain reaction in experimentally desiccated tissues. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 2, p. 185-188, 2004.
- TAVARES, Reinaldo. *Cemitério dos Pretos Novos, Rio de Janeiro, século XIX: uma tentativa de delimitação espacial*. 2012. Dissertação (Mestrado em Arqueologia) – Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.
- TIZUKA, Michelle *et al.* Sítios arqueológicos em unidades de conservação, como preservar: o caso da Duna Grande de Itaipu e do sítio sambaqui Camboinhas, Niterói-RJ. In: Seminário de Preservação de Patrimônio Arqueológico, 5., 2019. *Anais...* 2019. p. 87-114. Disponível em: http://site.mast.br/hotsite_vsppa/pdf/secao-2/07-michelle-m-formatado.pdf.
- WANG, Miao *et al.* Effects of probiotics *Bacillus cereus* NY5 and *Alcaligenes faecalis* Y311 used as water additives on the microbiota and immune enzyme activities in three mucosal tissues in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* reared in outdoor tanks. *Aquaculture Reports*, v. 17, p. 100309, 2020.
- WARD, Robert *et al.* DNA arcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions Royal Society Biological Sciences*, v. 360, p. 1847-1857, 2005.
- ZHANG, Huan *et al.* *Salinimonas iocasiae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a polychaete tube in a hydrothermal field. *International Journal of Systemetic and Evolutionary Microbiology*, v. 70, n. 6, p. 3899-3904, 2020.