



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

**UnB**

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

## Diversidade bacteriana associada a culturas de cianobactérias dos recifes de Abrolhos

Carla Simone Vizzotto

Orientador: Dr. Ricardo Henrique Krüger

Brasília, DF  
Dezembro de 2021

*À Naura, uma mistura de força e amor,  
uma potência feminina que me inspira.  
Ao meu dindo, João Celso Rauber.  
Ao meu avô, Aloysio Pedro Rauber  
(in memoriam).*

## Agradecimentos

Esta é a sessão de abertura desta tese por ser uma das mais importantes, senão a mais importante, dentre todas as sessões. A pós-graduação *stricto sensu* tem como um dos objetivos primordiais a formação e aperfeiçoamento de pesquisadores. Cientistas que se aperfeiçoam profissionalmente devido ao apoio e esforços de pessoas e instituições. Ao leitor, é necessário pedir uma 'licença científica', pois não há como tratar de tipo de relação humana com impessoalidade, atributo inerente dos textos científicos.

Inicialmente, agradeço às diversas instituições brasileiras que possibilitaram diretamente a execução de todas as pesquisas desse trabalho. Universidade de Brasília, com seus departamentos de Biologia Celular e Engenharia Civil e Ambiental, dos Institutos de Biologia e Faculdade de Tecnologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, através do Instituto de Microbiologia Paulo Góes. Universidade Federal de Viçosa, com o Departamento de Microbiologia. Universidade Católica de Brasília (UCB), através do Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia. EMBRAPA. Com exceção da UCB, que é filantrópica, todas são instituições públicas. Além do suporte à cada etapa, essas instituições afiliam os pesquisadores idealizadores ou executores de cada experimento aqui apresentado. Pesquisa se faz com instituições fortalecidas.

Agradeço também às instituições de fomento, essenciais para a manutenção da ciência em nosso país. CAPES, CNPq, FAP-DF. Agradeço também ao apoio financeiro do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular IB-UnB e Universidade de Brasília.

Agradeço à *DNA Services Facility, Research Resources Center, University of Illinois, at Chicago, Chicago, Illinois - USA*, pelo apoio com sequenciamento de DNA genômico *NGS Illumina* das duas linhagens de bactérias heterotróficas. Aos Laboratório de Virologia e Fitopatologia pelo apoio para realização do sequenciamento *Oxford Nanopore Technology*. Agradeço ao Laboratório de Microscopia do IB-UnB pela estrutura para a obtenção das imagens em Microscopia Eletrônica de Varredura.

Agradeço às coleções de culturas microbiológicas Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde, CBAS-Fiocruz, e Coleção Brasileira de Micro-organismos, CBMAI-Unicamp, pela disponibilidade para depósito das linhagens bacterianas isoladas nesse trabalho. Agradeço à Coleção de Cultura de Micro-organismos da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela disponibilização dos co-cultivos de cianobactérias. Agradeço à Câmara Setorial da Academia pelo empenho junto às questões relacionadas à legislação de acesso à biodiversidade e SisGen.

Bom, todas as instituições acima citadas foram acessadas através de pessoas, pesquisadores, estagiárias, secretários etc. Passo agora a citar nominalmente cada pessoa relevante para que esse texto fosse concluído. Um pouco de paciência, é superimportante deixar esse registro. Não há como fazer ciência sozinha, mesmo assumindo o risco de deixar pessoas importantes de fora dessa lista por esquecimento causado pela sobrecarga do momento, é necessário deixar esses apontamentos.

Começo a lista com meu orientador e amigo Ricardo Krüger, mais conhecido como 'K.'. Agradeço a confiança de aceitar ser meu orientador sem me conhecer e num momento delicado, que estava se ausentando do país. Agradeço a paciência com meus surtos e todo o conhecimento transmitido, além das oportunidades oferecidas.

Obrigada ao Dr. Stefan Joshua Green pela oportunidade de sequenciamento das minhas 'bichinhas', pelo desafio de se comunicar comigo num inglês péssimo, pela generosidade de atender a cada dúvida, por mais simples que fosse, pela solicitude em cada correção, pelas dicas, encorajamentos e publicações.

Agradeço ao professor Fabiano Thompson tanto pelo apoio com recursos, ideias e esclarecimentos, como pelo seu entusiasmo com a microbiologia marinha. Obrigada também a Juline Walter pelo pioneirismo no trabalho com as cianobactérias dos *turfs* de Abrolhos.

Obrigada ao pesquisador Andrei S. Steindorff pela ajuda a todo momento com bioinformática. Ao professor Marcelo H.S. Ramada pelas análises de espectrometria de massa e toda sua disposição para a publicação dos resultados. Ao professor Marcos R. Totola pela caracterização de ácidos graxos e ajuda com a escrita do *paper*. Ao professor Osmino R. Pires Júnior, pelo apoio com toxinas, carotenoides, conversas, risadas e orientações.

Muitíssimo obrigada à banca avaliadora dessa tese: professora Dra. Manuela da Silva, professor Dr. Diogo Antonio Tschoeke e professor Dr. Gabriel Sergio Costa Alves. As contribuições desse grupo foram muito valiosas e agregaram muito valor ao trabalho. Agradeço também a gentileza de dedicarem seu tempo precioso nessa época delicada que é o final do ano.

Algumas pessoas têm culpa maior pelo meu ingresso no doutorado, jamais as perdoarei pelos meus excessivos cabelos brancos...rsrs... Julianna Peixoto, a primeira delas! Obrigada, super obrigada ou qualquer outra expressão do tipo é pouco para expressar minha gratidão ao seu apoio. Além da sua generosidade em ajudar uma desconhecida, ainda virou uma amiga, incentivadora e parceira de aventuras! My Toddy's! Desde me ajudar na seleção até me convencer de que eu sobreviveria a um congresso nos Estados Unidos, passando pela paciência de me ensinar dicas de PCR e técnicas de limpeza de amplicon, você é a culpada! Muito obrigada mil vezes! E desculpa quando eu comi coxinhas de frango na sua festinha de despedida para o pós-doc. A categoria de 'culpados' também abriga o Pedro, ou talvez o Lombardi, nunca sei direito. Mas foi o parceiro de algumas madrugadas de estudo à distância (ok, ele dormia, mas tentava). Além disso, sempre estava a postos contra as vontades de desistir da empreitada, para o choro quando fui mal na seleção. Ele foi o engenheiro administrador que se dispôs a ler sobre cianobactérias e ainda pesquisou sobre perguntas para fazer. Em outro momento, incentivou a busca por ajuda quando a saúde mental definhou. Muito obrigada!

E foi muita gente maravilhosa que acompanhou essa longa aventura. Maria Regina Sartori, além de companheira de sindicato, também é para todas as lutas. Desde a recepção até a despedida do doc, cá está ela, lendo, ajudando, incentivando, rindo, chorando, brigando... Gina, muito obrigada! Rafa,

meu time! Para todas as horas, risos, choros, agonias, crises de rinite, asma, viagem, trabalhos, compras, tudo! Somos um time, obrigada é pouco para te agradecer. Heleninha, a delicadeza e talento em pessoa, um carinho imenso e toda a atenção quando precisei de ouvidos e de ajuda com o QIME, minha amiga meio-veggie que adora o kranfo. Amo vocês!

Fabyano, meu chefinho! O ser mais paciente da vida para ensinar um ser das cavernas a trabalhar em Linux. Um ser corajoso que topou a missão de ajudar uma pentelha que só parava de infernizar quando as coisas davam certo, sem nenhuma mensagem de erro. Um ser resistente que aceitava ficar até madrugada no lab, porque as coisas precisavam dar certo, não podiam esperar até amanhã. Obrigada pela parceria e ensinamentos.

Raulzito, meu irmão! Meu amigo companheiro e sensível, quando a coisa apertava era ele que me tirava de perto do furacão para não explodir. Eu juro que um dia vou te devolver as células competentes, mas você ainda me deve umas taças de vinho. Renata, a mais serena e sensata daquele lugar. Um amor de pessoa, mais bem-disposta impossível. Até hoje disponível para qualquer dúvida que tenho, sua atenção e sua ajuda foram fundamentais. Muito obrigada! Super Thais, muito obrigada pelo convívio, dicas, risadas, ensinamentos!

A todas e todos os companheiros de jornada, os que vieram mais cedo e os que chegaram por último. Isa, melhor hóspede de todas! Tay, Brendo, Otávio, Phillipe, Gabriel (meu estagiário lindo, talentoso e irmão de fé), João Lucas, Samuca... obrigada a todo o time pela partilha das batalhas! Jéssica, obrigada pela paciência da transmissão e toda ajuda com a apresentação, você foi essencial!

Saindo do nosso lab, mas nem tanto, agradeço em especial minha amiga e parceira de luta diária, incansável e brilhante, Aline! Olha, desde o dia da seleção, o destino no colocou nesse barco (quase furado) de trabalhar com co-cultivos e novas espécies. Mas os desafios valeram a pena! Ver nossa amizade prosperar e nossas conquistas surgirem me alegra e me dá forças. Nem todos os cappuccinos do mundo pagam a ajuda que você me dá e o que representa para mim. Muito obrigada!

Agradeço ao Fernando, pesquisador talentoso, inteligente, bem-disposto, aberto a ensinar e fazer parcerias. Muito obrigada por topar o sequenciamento das minhas bactérias e pela paciência de me ajudar com as análises. Obrigada ao colega e professor Felipe Marques de Almeida, que sempre está disposto a ajudar com as análises estatísticas e bioinformática.

Obrigada a todo o pessoal do nosso 'corredor'. Carol, Guilherme, Jéssica, Laís, Ingrid, Léo, Brenda, Jéssica, Pedro, Gabi. As nossas técnicas Marisia e Margareth e aos professores Eliane, Edivaldo, Bergman, Renato, Tatsuya, Sônia Baó. Agradecimento especial à professora Cynthia, praticamente uma co-orientadora, incentivadora e amiga de boas conversas.

Aos coordenadores que encararam o desafio de segurar a pós, além do meu orientador, Robert, Sônia Freitas e Andreia. Agradeço também à professora Mariana, tutora de curso, sempre atenta e aberta para quaisquer demandas. Agradeço aos professores Dr. Robert Neil Gerard Miller, Dr. Helson Mario Martins do Vale e Dr. Georgios Joannis Pappas Junior pelas contribuições e ajudas na qualificação

e ao longo do trabalho. Da mesma forma, agradeço às professoras Dra. Janice Lisboa De Marco, Dra. Cynthia Maria Kyaw pelas contribuições na qualificação, incentivo e apoio. Obrigada às professoras Dra. Ildinete Silva Pereira e Dra. Lidia Maria Pepe de Moraes pelas conversas e ideias em ensaios com as bactérias.

Obrigada infinito ao meu time LSA, mais do que colegas, são amigas! Começando pela minha neguinha Marci, Afffe maria, nem sei como falar dessa minha irmã! Só sei dizer obrigada porque em todas as horas você está aqui comigo! Obrigada a Sara, a mais bruta de todas, mas que é puro amor por mim e parceria para as labutas diárias no lab. Carlota, minha amiga, vizinha, companheira de axé, bióloga, baiana e minha irmã! Um presentinho de Oxalá para mim, essencial na minha vida!

Meus amigos engenheiros ‘Sobreviventes’ da pandemia, Dani e Matheus. As deusas da programação, rainhas dos gráficos no R e mapas no ArqGiz, cumplicidade e alegria em plenas tristezas da pós-graduação e nas bobagens dos almoços em família. Minha amiga Maria Elisa, a bichinha mais porreta e mais festeira de toda a engenharia, faz uma falta danada nesses dias de afastamento, mas sua energia está sempre nos contagiando. Minha chefe Cristina Brandão, entre tapas e beijos, amor e ódio, somos duas mentes teimosas batendo cabeça, mas nossos braços e corações remam para o mesmo destino. Admiração e orgulho de estar sob a capitania dessa grande mulher.

A lista é grande... é uma vida sustentada por outras pessoas e boas relações estabelecidas! Amigas da Bio, Aline, Sol e Tatá... Muito carinho e muita identidade, mais de 10 anos e a cumplicidade persiste. Tatá, partilhar tudo com você me faz tão bem! Marcelita, minha amiga mais recente, mas que chegou para ficar, dos fracassos para a vida! Não somos *puliça*, mas nossa amizade foi a melhor aprovação de todas. Eu, tu e Andrezito ainda seremos expulsos de muitos restaurantes.

Um obrigada genuíno e generoso ao meu amigo Zé Maria, atento, presente, carinhoso. Nunca houve um mês sem um ‘como você está? Tem tempo para um café?’. Você faz parte das minhas alegrias. Muito obrigada!

Às minhas amigas-irmãs do meu quarteto, Simone, Letícia e Évelin. Uma vida compartilhada e sustentada em família. Obrigada pelo amor, carinho, dedicação, ouvidos e risadas. Obrigada minha amiga-irmã Belinha, se tem algo que faço de bom nessa vida, é amizade. Dia e noite, sempre, são elas com quem eu posso contar. Amor incondicional! Amo vocês!

À minha nova família em Brasília, Cris, Edu, Dudinha, Marcela e Renato, oficializada pelo meu afilhadinho Pedrinho. Tantas risadas, choros, conversas, PRs (de quando a gente ainda era fitness, Edu!), cervejas, petiscos... nem sei como teria sido a caminhada até aqui sem vocês, são parte de tudo isso! Obrigada! E obrigada pelo meu melhor presente: Pedrinho! Cris, Edu tinha razão, viramos melhores amigas S2. Obrigada também a minha fiel Babe Laricota, minha vizinha paciente que está ansiosa por mais um carnaval de comemoração, daqueles de ‘deitar na BR’.

Agradeço à minha família. Minha mãe, incansável, firme, exemplar... que mulher! A você, todas as minhas alegrias. Ao meu padrinho, sem dúvidas o melhor homem desse mundo, amor imensurável

e minha admiração diária pela sua dedicação e amor por nós, pela sua profissão e pela pesquisa. À minha tia Nega, ela nem sabe de tudo que representa para mim, mas além de todo o carinho, teve papel fundamental na minha educação, prova de que educação é tarefa coletiva. Muito obrigada! Minha irmã, Ana Paula, amiga e confidente, entusiasta e apoiadora incondicional, amo você, mana! Apesar de votar num presidente imbecil, mau-caráter, que quer destruir nossa ciência, agradeço ao meu pai, ele é puro amor e admiração por mim e meu amor por ele é genuíno. Ele me surpreende e emociona quando fala, até hoje, o nome da espécie da aranha que trabalhei no mestrado. Um obrigada a tios, tias, primos, primas, muitos amigos próximos, a torcida para que esse documento saísse foi enorme, a quase desistência não vingou por causa disso. Sem palavras para tanto apoio!

Agradeço aos meus afilhados Yasmin, Luiza, Yago e Pedro. Eles representam o motivo pelo qual eu resisti e resisto, vivendo e fazendo ciência.

Agradeço imensamente ao Sr. Altair e à Dra Rosaura, psicólogo e psiquiatra que estavam prontos a me ajudar quando decidi cuidar de mim mesma e recuperar minha saúde mental.

Por fim, deixo um agradecimento irônico, para que eu, pesquisadora, cientista, professora ou qualquer outra pessoa possamos ler no futuro como exemplo a NÃO ser seguido. Agradeço a uma maldita professora do mestrado (sim, fazem muitos anos! E infelizmente não posso deixar registrado o nome dela...) que me deu um recado insolente “Menina, você precisa ser mais resignada, aceitar as coisas como ela são! Você é a menos resignada nessa sala!”. Maldita! Tomara que você tenha se aposentado e não esteja mais tentando influenciar ninguém! A todas essas pessoas aí de cima agradeço por me ensinarem a ser resiliente e não resignada. Aceitar as coisas como ela são não é papel de cientista, não é o meu papel. Hoje, respondo a você com uma tese, boa ou ruim, registro de muito trabalho, que seguirei fazendo; registro que após divulgado torna-se ciência, apta para ser contestada, avaliada, discutida. Seja você uma resignada à sua condição de burguesa safada, que acha que a academia é para poucos! A academia é para muitos, é para todos e essa é a minha batalha. Deixo aqui esse recado para que eu mesma e qualquer um/uma ‘dos meus’ não nos deixemos contaminar pelos títulos ou nos esqueçamos da verdadeira ciência, dos verdadeiros porquês e motivos que temos para seguir.

# Sumário

Agradecimentos.....	iii
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabela.....	xiii
Glossário.....	xiv
Apresentação.....	xvii
Resumo.....	xviii
Abstract.....	xix
Resumo Gráfico.....	xx
Capítulo 1 – Riqueza bacteriana em co-cultivos de cianobactérias de <i>turfs</i> dos recifes de Abrolhos.....	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Revisão bibliográfica.....	2
1.2.1 Contexto ambiental.....	2
1.2.2 As cianobactérias.....	6
1.2.3 A Cianosferas.....	8
1.3 Objetivos.....	10
1.3.1 Objetivo geral.....	10
1.3.2 Objetivos específicos.....	10
1.4 Materiais e métodos.....	11
1.4.1 Origem dos co-cultivos de cianobactérias.....	11
1.4.2 Fluxograma metodológico.....	12
1.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	15
1.4.4 Isolamento de bactérias heterotróficas e identificação através do <i>rRNA</i> 16S.....	15
1.4.5 Extração e purificação de <i>DNA</i> dos co-cultivos de cianobactérias.....	16
1.4.6 Análise do gene marcador molecular <i>rRNA</i> 16S dos co-cultivos de cianobactérias.....	17
1.4.6.1 Biblioteca de clones do <i>rRNA</i> 16S.....	17
1.4.6.1.1 Clonagem.....	17
1.4.6.1.2 Sequenciamento <i>Sanger</i> e análise de dados.....	17
1.4.6.2 Sequenciamento <i>NGS</i> do <i>rRNA</i> 16S e análise de dados.....	18
1.5 Resultados e Discussão.....	20
1.5.1 Diversidade dos co-cultivos de cianobactérias.....	24
1.5.2 Composição bacteriana dos co-cultivos de cianobactérias.....	25
1.5.2.1 Classe <i>Cyanobacteriia</i> .....	29
1.5.2.2 Classe <i>Phycisphaerae</i> .....	30
1.5.2.3 Classe <i>Alphaproteobacteria</i> .....	30
1.5.2.4 Classe <i>Gammaproteobacteria</i> .....	32
1.5.2.5 Classe <i>Bacteroidia</i> .....	34
1.5.2.6 Classe <i>Polyangia</i> .....	35
1.5.2.7 Classe <i>Planctomycetes</i> .....	36
1.5.2.8 Classe <i>Bacilli</i> .....	36
1.5.3 Delineamento de possíveis interações nos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087.....	36
1.6 Conclusões.....	38
Capítulo 2 – Caracterização genômica de bactérias presentes em co-cultivos de cianobactérias dos recifes de Abrolhos.....	39
2.1 Introdução.....	39
2.2 Objetivos.....	40
2.2.1 Objetivo geral.....	40
2.2.2 Objetivos específicos.....	40
2.3. Materiais e métodos.....	41
2.3.1 Fluxograma metodológico.....	41

2.3.2 Isolamento de bactérias heterotróficas .....	42
2.3.3 Extração e purificação de <i>DNA</i> das linhagens K001 e J2 .....	42
2.3.4 Sequenciamento do genoma total das linhagens K001 e J2 .....	42
2.3.4.1 Sequenciamento em plataforma <i>NGS Illumina</i> .....	42
2.3.4.2 Sequenciamento <i>Oxford Nanopore Technologies</i> .....	42
2.3.4.3 Análise de dados e montagem dos genomas .....	42
2.3.5 Banco de dados local (UFRJ - UnB) .....	43
2.3.6 Avaliação da qualidade das montagens de genomas e <i>bins</i> .....	44
2.3.7 Classificação taxonômica baseada em genomas.....	44
2.3.8 Predição de genes e anotação funcional.....	44
<b>2.4 Resultados e Discussão .....</b>	<b>45</b>
2.4.1 Taxonomia baseada em genomas .....	46
2.4.2 Características funcionais dos genomas.....	49
2.4.3 Potencial biotecnológico de cianobactérias e cianosfera.....	58
2.5 Conclusões.....	60
Capítulo 3 – <i>Muricauda brasiliensis</i> K001 sp. nov., uma nova espécie isolada a partir da cianosfera de cianobactérias dos recifes de Abrolhos. ....	61
<b>3.1 Introdução.....</b>	<b>61</b>
<b>3.2 Objetivos .....</b>	<b>62</b>
3.2.1 Objetivo geral .....	62
3.2.2 Objetivos específicos .....	62
<b>3.3 Materiais e métodos .....</b>	<b>63</b>
3.3.1 Fluxograma metodológico.....	63
3.3.2 Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura .....	63
3.3.3 Taxonomia baseada no gene marcador molecular <i>rRNA 16S</i> .....	64
3.3.3.1 Análise do <i>rRNA 16S</i> .....	64
3.3.4 Análises taxonômica baseada em critérios genômicos .....	64
3.3.5 Caracterização fenotípica de <i>Muricauda-K001</i> .....	65
3.3.6 Análise comparativa do perfil proteico de <i>Muricauda-K001</i> .....	67
<b>3.4 Resultados e Discussão .....</b>	<b>68</b>
3.4.1 Taxonomia baseada no gene marcador molecular <i>rRNA 16S</i> .....	69
3.4.2 Taxonomia baseada nos parâmetros <i>OGRI</i> .....	71
3.4.3 Caracterização fenotípica de <i>Muricauda-K001</i> .....	73
3.4.4 Descrição de <i>Muricauda brasiliensis</i> sp. nov. ....	78
3.4.5 A experiência de descrever uma nova espécie de bactéria no Brasil.....	79
<b>3.5 Conclusões .....</b>	<b>86</b>
4 - Perspectivas.....	87
5 - Referências bibliográficas .....	88
6 - Anexos .....	109
6.1 Produção acadêmica durante o doutorado .....	109
6.2 Material Suplementar .....	111

## Índice de Figuras

- Figura 1.1.** Distribuição dos recifes de corais na Terra. Os pontos vermelhos indicam a ocorrência dos bancos recifais nos oceanos. *Fonte: NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) - USA, 26/02/2021, (disponível em <https://oceanservice.noaa.gov/facts/coralwaters.html>) [14]*..... 2
- Figura 1.2.** Chapeirões nos recifes de Abrolhos. **A** – Chapeirão na área do Parcel dos Abrolhos; **B** – Chapeirão na área dos Recifes Califórnia; **C** – Vista área dos chapeirões no Parcel dos Abrolhos; **D** – Panorâmica do topo de um chapeirão nos Recifes Califórnia. *Fotos: Áthila Bertoncini & Fernando Moraes/Rede Abrolhos (disponível em <https://www.nature.com/articles/s41598-018-27961-6>), com adaptações [3]*..... 3
- Figura 1.3.** *Turfs* crescendo sobre corais nos recifes de Abrolhos. *Fotos: Juline Walter (disponível em <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0161168>) [4]*..... 5
- Figura 1.4.** Processo de isolamento de cianobactérias para o estabelecimento de co-cultivos em laboratório. Etapa **A**: passagens sucessórias da cianobactéria para gotas de meio de cultura estéril. Etapa **B**: Fragmentação por ultrassom e disposição em placa de 96 poços com meio de cultura, com o auxílio de citômetro de fluxo - FACS. Etapa **C**: estabelecimento em frascos de cultivos de maior volume (Erlenmeyer de 100mL). Co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087: etapas **A**, **B** e **C**. Cyn011K e NPLJ-4: Etapas **A** e **C**. *Created with BioRender.com* ..... 11
- Figura 1.5.** Mapa indicando os pontos de coletas dos *turfs* dos quais foram isolados os co-cultivos de cianobactérias de Abrolhos avaliados nesse trabalho. Ponto **1**: CCMR0080, CCMR0081 e CCMR0082. Ponto **2**: CCMR0083, CCMR0084 e CCMR0085. Ponto **3**: CCMR0086. Não há informação sobre o ponto de coleta de CCMR0087..... 12
- Figura 1.6.** Fluxograma indicando as metodologias utilizadas para alcançar os resultados apresentados no capítulo 1..... 14
- Figura 1.7.** Co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087 provenientes dos *turfs* de Abrolhos. Em cultivo essas cianobactérias formam um biofilme que cresce aderido ao fundo do frascos e também essas massas filamentosas que permanecem flutuantes..... 16
- Figura 1.8.** Fotomicrografia em sistema de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens **A** e **B** são do co-cultivo CCMR0080. As imagens **C** e **D** são do co-cultivo CCMR0086. Ampliação de 1500x (**A** e **C**) barra branca indicando 10 µm, ampliação de 5000x (**B** e **D**) barra branca indicando 1 µm..... 20
- Figura 1.9.** Árvore filogenética (*Maximum likelihood*) baseada na sequência parcial do gene marcador molecular *rRNA* 16S obtida por clonagem e sequenciamento Sanger. As *OTU* representativas foram obtidas a partir do agrupamento de sequências com similaridade maior que 97%. Os clados estão destacados por cores, indicando as classes do domínio *Bacteria*: Verde – *Cyanobacteriia*, Rosa – *Bacteroidia*, Azul– *Gammaproteobacteria* e Laranja – *Alphaproteobacteria*. O formato dos marcadores indica o co-cultivo de onde foi obtida a sequência clonal: quadrado - CCMR0081, triângulo CCMR0082 e círculo – CCMR0086. A nomenclatura utilizada está baseada em *Silva-DB* v.138. .... 22
- Figura 1.10.** Curva de rarefação dos *reads* gerados pelo sequenciamento *NGS Illumina* do *rRNA* 16S dos co-cultivos das cianobactérias dos *turfs* de Abrolhos CCMR0080 à CCMR0087 (tons de roxo) e dulcícolas Cyn011K e MycISO (tons de verde). A amostragem foi suficiente para estimar a riqueza da comunidade. .... 23

<b>Figura 1.11.</b> Índices de diversidade calculados para os co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087 (tons de roxo), Cyn011K e MycISO (tons de verde), com base nos dados gerados pelo sequenciamento <i>NGS Illumina</i> do <i>rRNA</i> 16S. <b>A</b> – Estimador de riqueza <i>Chao 1</i> ; <b>B</b> Índice de diversidade de <i>Shannon</i> ; <b>C</b> – Índice de diversidade de <i>Simpson</i> (1-D). .....	24
<b>Figura 1.12.</b> Gráfico de barras indicando a abundância relativa (%) das <i>ASV</i> nas classes de <i>Bacteria</i> dos co-cultivos de cianobactérias CCMR0080 à CCMR0087, Cyn011K e MycISO. <b>A</b> – Distribuição das classes abundantes nos co-cultivos, com abundância relativa em relação à soma total de <i>ASV</i> das classes abundantes. <b>B</b> – Distribuição das classes de bactérias raras nos co-cultivos, com abundância relativa referente à soma total de <i>ASV</i> das classes raras. ....	26
<b>Figura 1.13.</b> Gráfico de barras indicando a abundância relativa (%) das <i>ASV</i> nas famílias da classe <i>Alphaproteobacteria</i> dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087. Cada família está representada um tom da cor laranja. A abundância relativa refere-se à soma total de <i>ASV</i> da classe <i>Alphaproteobacteria</i> . ....	31
<b>Figura 1.14.</b> Gráfico de barras indicando a abundância relativa (%) das <i>ASV</i> nas famílias da classe <i>Gammaproteobacteria</i> dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087. Cada família está representada um tom da cor azul. A abundância relativa refere-se à soma total de <i>ASV</i> da classe <i>Gammaproteobacteria</i> . ....	33
<b>Figura 2.1.</b> Fluxograma indicando as metodologias utilizadas para alcançar os resultados apresentados no capítulo 2. ....	41
<b>Figura 2.2.</b> Filograma produzido a partir da sequência total do genoma J2, gerado na plataforma <i>TYGS-DSMZ</i> , indicando o posicionamento taxonômico da linhagem <i>Mameliella-J2</i> , uma nova linhagem da espécie <i>Mameliella alba</i> . ....	47
<b>Figura 2.3.</b> Filograma produzido a partir da sequência total do genoma <i>bin7</i> , gerado na plataforma <i>TYGS-DSMZ</i> , indicando o posicionamento taxonômico da linhagem <i>Marinobacter7</i> . ....	48
<b>Figura 2.4.</b> Classificação das proteínas preditas nos genomas das bactérias dos co-cultivos de cianobactérias de Abrolhos, de acordo com as categorias funcionais <i>COG</i> . <i>Unknow</i> - proteínas não classificadas em nenhuma categoria. Apenas a cianobactéria <i>A turfae80</i> está representada no gráfico. A categoria funcional ( <i>COG</i> ) <i>R</i> aparece apenas nas linhagens <i>A turfae80</i> e <i>A turfae86</i> , com abundância menor que 20 proteínas. ....	50
<b>Figura 2.5.</b> Quantidade de genes codificadores de enzimas relacionadas às diferentes categorias de metabolismo de carboidratos identificadas em cada genoma. Identificação realizada pelo aplicativo <i>dbCAN</i> em busca no banco de dados <i>CAZY</i> . ....	52
<b>Figura 2.6.</b> Distribuição dos genes referentes a reações do ciclo do nitrogênio nos genomas de <i>Methylophaga2</i> , <i>Cytophagia6</i> , <i>Marinobacter7</i> , <i>A. turfae80</i> , <i>A. turfae86</i> , <i>Mameliella-J2</i> e <i>Muricauda-K001</i> . ....	54
<b>Figura 2.7.</b> Mapa metabólico com as reações e enzimas envolvendo o nitrogênio nas células microbianas. Destacado na cor verde estão os genes de enzimas identificados na cianobactéria <i>A. turfae80</i> , a cor laranja representa genes de <i>Mameliella-J2</i> e a cor azul <i>Marinobacter7</i> . As diferentes formas de nitrogênio inorgânico estão representadas por diferentes símbolos na cor vermelha. Figura modificada a partir de imagem disponibilizada na plataforma <i>kegg.jp</i> [194]. ....	55

<b>Figura 3.1.</b> Fluxograma indicando as metodologias utilizadas para alcançar os resultados apresentados no capítulo 3.....	63
<b>Figura 3.2.</b> Fotomicrografias da linhagem <i>Muricauda-K001</i> ao microscópio de luz após coloração de <i>Gram</i> em <b>A</b> e ao microscópio eletrônico de varredura em <b>B</b> (ampliação 6000x), <b>C</b> (ampliação 15000x) e <b>D</b> (ampliação 25000x). Algumas células apresentam um apêndice ( <b>B, C e D</b> ) que não possui um padrão apical ou axial definido, podendo ser prolongado a partir de vários eixos.....	68
<b>Figura 3.3.</b> Árvore filogenética ( <i>Maximum-likelihood</i> ) baseada na sequência do <i>rRNA</i> 16S indicando o posicionamento taxonômico de <i>Muricauda-K001</i> . Os valores de <i>Bootstrap</i> (1000x) maiores que 50% estão apresentados nos ramos. A barra indica 0,05 substituições por nucleotídeo. <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285 foi utilizado como <i>outgroup</i> .....	70
Figura 3.4. Árvore filogenética ( <i>Maximum-likelihood</i> ) baseada em 31 marcadores moleculares proteicos indicando o posicionamento taxonômico de <i>Muricauda-K001</i> . Alinhamento dos aminoácidos realizado com <i>MAFFT</i> , edição com <i>MEGA 7</i> e árvore gerada com o <i>Fasttree</i> . <i>Flavobacterium aquatile</i> foi utilizado como <i>outgroup</i> .....	72
<b>Figura 3.5.</b> Árvore filogenômica gerada pela plataforma <i>on-line</i> <i>TYGZ – DSMZ</i> mostrando o posicionamento taxonômico de <i>Muricauda-K001</i> . A avaliação pelo protocolo automatizado da plataforma indica que <i>Muricauda-K001</i> é uma nova espécie dentro do gênero <i>Muricauda</i> .....	73
<b>Figura 3.6.</b> Perfil cromatográfico da linhagem <i>Muricauda-K001</i> ( <b>A</b> ) mostrando os picos referente a pigmentos carotenoides. Condições da corrida em <i>HPLC</i> : coluna <i>RP-C18 Vydac</i> (218TP54), fase móvel 100% (v/v) MeOH, fluxo 1,0 ml/min. <b>B e C</b> mostram o perfil de absorção no espectro entre 400 e 600 nm dos dois picos apresentados em <b>A</b> . .....	75
<b>Figura 3.7.</b> Cromatografia de camada delgada bi-dimensional apresentando o perfil de lipídios polares total da linhagem <i>Muricauda-K001</i> . PE fosfatidiletanolamina; AL, aminolipídios; L, lipídios polares não identificados. . 77	
<b>Figura 3.8.</b> Dendrograma gerado com os <i>Main spectra profiles</i> ( <i>MSP</i> ) obtidos com <i>Muricauda-K001</i> e <i>DSM 13258</i> ( <i>Muricauda ruestringensis</i> ), com um grupo externo ( <i>Novosphingobium rosa</i> <i>DSM 7285</i> ). Cada <i>MSP</i> é composto por 6 espectros de massa independentes entre 2.000-20.000 m/z. Para a comparação dos <i>MSP</i> , quatro réplicas biológicas foram realizadas. Os <i>MSP</i> de <i>Novosphingobium rosa</i> <i>DSM 7285</i> foram gerados da mesma maneira descrita para <i>Muricauda-K001</i> e <i>DSM 13258</i> . As réplicas de <i>Muricauda-K001</i> e <i>DSM 13258</i> agrupam em clados diferentes, indicando espécies diferentes. A informação também pode ser confirmada pelo score menor do que 2 quando os <i>MSP</i> são comparados no <i>MALDI Biotyper 3.0 software</i> .....	78
<b>Figura 3.9.</b> Árvore filogenética ( <i>Maximum-likelihood</i> ) baseada em 31 marcadores moleculares proteicos indicando o posicionamento de <i>Muricauda-K001</i> entre as espécies descritas para o gênero <i>Muricauda</i> até novembro de 2021. A linhagem <i>Muricauda-K001</i> ( <i>M. brasiliensis</i> ) está marcada pelo ponto rosa. Alinhamento dos aminoácidos realizado com <i>MAFFT</i> , edição no <i>MEGA</i> (v. 7) e árvore gerada com o <i>Fasttree</i> . <i>Flavobacterium aquatile</i> <i>LMG 4008</i> foi utilizada como <i>outgroup</i> . .....	84

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> Linhagens de bactérias heterotróficas isoladas em cultura pura a partir dos co-cultivos de cianobactérias dos <i>turfs</i> de Abrolhos. A classificação e taxonomia apresentada foi obtida pelo <i>RDP-DB</i> . ....	21
<b>Tabela 1.2.</b> Assinatura taxonômica de cada <i>ASV</i> obtida através das análises do sequenciamento <i>NGS Illumina</i> do rRNA16S. A taxonomia das <i>ASV</i> está de acordo com a anotação do <i>Silva-DB 138</i> . ....	28
<b>Tabela 2.1.</b> Estatísticas das montagens dos genomas das linhagens isoladas em cultura pura J2 e K001 e dos genomas montados a partir de DNA metagenômico extraído dos co-cultivos CCMR0080, CCMR0086, <i>bin2</i> , <i>bin6</i> e <i>bin7</i> . (*) dado não identificado na anotação, (-) dado não avaliado. ....	45
<b>Tabela 2.2.</b> Valores de <i>DDH</i> dos genomas <i>cyn80</i> e <i>cyn81</i> das cianobactérias dos co-cultivos CCMR0080 e CCMR0081, respectivamente, com o genoma de <i>Adonisia turfæ</i> (linhagem tipo CCMR0081). Os valores maiores que 70% indicam que as linhagens pertencem a mesma espécie. ....	46
<b>Tabela 2.3.</b> Quantidade e tipos de <i>clusters</i> gênicos referentes ao metabolismo secundário identificados no genoma de cada linhagem. <i>PKS</i> – policetídeo sintases, <i>RiPP</i> – peptídeo ribossomal modificado pós-tradução, <i>NRP</i> – peptídeo não ribossomal, outro – tipo não adequado em nenhuma categoria. ....	58
<b>Tabela 3.1.</b> Características fenotípicas da linhagem <i>Muricauda-K001</i> e linhagens de referências. Linhagens: 1, <i>Muricauda-K001</i> <sup>T</sup> ; 2, <i>M. ruestringensis</i> DSM 13258 <sup>T</sup> (dados de Bruns et al. 2001 e deste trabalho); 3, <i>M. aquimarina</i> SW-63 <sup>T</sup> (dados de Yoon et al. 2005 [234]); 4, <i>M. lutimaris</i> SMK-108 <sup>T</sup> (dados de Yoon et al. 2008 [239]). Dados dos Kits <i>API ZYM</i> e <i>API 20 NE</i> em Yang et al. 2013 [150]; +, Positivo; -, negativo; W, fracamente positivo; ND, sem dado. ....	74
<b>Tabela 3.2.</b> Composição de ácidos graxos (%) da linhagem <i>Muricauda-K001</i> e espécies correlatas. Linhagens: 1, <i>Muricauda-K001</i> <sup>T</sup> ; 2, <i>M. ruestringensis</i> DSM 13258 <sup>T</sup> ; 3, <i>M. aquimarina</i> SW-63 <sup>T</sup> ; 4, <i>M. lutimaris</i> SMK-108 <sup>T</sup> . Dados de <i>Muricauda-K001</i> <sup>T</sup> e DSM 13258 <sup>T</sup> foram gerados nesse trabalho; dados das demais linhagens foram gerados por Yang et al. 2013 [150]. A tabela apresenta os ácidos graxos com abundância >5% em relação ao total de ácidos graxos. ....	76
<b>Tabela 3.3.</b> Hibridização digital do <i>DNA (dDDH)</i> entre o genoma de <i>Muricauda-K001</i> e as espécies descritas para o gênero <i>Muricauda</i> até novembro de 2021. ....	85

## Glossário

°C — Grau Celsius

µm — Micrômetro

**AA** — Enzimas para atividades auxiliares

**Acineto** — Célula diferenciada de cianobactérias filamentosas, célula germinativa que pode originar novos filamentos em condições ambientais favoráveis

**Algas** — Termo genérico, usado nesse trabalho para referir-se a organismos fotossintetizantes que não são plantas

**ANI** — *Average Nucleotide Identity* (Identidade Média de Nucleotídeos)

**ASV** — *Amplicon Sequence Variants*

**Não-axênica** — Cultura com mais de um micro-organismo

**Bactérias heterotróficas** — Nesta tese refere-se a todos os micro-organismos do domínio *Bacteria* exceto cianobactérias; independentemente de sua capacidade de realizar fotossíntese anoxigênica ou quimiossíntese

**Bacterioplâncton** — Conjunto de bactérias heterotróficas na coluna d'água

**Bentônico** — Refere-se a organismos sésseis que ocupam o substrato marinho ou de corpos d'água

**Bin** — Genoma montado a partir de dados de sequenciamento metagenômico

**Blooms** — Crescimento rápido de cianobactérias ou algas

**CAZymes** — *Carbohydrate Active Enzymes* (Enzimas Ativas em Carboidratos)

**CBM** — *Carbohydrate Binding Module* (Módulo de Ligação a Carboidratos)

**CCMR0080 à CCMR0087** — Refere-se ao conjunto de co-cultivos de cianobactérias isoladas a partir dos *turfs* de Abrolhos: CCMR0080, CCMR0081, CCMR0082, CCMR0083, CCMR0084, CCMR0085, CCMR0086 e CCMR0087

**CDS** — *Coding Sequences* (Sequências Codificadoras)

**Cianosfera** — Conjunto de bactérias que se encontra sob a área de influência da cianobactéria

**Co-cultivo** — Refere-se às culturas de cianobactérias, que não são puras, objeto de estudo nesse trabalho

**COG** — *Clusters of Orthologous Groups* (Grupos de Ortólogos)

**CRISPR** — Enzima que reconhece pequenas sequências palindrômicas complementares no DNA

**Cyn011K** — Linhagem 011K de cianobactéria do gênero *Cylindrospermopsis*

**DMS** — Dimetilsulfeto

**DMSO** — Dimetilsulfóxido

**DNA** — *Deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

**Epibiontes** — Bactérias que vivem junto ou sobre outro organismo/cianobactéria

**FACS** — *Fluorescence Activated Cell Sorting*

**Ficosfera** — Conjunto de micro-organismos que se encontra sobre a área de influência de algas

**Fotossíntese anoxigênica** — Processo de fixação de carbono com uso de energia luminosa que não utiliza a água como doador de elétrons, não libera O<sub>2</sub>

**Fotossíntese oxigênica** — Processo de fixação de carbono utilizando energia luminosa que tem a água como doadora de elétrons, libera O<sub>2</sub>

**g** — Grama, unidade de medida de massa

**GC(%)** — Conteúdo GC, proporção de guanina e citosina em sequências de DNA

**GH** — Glicosil hidrolase

**GT** — Glicosil transferase

**Heterocito** — Células diferenciada de cianobactérias filamentosas, especializada na fixação de nitrogênio

**Holobionte** — Conjunto formado por um hospedeiro e seu microbioma, constituem uma entidade ecológica funcional (exemplos: corais e esponjas)

**KEGG** — *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

**L** — Litro, unidade de medida de volume

**LPSN** — *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (Lista de Nomes Procarióticos com Base na Nomenclatura)

**MALDI-TOF** — *Matrix assisted laser desorption/ionization – Time of flight* (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – Tempo de voo)

**MEV** — Microscopia Eletrônica de Varredura

**Microecossistemas** — Neste trabalho, refere-se ao conjunto cianobactérias + cianosfera, que podem ser encontrados no ambiente natural ou em laboratórios na forma de co-cultivos

**MS** — *Mass Spectrometry* (Espectrometria de massa)

**MSP** — *Main spectra profiles* (Perfis de espectros principais)

**MycISO** — Linhagem re-isolada a partir da linhagem NPLJ-4 da cianobactéria do gênero *Microcystis*.

**NCBI** — *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos)

**GenBank** — Base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos)

**NGS Illumina** — *Next Generation Sequencing* (Sequenciamento de nova geração em plataforma *Illumina*)

**nm** — Nanômetro

**NPLJ-4** — Linhagem NPLJ-4 da cianobactéria do gênero *Microcystis*.

**OGRI** — *Overall Genome Related Index*

**ONT** — *Oxford Nanopore Technologies*

**OTU** — *Operational Taxonomic Unit* (Unidade taxonômica operacional)

**p/v** — Relação peso/volume

**pb** — Pares de bases

**PCR** — *Polymerase chain reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

**PL** — Polissacarídeo liase

**Porolithon pachydermum** — *Eukaryota*. Reino: *Plantae*; Sub-reino: *Biliphyta*; Filo: *Rhodophyta*; Filo: *Eurhodophytina*; Classe: *Florideophyceae*; Subclasse: *Corallinophycidae*; Ordem: *Corallinales*; Família: *Porolithaceae*; Subfamília: *Porolithoideae*; Gênero: *Porolithon* (Alga vermelha) [1]

**RDP-DB** — *Ribosomal Database Project da Michigan State University - USA*

**RNA** — *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)

**RP-HPLC** — *Reversed-phase High-performance liquid chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa)

**rRNA** — *Ribosomal-RNA* (RNA ribossomal)

**Scleratinia** — *Eukaryota*. Reino: *Animalia*; Filo: *Cnidaria*; Classe: *Anthozoa*; Subclasse: *Hexacorallia*; Ordem: *Scleratinia* (Coral duro) [2][2][2][2]

**Silva-DB** — *Silva-High quality ribosomal RNA database* (Banco de dados de rRNA 16S)

**tmRNA** — *Transfer-messenger-RNA* (RNA transferência)

**tRNA** — *Transfer-RNA* (RNA transportador)

**Turf** — Etimologia: do francês '*touffe*' (tufo), conjunto de algas e micro-organismos que cresce sobre um substrato formando tufos

## Apresentação

Essa tese teve sua concepção iniciada dentro dos esforços do projeto 'Estruturação de uma Rede de Pesquisa em Biotecnologia Marinha' fomentado pelo CNPq (Chamada MCTI/CNPq/FNDCT - Ação Transversal Nº 63/2013). A instituição da rede BIOTECMAR agregou várias universidades, instituições de pesquisas e empresas do país com o intuito de conhecer, acessar, explorar e preservar os recursos do mar, diante da imensidão da costa brasileira. O grupo de microbiologia, genômica e pós-genômica do laboratório de Enzimologia-CEL/IB da UnB, sob coordenação do professor Ricardo H. Krüger, constituiu uma das sub-redes responsáveis pelo estudo de comunidades microbianas, mapeamento de genes, vias metabólicas e atividades de interesse biotecnológico.

O desenvolvimento de novos produtos bioativos e biotecnologia demandam longos processos, que se iniciam necessariamente na caracterização da biodiversidade de ecossistemas e avaliação de seu potencial biotecnológico. No Brasil, antes da geração de qualquer nova tecnologia ou benefício econômico, o maior impacto de qualquer projeto de pesquisa nessa categoria é apurar a riqueza constituinte dos variados ambientes de estudo.

Esse trabalho contribui com a caracterização da comunidade bacteriana presente em culturas de cianobactérias formadoras de *turfs* nos recifes de Abrolhos. A pesquisa utiliza ferramentas de microbiologia básica, biologia molecular, sequenciamentos de DNA e bioinformática para descrever a composição e características de co-cultivos de cianobactérias isoladas a partir dos *turfs* de Abrolhos. Os resultados aqui alcançados estão organizados em 3 capítulos que apresentam conhecimento sobre frações em cultivo de micro-organismos abundantes nos recifes de Abrolhos, cujo papel ecológico não está completamente esclarecido. Apesar de apresentar-se como uma questão relacionada a desequilíbrio e impactos antrópicos, as dinâmicas dos *turfs* em Abrolhos ainda não está elucidada. Este trabalho compartilha detalhes sobre micro-organismos que compõem essa formação, especificamente sobre a identidade e aspectos da relação de bactérias heterotróficas associadas a cianobactérias. Assim, ao mesmo tempo que contribui para a microbiologia e taxonomia com a caracterização de micro-organismos, amplia informações sobre sua genética e relaciona isso à dinâmica populacional e possíveis aplicações biotecnológicas.

Mesmo com essa pesquisa detalhada sobre a pequena parcela em cultivo de micro-organismos que fazem parte de um contexto ambiental complexo, essa tese não exaure o conhecimento existente em cada um daqueles frascos de cultura. Para cada apontamento, existe uma infinidade de hipóteses a serem avaliadas. Dessa forma, para além de qualquer abordagem específica, o conteúdo dessa tese reforça que não existem formas de desvencilhar pesquisa básica, questões ambientais, desenvolvimento e suas consequências.

## Resumo

Os recifes de corais de Abrolhos são um *hot spot* de biodiversidade no Atlântico Sul. Assim como em outros recifes de corais, formações denominadas *turfs* tem predominado em seu ambiente bentônico. Os *turfs* de Abrolhos são formados predominantemente pela associação de cianobactérias e bactérias heterotróficas e as consequências de sua prevalência ainda não estão completamente elucidadas. A associação entre bactérias heterotróficas e cianobactérias no ambiente marinho tem papel relevante nos principais ciclos biogeoquímicos e seus efeitos são globais. Esses micro-organismos evoluem dentro de comunidades complexas. As interações entre a microbiota influenciam e podem ser influenciadas pelo ambiente. Nesse contexto, co-cultivos de cianobactérias e bactérias heterotróficas isolados a partir dos *turfs* dos recifes de Abrolhos e disponíveis em coleções de cultura foram utilizados para a avaliação detalhada desses micro-organismos. Os objetivos do estudo abrangeram a determinação da riqueza bacteriana associada às cianobactérias da espécie *Adonisia turfae*; avaliação taxonômica e funcional do genoma das cianobactérias e bactérias heterotróficas presentes nos co-cultivos; isolamento de bactérias heterotróficas e caracterização de linhagens identificadas como novas espécies. A metodologia abordada foi sequenciamento *Next Generation Sequencing - Illumina (NGS Illumina)* do marcador *rRNA 16S*, sequenciamento genômico e metagenômico total (*NGS Illumina* e *Oxford Nanopore Technologies - ONT*), isolamento e caracterização fenotípica de bactérias heterotróficas em cultura pura. A riqueza e diversidade dos co-cultivos foi similar, em hierarquia taxonômica alta, a outros co-cultivos de *Cyanobacteria*, com *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Bacteroidetes* como classes abundantes. *Phycisphaerae* foi a peculiaridade dos co-cultivos, abundantes nos co-cultivos de Abrolhos e não relatada como tal para outras culturas de cianobactérias. A análise dos genomas identificou o potencial metabólico dos micro-organismos para a fixação e redução dissimilatória de nitrogênio, abundância de enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, fotossíntese oxigênica e anoxigênica, abundância de enzimas relativas ao ciclo no fósforo e enxofre e alto potencial para a produção de metabólitos secundários. Uma nova espécie de bactéria foi isolada em cultura pura e depositada em coleções de cultura filiadas à *World Federation for Culture Collections*. A descrição formal da espécie *Muricauda brasiliensis* foi publicada no *Brazilian Journal of Microbiology*. A espécie *M. brasiliensis* consta com nomenclatura ainda não validada pelo *International Code of Nomenclature of Prokaryotes (ICNP)*. Esse estudo apresenta detalhes sobre a composição e contribuição bacteriana nos *turfs* dos recifes de corais de Abrolhos, colaborando para a compreensão do papel dessa formação bentônica naquele ambiente. O trabalho também contribui para a caracterização da microbiota bacteriana associada às cianobactérias, seus padrões de riqueza, diversidade e possíveis características relacionadas a essa intrínseca associação. O trabalho tem relevância para a prospecção biotecnológica de produtos de origem marinha e fornece dados para estudos futuros relacionados à taxonomia, ecologia e conservação da biodiversidade de ambientes complexos como os recifes de corais.

## Abstract

The Abrolhos reefs (Brazil) are a biodiversity hot spot in the South Atlantic Ocean. Turfs from Abrolhos are predominantly formed by the association of cyanobacteria and heterotrophic bacteria. As in other coral reefs, turfs are the predominant benthic component. However, the consequences of their prevalence are not yet fully understood. The relationship between heterotrophic bacteria and cyanobacteria in the marine environment plays a relevant role in the main biogeochemical cycles with global effects. These microorganisms evolve within complex communities and the interactions between the different microbiota components influence and can be influenced by the environmental conditions. In this context, co-cultures of cyanobacteria and heterotrophic bacteria obtained from the turfs of Abrolhos reefs and available in culture collections were used for a detailed evaluation of these microorganisms. The objectives of the study were the determination of bacterial richness associated with cyanobacteria *Adonisia turfae*; taxonomic and functional assessment of the genomes of cyanobacteria and heterotrophic bacteria present in co-cultures; isolation of heterotrophic bacteria and characterization of strains identified as new species. The methodology approaches were Next Generation Sequencing - Illumina (NGS Illumina) sequencing of 16S rRNA gene marker, genomic and metagenomic DNA sequencing (NGS Illumina e Oxford Nanopore Technologies - ONT), isolation, and phenotypic characterization of heterotrophic bacteria in pure culture. The richness and diversity of co-cultures were similar, in a high taxonomic hierarchy to other *Cyanobacteria* co-cultures with *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and *Bacteroidetes* as abundant classes. *Phycisphaerae* class were unique to microecosystems that were abundant in Abrolhos co-cultures but not reported as such for other cyanobacterial cultures. The bacterial genome analysis identified the metabolic potential for the nitrogen fixation, dissimilatory nitrate reduction, high quantity of carbohydrate active enzymes, oxygenic and anoxygenic photosynthesis, abundant enzymes related to phosphorus and sulfur cycle and high potential for production of secondary metabolites. A potential new species of bacteria was isolated in pure culture and deposited in a culture collection affiliated to World Federation of Culture Collections (WFCC). The formal description of *Muricauda brasiliensis* species was published in the Brazilian Journal of Microbiology. *M. brasiliensis* is the nomenclature not yet validated by the International Code of Nomenclature of Prokaryotes (ICNP). This study presents details about the bacterial composition of the turfs from Abrolhos coral reefs. Furthermore, it contributes to understand the role of turf benthic formation in that environment. The work also increases the characterization of the bacterial microbiota associated with cyanobacteria, their richness and diversity patterns, and possible characteristics related to this intrinsic association. Finally, this study is relevant to the biotechnological prospection of marine products and provides data for future taxonomy, ecology, and biodiversity studies in complex environments such as coral reefs.

# Resumo Gráfico

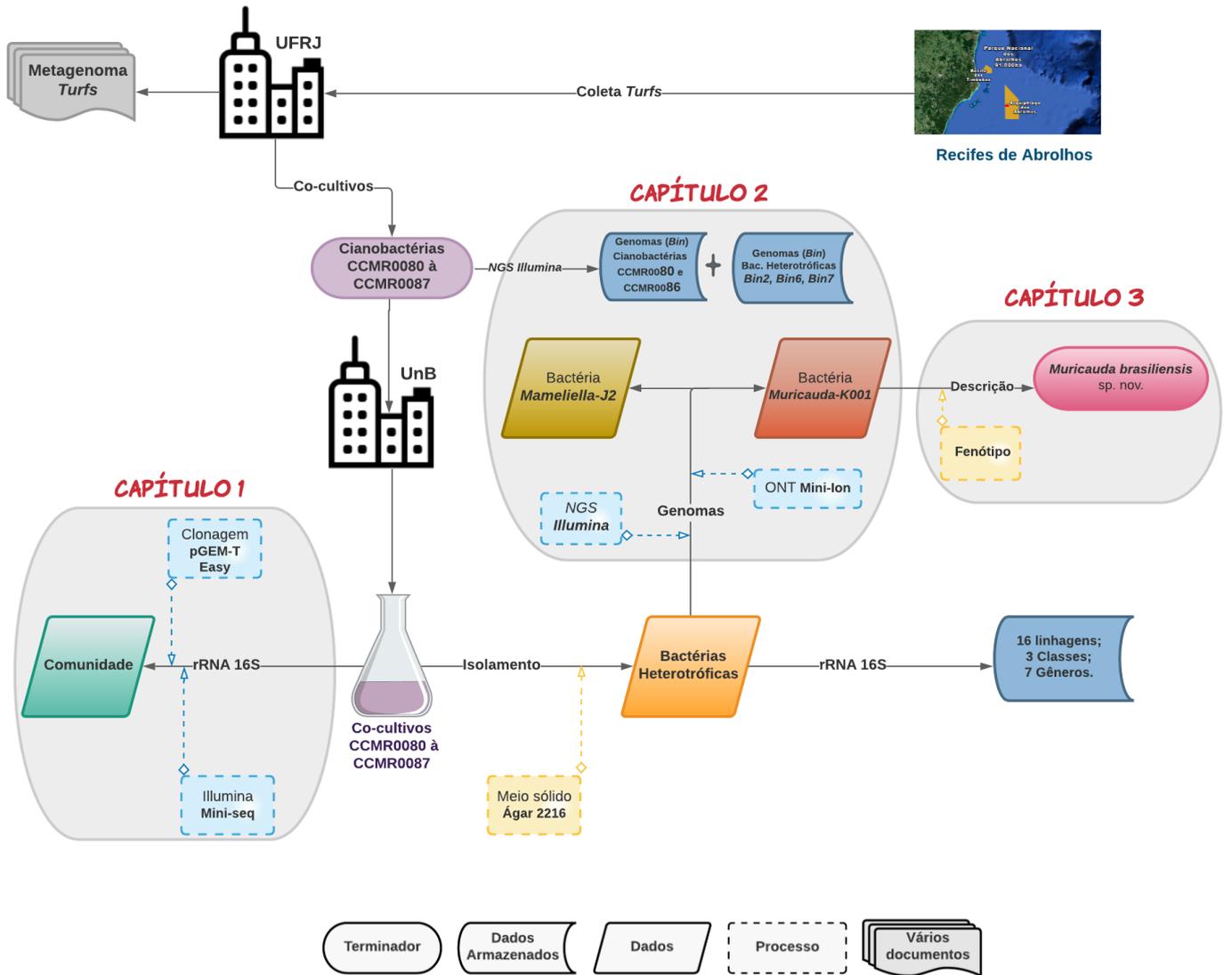


Figura I. Fluxograma de trabalho com as principais etapas de trabalho apresentadas nessa tese.

# Capítulo 1 – Riqueza bacteriana em co-cultivos de cianobactérias de *turfs* dos recifes de Abrolhos

## 1.1 Introdução

As culturas de cianobactérias podem revelar muito mais do que a complexidade própria desses micro-organismos. Cada frasco de cultivo pode conter um microecossistema rico onde a diversidade fornece indícios sobre a fisiologia, interações e ecologia da comunidade.

Os recifes de Abrolhos, costa da Bahia e Espírito Santo – Brasil, guardam a maior biodiversidade marinha do atlântico sul [3]. Assim como outros recifes de corais, Abrolhos também experimenta a dominância de formações bentônicas de crescimento rápido, dentre elas os *turfs*, uma associação de cianobactérias, algas e outros micro-organismos [4,5]. O efeito desse fenômeno, conhecido como ‘mudança de fase’ ou ‘*phase-shift*’, em recifes ao redor do mundo é devastador. Porém, no banco de Abrolhos os *turfs* parecem ter uma simbiose positiva com algumas espécies de corais da ordem *Scleractinia*.

Culturas de cianobactérias isoladas a partir dos *turfs* dos recifes de Abrolhos estão disponíveis na coleção de micro-organismos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CCMR-UFRJ). Inicialmente classificadas como *Leptolyngbya*-like, as análises morfológicas, fisiológicas e genômicas das linhagens comprovaram tratar-se de linhagens de uma nova espécie, descrita como *Adonisia turfae* por Walter et al 2020 [6], segundo classificação proposta por Walter et al 2017 [7]. Assim como a maioria das cianobactérias, mesmo após extenso processo de isolamento, as linhagens CCMR0080 à CCMR0087 (CCMR0080 à CCMR0087) não são culturas puras [6]. E justamente por apresentarem-se como co-cultivos, investigá-los permite a determinação dos micro-organismos mais estreitamente associados a essas cianobactérias, podendo direcionar inferências sobre suas interações e contribuições no contexto ambiental de Abrolhos. Além disso, aprofundar o conhecimento sobre esses co-cultivos determina um panorama geral sobre seu potencial biotecnológico, atributo inerente à biodiversidade.

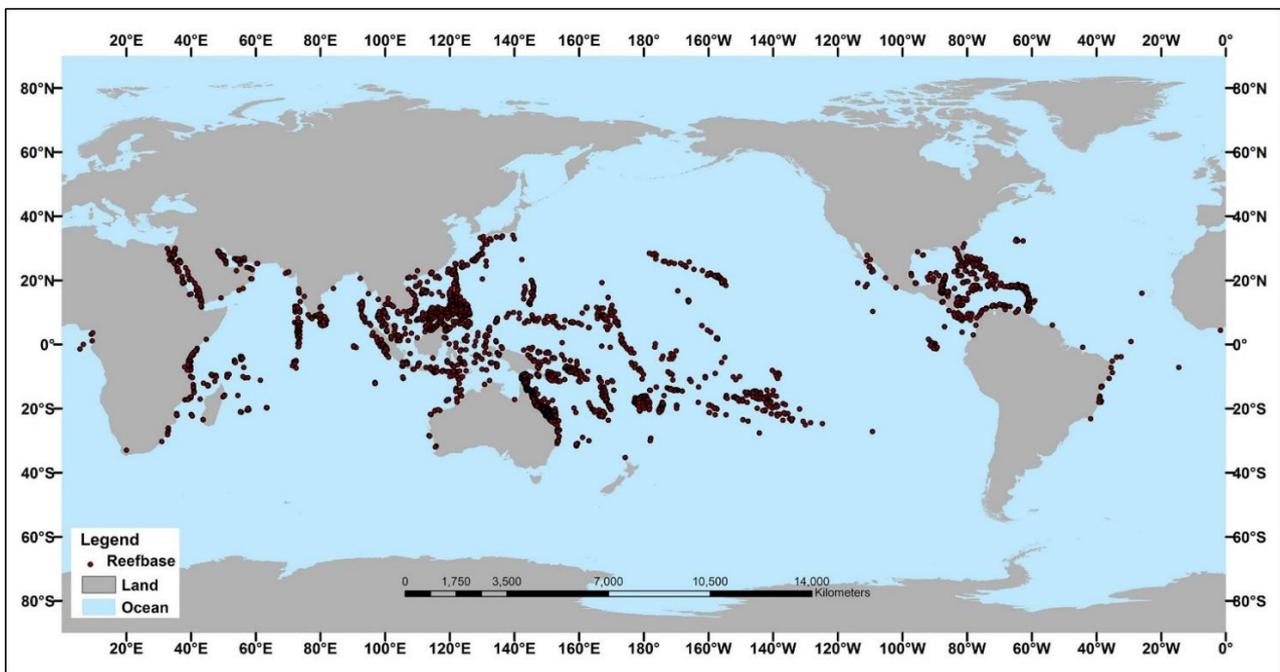
O alinhamento das ferramentas de análises moleculares com as técnicas clássicas de cultivo representa o cenário ideal de trabalho na Microbiologia. Essas estratégias serão utilizadas em paralelo para identificar as espécies de bactérias intimamente associadas às cianobactérias de Abrolhos. Assim, espera-se preencher mais uma lacuna na compreensão desses microecossistemas complexos e ainda pouco explorados.

## 1.2 Revisão bibliográfica

### 1.2.1 Contexto ambiental

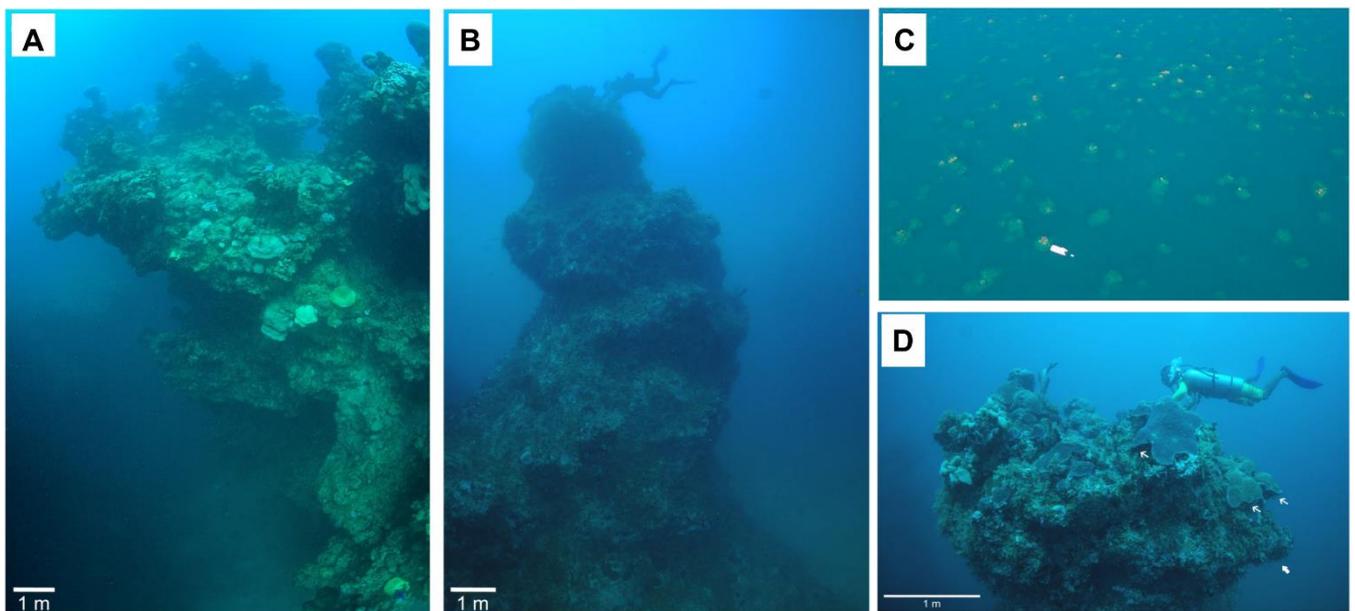
Os recifes são estruturas rochosas formadas por organismos que possuem esqueletos calcáreos, sendo os corais os mais conhecidos deles [8]. Os recifes são popularmente conhecidos como ‘recifes de corais’ porque é comum que sua formação ocorra pela sobreposição dos esqueletos de colônias desses animais. Em alguns recifes a principal contribuição para sua formação vem de algas calcáreas. No Brasil, existe como exemplo o Atol das Rocas, onde a principal espécie responsável pela deposição calcárea é a alga vermelha *Porolithon pachydermum* [9].

Os recifes de corais apresentam distribuição limitada geograficamente no planeta, com ocorrência restrita à região tropical e baixas latitudes (Figura 1.1) (<30° N/S), devido à extrema sensibilidade desses organismos a variações de temperatura, salinidade, pH, turbidez e luminosidade [8,10,11]. Esses ambientes são áreas de altíssima biodiversidade, abrigando um número grande de espécies animais, vegetais e micro-organismos. Portanto, os recifes possuem importância não só ecológica, mas contribuem também para a sustentação dos municípios e estados adjacentes através de atividades como a pesca, turismo, proteção da costa e uso de seus produtos [8,12]. Esforços globais são dedicados a entender a dinâmica, funcionamento, degradação, impactos de eventos naturais e antrópicos nos ambientes recifais. Dentre outras questões, os recifes de corais estão entre os ecossistemas mais afetados pelo aquecimento global [13].



**Figura 1.1.** Distribuição dos recifes de corais na Terra. Os pontos vermelhos indicam a ocorrência dos bancos recifais nos oceanos. Fonte: NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) - USA, 26/02/2021, (disponível em <https://oceanservice.noaa.gov/facts/coralwaters.html>) [14].

No Brasil, as formações recifais podem ser encontradas em aproximadamente 3000 km da costa, desde o Maranhão (Parcel de Manuel Luís) até o Espírito Santo (Ilha de Trindade), podendo se estender em alguns bolsões em direção ao estado de Santa Catarina, e em regiões do talude (águas profundas) [8]. Os principais eventos ao longo do tempo geológico que tiveram influência sobre a formação dos recifes de corais brasileiros foram as flutuações do nível do mar e os processos erosivos. Ambos os fenômenos contribuíram para a condição de maior turbidez na água, devido à quantidade de sedimentos siliclásticos [5,9,15]. As variações na coluna d'água também expunham os corais a condições mais severas de temperatura, luminosidade e radiação. Essas características são atribuídas como responsáveis, ao menos em parte, pelas peculiaridades dos recifes de corais no Brasil. A fauna coralínea do país conta com um pequeno número de espécies de corais (28 espécies, em 2016) em comparação com outros locais (ex: 65 espécies no Caribe, 605 espécies nas Filipinas e Ilhas Salomão) [11,13]. Porém, os recifes brasileiros apresentam alto grau de endemismo, com aproximadamente 50% das espécies de corais sendo endêmicas. Além disso, formas recifais denominadas chapeirões, encontrados nos recifes de Abrolhos, são únicas. Os chapeirões são tipos de crescimento dos corais que formam colunas, assemelhando-se ao formato de cogumelos (Figura 1.2) [9,15].



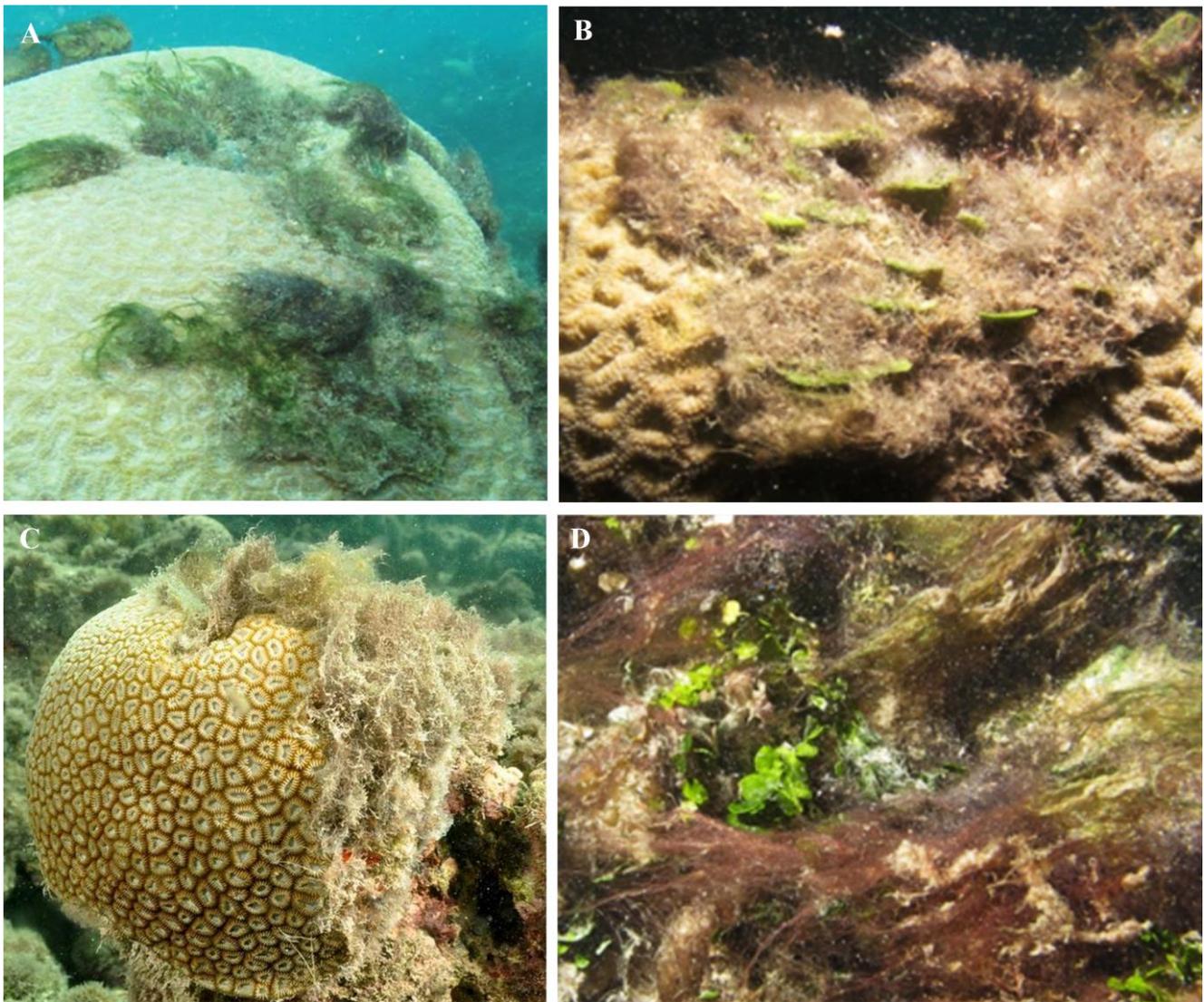
**Figura 1.2.** Chapeirões nos recifes de Abrolhos. **A** – Chapeirão na área do Parcel dos Abrolhos; **B** – Chapeirão na área dos Recifes Califórnia; **C** – Vista área dos chapeirões no Parcel dos Abrolhos; **D** – Panorâmica do topo de um chapeirão nos Recifes Califórnia. Fotos: *Áthila Bertoncini & Fernando Moraes/Rede Abrolhos* (disponível em <https://www.nature.com/articles/s41598-018-27961-6>), com adaptações [3].

Dentre os recifes brasileiros, o mais conhecido e estudado é o complexo recifal de Abrolhos, situado ao litoral sul da Bahia e ao norte do Espírito Santo. O banco dos Abrolhos abriga a maior biodiversidade do Atlântico Sul, sendo composto por diversos ecossistemas costeiros e marinhos; como mangues, estuários, bancos de algas, rodolitos e recifes coralíneos [8,13]. Nessa região foi

estabelecido o primeiro parque nacional marinho do Brasil, PARNA MAR Abrolhos. A unidade de conservação foi criada por decreto federal nº 88.218 em 06 de abril de 1983 e possui a extensão de 87.943 hectares, com áreas delimitadas para diversos tipos de uso, inclusive áreas intactas [3]. As principais pressões poluidoras nesse ambiente são a pesca, a exploração de petróleo em bacias próximas, os sedimentos advindos do continente, aumento da carga de nutrientes devido a atividades antrópicas, turismo e o aumento na temperatura da água [5,13,16,17].

O fenômeno conhecido como ‘mudança de fase’ (*Phase shifts*) é uma das questões ambientais monitoradas nos recifes de Abrolhos e demais recifes ao redor do mundo [12]. A competição por espaço é uma das principais relações biogênicas estabelecidas em recifes de corais. A maioria dos seres bentônicos são capazes de produzir substâncias químicas que inibem o crescimento ou matam os competidores, garantindo sua sobrevivência [17]. Porém, vários fatores acabam influenciando nessa disputa por locais de fixação e crescimento, sendo que os organismos sésseis de crescimento mais lento, como os corais, são menos favorecidos. A ‘mudança de fase’ ocorre quando a dinâmica dessa competição é alterada de tal forma que as macroalgas e as associações denominadas de *turfs* (formações bentônicas em forma de tufo) acabam predominando no espaço [18]. Esses organismos são fotoautotróficos, menos sensíveis às variações de temperatura, possuem crescimento rápido e são favorecidos também pelo aumento de nutrientes nos oceanos. Esse conjunto de características leva algas e *turfs* a ocuparem os espaços dos corais nos recifes (Figura 1.3). Esses seres de crescimento rápido competem por espaço no substrato, podem causar morte por sufocamento ao crescer sobre os corais ou ainda provocar intoxicação devido à produção de toxinas. As cianobactérias e microorganismos que formam os *turfs* ganham destaque nessa competição devido ao seu grande potencial para a produção de metabólitos secundários tóxicos. Esse conjunto de características leva algas e *turfs* a ocuparem os espaços dos corais nos recifes [4,17].

Em pesquisa realizada nos recifes de Abrolhos entre os anos de 2003 e 2008, identificou-se que 56,1% dos organismos bentônicos nos pontos amostrados eram *turfs*. Os autores destacam que houve aumento dessa cobertura durante o período de estudo. Uma forte correlação positiva entre a cobertura de *turfs* e corais da ordem *Scleratinia* foi observada. Correlação não implica necessariamente em causalidade, mas tal fato chama a atenção por ser contrastante com o potencial deletério dos *turfs* em outros recifes, a exemplo da Jamaica onde a cobertura dos corais foi reduzida em até 50% [5,18]. Os dados de monitoramento do PARNA MAR Abrolhos do período de 2018 a 2020 mostram que os *turfs* também são a cobertura bentônica predominante dentro da unidade de conservação. [19].



**Figura 1.3.** *Turfs* crescendo sobre corais nos recifes de Abrolhos. Fotos: *Juline Walter* (disponível em <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0161168>) [4].

Uma investigação minuciosa sobre a composição dos *turfs* de Abrolhos foi realizada em 2013 [5]. A análise microscópica revelou que uma malha de cianobactérias filamentosas com algas vermelhas (*Florideophyceae*), verdes (*Bryopsis* sp., *Halimeda* sp. e *Ulvophyceae*) e marrons (*Dictyota* sp. e *Phaeophyceae*) incrustadas formavam a estrutura dos *turfs* [4]. O perfil taxonômico e aspectos funcionais dessas formações bentônicas foram acessados através de seus metagenomas. Em média, 85,92% das sequências anotadas foram atribuídas ao domínio *Bacteria*; sendo *Proteobacteria* (40,57%), *Cyanobacteria* (35,04%) e *Bacteroidetes* (11,12%) os táxons predominantes no microbioma. Apenas 5,78% das sequências foram anotadas como domínio *Eukarya*, enquanto os vírus e *Archaea* somaram menos de 1% das sequências [4]. Os principais subsistemas funcionais identificados foram aqueles relacionados ao metabolismo de carboidratos; aminoácidos e derivados; proteínas; co-fatores, vitaminas, pigmentos e grupos protéticos; e RNA. Com relação à energia e fixação de carbono nos *turfs*

foram encontrados genes relacionados à fotossíntese oxigênica, fotossíntese anoxigênica e quimiolitotrofia. Os metagenomas dos *turfs* foram comparados a metagenomas da água, corais e rodolitos, comprovando-se sua composição típica, diferenciada desses componentes ambientais [4].

A partir do trabalho de Walter et al (2016) [4] cianobactérias filamentosas presentes nos *turfs* foram isoladas, formando cultivos a partir de um único filamento/fragmento de cianobactéria e depositados nas coleções de culturas de micro-organismos da UFRJ e Fiocruz. As culturas na verdade são co-cultivos porque, apesar de apresentarem apenas uma espécie de cianobactéria, possuem bactérias associadas, situação comum a culturas de cianobactérias. A disponibilidade dessas linhagens permite o estudo detalhado de características desses micro-organismos, contribuindo para o entendimento de seus papéis no contexto ambiental dos *turfs*, suas relações ecológicas e o impacto em sistemas recifais.

### 1.2.2 As cianobactérias

As cianobactérias são micro-organismos de papel relevante nos ciclos biogeoquímicos atuais e nas transformações geoquímicas ao longo da história da Terra [20]. Dentre os procariontes, esse é o único grupo capaz de realizar fotossíntese aeróbia, sendo considerado o progenitor dos cloroplastos dos eucariotos. Elas contribuem fortemente para a produção primária global, além de serem as principais fixadoras de nitrogênio e produzirem metabólitos secundários únicos [21–24].

As evidências fósseis e moleculares apontam para a presença das cianobactérias na Terra há mais de 3 bilhões de anos [25,26]. A capacidade desses micro-organismos em usar a água como doadora de elétrons no processo fotossintético, resultando assim na liberação de oxigênio, revolucionou o processo evolutivo da vida no planeta. As cianobactérias foram as responsáveis pelo ‘Grande Evento de Oxigenação’ (GOE) ( $\approx 2,5$  bilhões de anos atrás), que fixou o oxigênio gasoso ( $O_2$ ) como componente permanente na atmosfera [27]. Nesse momento da história do planeta, a escassez de nutrientes, como o fósforo, e a abundância de outros doadores de elétrons, como  $H_2S$ , favoreciam as bactérias capazes de realizar fotossíntese anoxigênica na competição com as cianobactérias. Logo, os níveis de  $O_2$  atmosférico durante o GOE eram modestos ( $\approx 1\%$  da pressão parcial atual) [27,28]. A prevalência das cianobactérias e o aumento significativo nos níveis de  $O_2$  atmosférico ocorreram após o ‘Evento Neoproterozóico de Oxigenação’ (NOE), mais de um (1) bilhão de anos após o GOE, em decorrência das transformações dos ambientes pelos intemperismos e dinâmica de placas tectônicas, que elevaram a disponibilidade de fósforo [28,29].

As cianobactérias apresentam distribuição global, podendo ser encontradas do Equador aos polos nos mais diversos ambientes como os terrestres; aquáticos dulcícolas, costeiros e marinhos; fontes termais; associadas a outros organismos; dentre outros [30]. Elas estão entre os organismos mais abundantes no fitoplâncton dos oceanos e possuem participação significativa na fixação de carbono [30,31]. Estimativas indicam a produção primária líquida de mais de 12 bilhões de toneladas de carbono ao ano [32].

O filo *Cyanobacteria* é formado por micro-organismos de morfologias e fisiologias altamente diversificadas. Algumas espécies podem apresentar-se na forma multicelular e com diferenciação celular [30]. O acineto é uma das células diferenciadas presente em algumas espécies filamentosas. Ele possui parede espessa, com grânulos de reserva de nitrogênio, é resistente a baixas temperaturas, dissecação e digestão no trato digestivo de animais. Sua função é de célula germinativa que pode originar novos filamentos em condições ambientais favoráveis [30]. Outro tipo celular que pode ser encontrado em cianobactérias filamentosas é o heterocito. Essa célula possui características similares ao acineto, porém perdeu seus aparatos de fotossíntese e mantém um microambiente com concentração mínima de oxigênio. O heterocito é uma célula especializada em fixação biológica de nitrogênio, um dos papéis ecológicos mais relevantes das cianobactérias [33].

A complexidade do filo/classe *Cyanobacteria* reflete-se na sistemática do grupo. Inicialmente, esses micro-organismos foram classificados de acordo com suas características morfológicas segundo as regras dos códigos botânicos de nomenclatura; antigamente o *International Code of Botanical Nomenclature (ICBN)*, atualmente o *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (ICN)*. Durante a década de 1970 ocorreu o reconhecimento das cianobactérias como procarióticas, portanto a taxonomia do grupo deveria ocorrer sob as regras do *International Code of Nomenclature of Bacteria (ICNB)*, atualmente *International Code of Nomenclature of Prokaryotes - ICNP*. A partir desse momento ocorreram várias tentativas de harmonização entre as regras dos dois códigos, mas ainda não há um consenso [34–37]. Hauer, T. & Komárek, J. [38] disponibilizam uma base de dados (*Cyano DB Classification*) que é continuamente atualizada com os diversos táxons do filo/classe *Cyanobacteria*, seguindo a taxonomia baseada em genes marcadores filogenéticos [39]. Atualmente o grupo é composto por 414 gêneros e 1619 espécies, dos quais 394 gêneros e 1553 espécies possuem taxonomia validada por pelo menos um dos dois códigos [38,40].

A filogenia molecular das cianobactérias, baseada em genomas e genes marcadores, tem passado por várias revisões na última década [7,37,39,41]. O avanço das técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) e redução dos custos por base sequenciada levaram a um aumento exponencial da disponibilidade de genomas em bancos de dados públicos [42]. Porém, a montagem de genomas de cianobactérias exigiu avanço significativo das ferramentas de bioinformática para superar a dificuldade do número de linhagens não-cultiváveis e das culturas não-axênicas [37]. Esse fato contribui para o número reduzido de genomas de cianobactérias acessíveis em relação à disponibilidade total de genomas de procariotos [37]. As cianobactérias somam 653 montagens disponíveis no *National Center for Biotechnology Information Search database (GenBank)*, em relação ao total de 31.889 genomas de bactérias (acesso em 10/10/2021). Esse número é aproximadamente seis vezes maior do que há cinco anos, porém ainda há que se considerar a qualidade desses dados [7]. Em 2018 uma análise realizada em 440 genomas revelou que aproximadamente 5% deles apresentavam contaminação com sequências de micro-organismos de outros grupos [43].

Assim como a disponibilidade de genomas, a publicação de produtos naturais produzidos por cianobactérias também teve considerável aumento nos últimos anos. Apenas entre cianobactérias de ambiente marinho, a média entre 2012 e 2016 foi de  $\approx 24$  novos produtos naturais descritos por ano; já entre 2017 e 2019 esse número sobe para  $\approx 56$ . Dentre esses compostos, a maioria é proveniente do metabolismo secundário [44–47]. A capacidade de produção de metabólitos secundários é característica proeminente das cianobactérias. Vários desses produtos apresentam toxicidade a mamíferos e humanos, causando prejuízos quando ocorrem as florações ou ‘*blooms*’ (multiplicação excessiva das cianobactérias) em corpos d’água de abastecimento ou recreação [22]. Em contraponto aos altos custos para o manejo desses eventos e das cianotoxinas, os metabólitos secundários de cianobactérias também representam um grande potencial biotecnológico desses micro-organismos [48]. As aplicações biotecnológicas de cianobactérias e seus produtos são bastante variáveis; já foram descritas atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, degradação de componentes de óleo, produção de hidrogênio para fontes alternativas de energia, produção de polissacarídeos, vitaminas, enzimas, toxinas e outros produtos de interesse farmacêutico [47–49].

### 1.2.3 A Cianosferas

O termo ficosfera foi cunhado, em referência à rizosfera das plantas, para denominar a comunidade de micro-organismos que habitam a zona de influência do metabolismo de cianobactérias ou algas eucarióticas [50]. Usualmente a ficosfera de cianobactérias, também chamada de cianosfera, é formada por bactérias epibiontes, mas a diversidade de relações estabelecidas muitas vezes independe de contato físico [51]. Diante da importância desses micro-organismos, os desafios dos pesquisadores envolvem a identificação de cianobactérias e suas ficosferas, determinação de características e metabolismos que, por fim, levam ao esclarecimento sobre as relações ecológicas e impactos ambientais desses microecossistemas.

A associação entre cianobactérias e bactérias heterotróficas é comumente reportada em vários ambientes e culturas [52–54]. A interação estabelecida entre esses micro-organismos afeta tanto as células individualmente quanto o ambiente como um todo [55–58]. Apesar das interações ocorrerem em escala micro ou nanométrica; quando considerados o volume e a dimensão dos oceanos, por exemplo, seus efeitos são globais [51,58]. Porém, é comum que a natureza e os detalhes dessas relações não sejam conhecidos.

Em florações planctônicas de cianobactérias e algas a composição do bacterioplâncton varia a depender da espécie autotrófica dominante no ‘*bloom*’. As evidências apontam ainda para a variação temporal na composição dessas comunidades, onde as interações bióticas parecem ter mais influência na sucessão de organismos do que os parâmetros físico-químicos [59–61]. As formações bentônicas de cianobactérias, como os *turfs*, são consideradas holobiontes onde as cianobactérias filamentosas têm, dentre outras, a função de hospedeiro. Os filamentos das cianobactérias formam uma malha, onde se incrustam outros micro-organismos e algas [4,62].

Um dos primeiros estudos a abordar sistematicamente a interação entre cianobactérias e bactérias foi realizado por Paerl et al em 1989 [63] com *Trichodesmium* sp., uma cianobactéria filamentosa marinha não-heterocitada. Sua hipótese é de que ocorre uma simbiose onde as bactérias utilizam a matéria orgânica produzida pela cianobactéria, fazendo a remineralização dos nutrientes e, ao mesmo tempo, reduzem as concentrações de oxigênio no microambiente, evitando assim a interrupção do processo de fixação do nitrogênio pela cianobactéria [63].

O estabelecimento e disponibilidade de culturas têm papel essencial no conhecimento atual sobre as interações de cianobactérias e sua ficosfera. Diante de relações ecológicas que por vezes podem ser obrigatórias, a implantação da cultura em si já é um desafio e traz muitas informações sobre os micro-organismos. Esse foi o caso dos cultivos de *Prochlorococcus*, uma das menores e mais abundantes cianobactérias marinhas [32,64]. O sucesso na obtenção de culturas dessa espécie foi alcançado quase uma década após as primeiras descrições de sua ocorrência e os cultivos não eram livres de outros micro-organismos procariontes [65]. Ainda assim, esse passo foi essencial para a descrição das características da espécie e compreensão da sua importância nos ecossistemas marinhos. A dificuldade de obter culturas de *Prochlorococcus* axênicas chamou a atenção dos pesquisadores para o papel das bactérias. A sequência das investigações comprovou que vários gêneros de bactérias alteravam a taxa de crescimento de *Prochlorococcus* e influenciavam sua fisiologia [66,67]. Posteriormente, essa interação também pôde ser comprovada em ambiente natural [68].

A obtenção de culturas puras de cianobactérias pode ser uma tarefa árdua e muitas vezes impossível, dado o nível de interdependência dos micro-organismos [58,68]. Culturas não-axênicas, que na verdade são co-cultivos, podem até serem vistas como um revés na microbiologia clássica. Porém, considerando que as interações com a cianosfera podem estar relacionadas à complexidade típica das cianobactérias, a disponibilidade de co-cultivos é primordial para a determinação do papel de cada organismo na simbiose. O avanço das técnicas moleculares e de sequenciamentos de *DNA/RNA*, aliado à disponibilidade desses co-cultivos, permite agora a elucidação de muitos desafios desse campo da microbiologia; desde a identificação de quem faz parte das culturas até seus papéis ecológicos nas associações e potenciais usos biotecnológicos.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo geral

Descrever a composição da comunidade bacteriana associada às linhagens de cianobactérias dos *turfs* dos recifes de Abrolhos.

### 1.3.2 Objetivos específicos

Avaliar morfologicamente os micro-organismos presentes nos co-cultivos por meio de microscopia eletrônica de varredura.

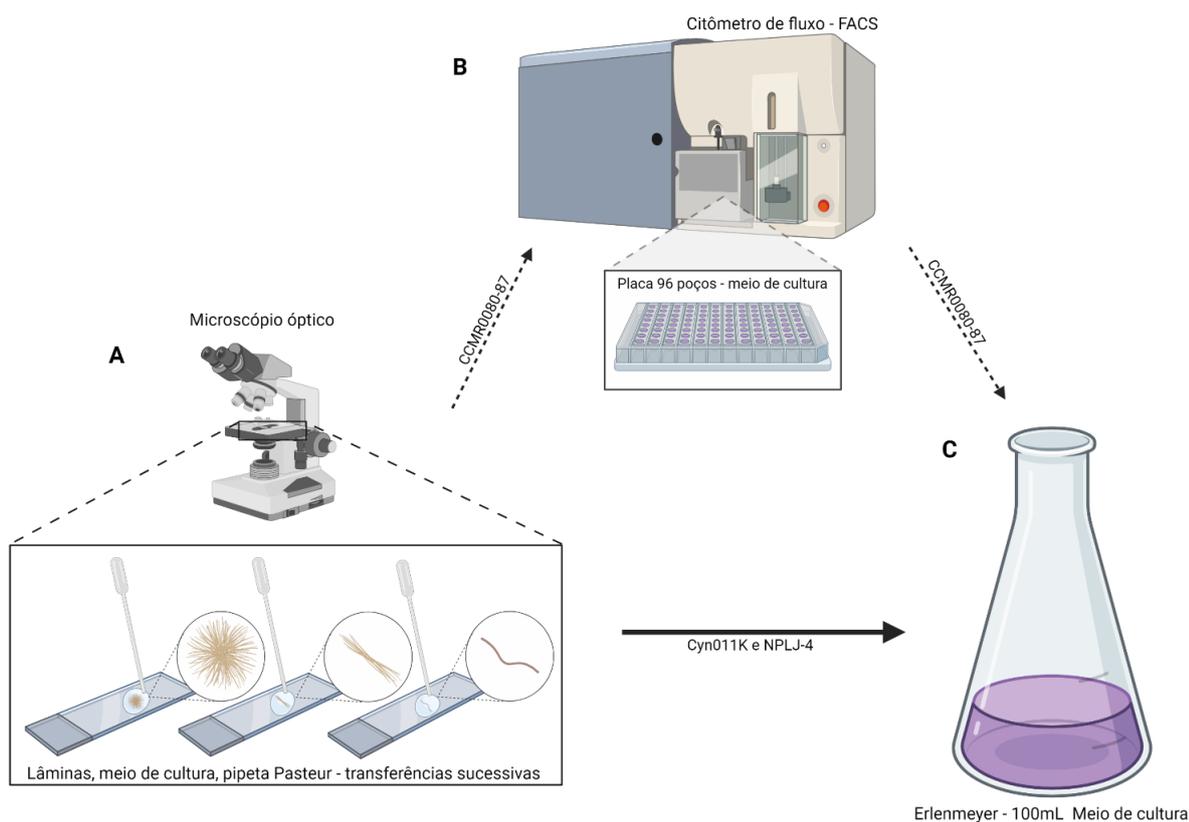
Determinar a riqueza de co-cultivos de cianobactérias isoladas a partir dos *turfs* dos recifes de Abrolhos através da análise de sequências de *DNA* do marcador molecular *rRNA* 16S obtidas por duas plataformas de sequenciamento, *NGS Illumina* e Sanger.

Estabelecer o cultivo de bactérias heterotróficas integrantes dos co-cultivos.

## 1.4 Materiais e métodos

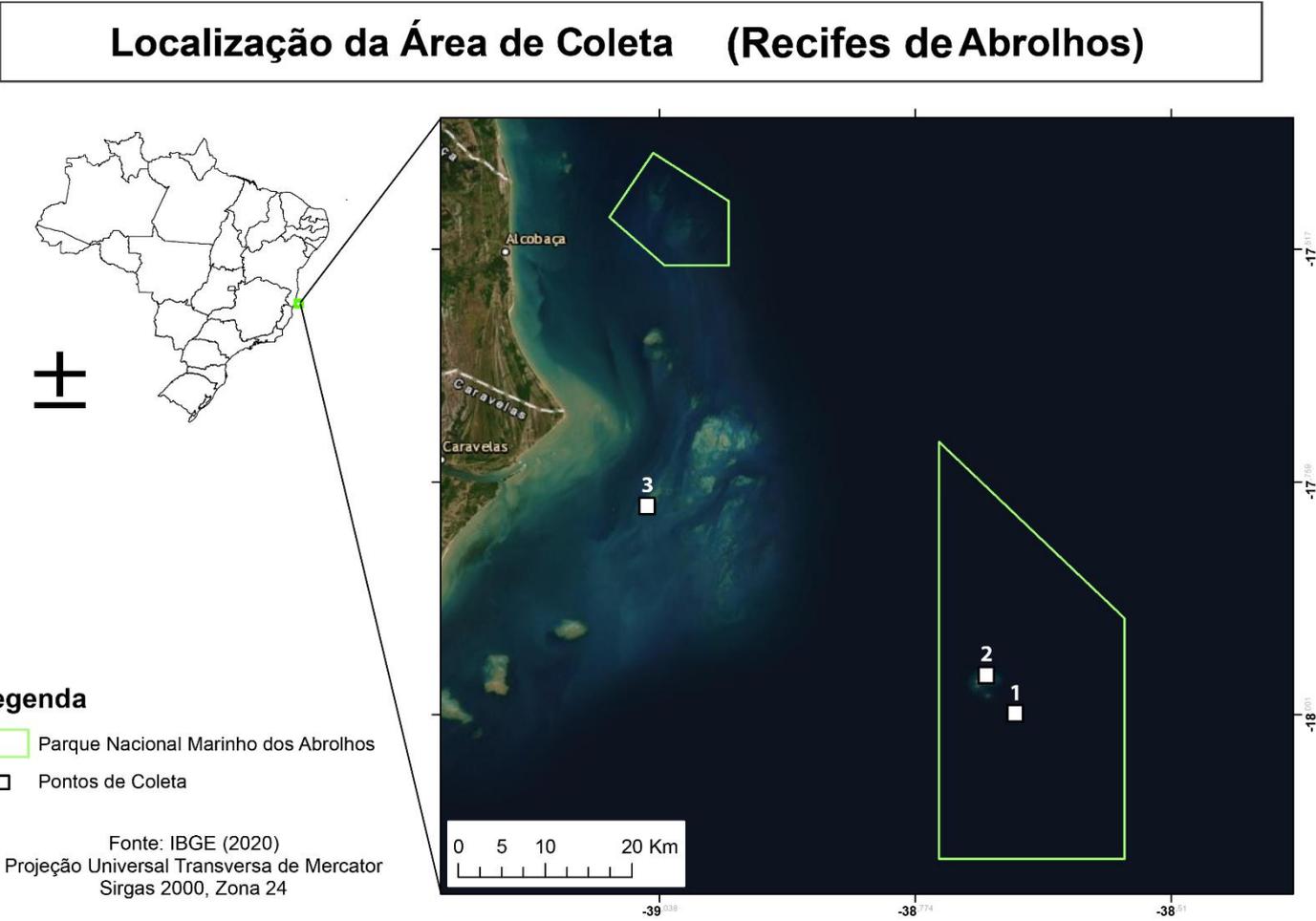
### 1.4.1 Origem dos co-cultivos de cianobactérias

As linhagens de cianobactérias marinhas CCMR0080 à CCMR0087 avaliadas nesse trabalho foram obtidas a partir da coleção de micro-organismos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CCMR). A coleta, isolamento e depósito das cianobactérias em coleções de culturas foram realizados em trabalho prévio por Juline Walter e colaboradores [4,6]. A metodologia de isolamento das cianobactérias está descrita de forma resumida a seguir (Figura 1.4), porém o procedimento detalhado pode ser encontrado de forma completa na publicação de Walter et al (2020) [6]. Alguns filamentos das cianobactérias foram selecionados e transferidos sucessivamente para gotas de meio de cultura estéril. Em seguida, os filamentos foram fragmentados em sonificador e com o auxílio de um citômetro de fluxo equipado com *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)* os fragmentos únicos foram depositados em placas de 96 poços contendo meio de cultura F/2 [6]. As linhagens de cianobactérias pertencem ao novo gênero *Adonisia*, nova espécie *Adonisia turfae*, descrita por Walter et al (2020) [6], segundo classificação proposta por Walter et al (2017) [7].



**Figura 1.4.** Processo de isolamento de cianobactérias para o estabelecimento de co-cultivos em laboratório. Etapa **A**: passagens sucessórias da cianobactéria para gotas de meio de cultura estéril. Etapa **B**: Fragmentação por ultrassom e disposição em placa de 96 poços com meio de cultura, com o auxílio de citômetro de fluxo - *FACS*. Etapa **C**: estabelecimento em frascos de cultivos de maior volume (Erlenmeyer de 100mL). Co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087: etapas **A**, **B** e **C**. Cyn011K e NPLJ-4: Etapas **A** e **C**. *Created with BioRender.com*

A Tabela S1 apresenta as coordenadas geográficas dos pontos em que os *turfs*, dos quais foram isolados os co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087, foram coletados. O mapa (Figura 1.5) indica a área do Parna Mar Abrolhos e os pontos de coleta. Os co-cultivos CCMR0080, CCMR0081 e CCMR0082 foram isolados a partir de *turfs* coletados no ponto 1 e os co-cultivos CCMR0083, CCMR0084 e CCMR0085 a partir de *turfs* coletados no ponto 2; ambos dentro da área do parque. O co-cultivo CCMR0086 foi isolado a partir de *turfs* coletados fora da área do parque (ponto 3) e para o co-cultivo CCMR0087 não foram informados os registros de coleta.



**Figura 1.5.** Mapa indicando os pontos de coletas dos *turfs* dos quais foram isolados os co-cultivos de cianobactérias de Abrolhos avaliados nesse trabalho. Ponto 1: CCMR0080, CCMR0081 e CCMR0082. Ponto 2: CCMR0083, CCMR0084 e CCMR0085. Ponto 3: CCMR0086. Não há informação sobre o ponto de coleta de CCMR0087.

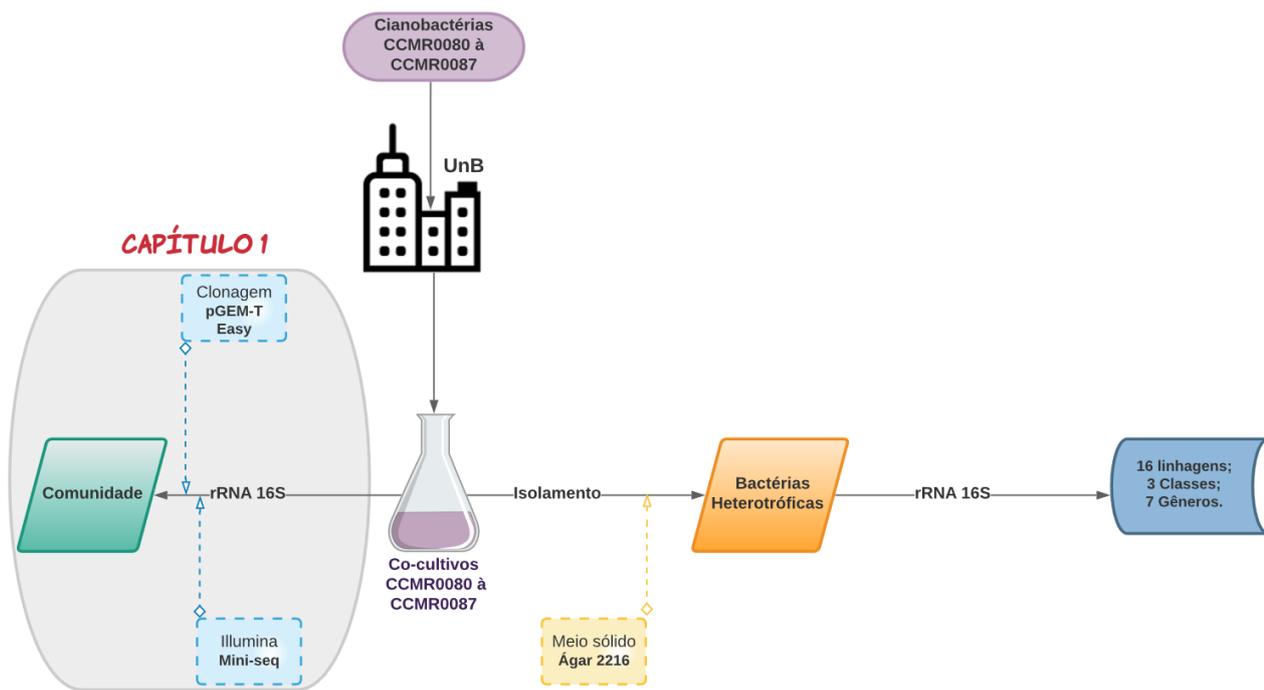
#### 1.4.2 Fluxograma metodológico

O fluxograma geral das análises realizadas nesse capítulo está representado na Figura 1.6. Os co-cultivos recebidos da coleção CCMR (CCMR0080 à CCMR0087) foram estabelecidos no Laboratório de Saneamento Ambiental, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental – UnB (LSA/ENC), onde já

existem disponíveis co-cultivos de cianobactérias de água doce. As linhagens foram cultivadas em frascos Erlenmeyer com 100mL de meio de cultura F/2 (Figura 1.3), utilizando água marinha artificial, e os repiques de manutenção realizados a cada 15-20 dias [69,70]. A sala ambiente dos cultivos foi mantida à 22°C com fotoperíodo de 12/12h, claro/escuro. Os 8 co-cultivos (CCMR0080 à CCMR0087) são diferentes linhagens da mesma espécie de cianobactéria, *A. turfae*, e foram considerados como réplicas biológicas da mesma amostra. Pois, apesar de serem provenientes de *turfs* de diferentes locais dentro dos recifes de Abrolhos e da relevância dessa informação, não foi feita nenhuma correlação direta com as localidades de coleta das amostras para isolamento.

A avaliação microscópica em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada com dois dos co-cultivos, CCMR0080 e CCMR0086, a partir dos quais foram isoladas duas bactérias heterotróficas de relevante interesse para o trabalho.

O isolamento de bactérias heterotróficas a partir dos co-cultivos de cianobactérias foi realizado como estratégia qualitativa, por considerar-se que seria inviável obter culturas puras de todas as bactérias heterotróficas presentes nos co-cultivos. A clonagem do marcador *rRNA* 16S e posterior sequenciamento em plataforma Sanger foram realizados com três dos oito co-cultivos: CCMR0081, CCMR0082 e CCMR0086. Os dois primeiros (CCMR0081 e CCMR0082) foram os co-cultivos utilizados como linhagem tipo para a descrição da espécie *A. turfae*, por Walter et al (2020) [6], logo havia interesse sobre o microbioma associado a essas linhagens. CCMR0086 foi o co-cultivo a partir do qual foi isolada em cultura pura uma das bactérias heterotróficas, pertencente ao clado *Roseobacter*, de interesse ecológico e biotecnológico. Com o sequenciamento Sanger são obtidas sequências com maior número de pares de base e maior qualidade, possibilitando a classificação taxonômica mais precisa das bactérias heterotróficas. Porém o número de sequências é reduzido, não alcançando amostragem suficiente para identificar todas as bactérias presentes nos co-cultivos. Em paralelo com a estratégia de clonagem e sequenciamento Sanger, foi realizado o sequenciamento de nova geração (NGS) em plataforma *Illumina* do marcador *rRNA* 16S dos oito co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087. O grande volume de sequências gerados pelo sequenciamento NGS *Illumina* permite a identificação de micro-organismos menos abundantes nas comunidades. Assim, as estratégias foram adotadas em conjunto para a caracterização mais abrangente e precisa possível sobre a comunidade bacteriana presente nos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087.



**Figura 1.6.** Fluxograma indicando as metodologias utilizadas para alcançar os resultados apresentados no capítulo 1.

Os co-cultivos de cianobactérias CCMR0080 à CCMR0087 são provenientes de um ambiente com alta biodiversidade; o fato de serem organismos bentônicos dificulta o isolamento e cultivo. Além disso, são co-cultivos relativamente novos, com espécies descritas recentemente na literatura. Por esse conjunto de fatores optou-se pela realização do sequenciamento do *NGS Illumina* do *rRNA* 16S de duas linhagens de cianobactérias disponíveis no LSA (ENC/UnB), seguindo os mesmos procedimentos utilizados para as linhagens marinhas, permitindo assim o controle metodológico das análises. As linhagens Cyn011K e MycISO foram isoladas há mais de 20 anos e são cultivadas extensivamente em laboratórios em vários países para a produção de toxinas e realização de pesquisas científicas. Mesmo sendo linhagens provenientes de água doce, foram escolhidas como referência metodológica desse trabalho diante da indisponibilidade de acesso a outras linhagens marinhas. A *Cylindrospermopsis raciborskii* linhagem Cyn011K é uma cianobactéria filamentosa produtora da toxina cilindrospermopsina, isolada em Queensland, Austrália [71]. A linhagem MycISO é proveniente da purificação em meio sólido da linhagem NPLJ-4 de *Microcystis aeruginosa*, obtida da lagoa de Jacarepaguá no Rio de Janeiro e é produtora das toxinas chamadas de microcistinas e nodularinas [72]. De maneira simplificada, o processo de purificação ocorreu pela diluição seriada e espalhamento do co-cultivo NPLJ-4 em meio sólido para a seleção de colônia única a ser re-inoculada em meio líquido, originando assim o co-cultivo MycISO. Os co-cultivos Cyn011K e NPLJ-4 foram obtidos a partir da coleção de culturas do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF-UFRJ) e são mantidas em meio de cultura ASM-1 no LSA (ENC/UnB) [73].

### 1.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os co-cultivos CCMR0080 e CCMR0086, a partir dos quais foram isoladas bactérias heterotróficas de interesse ecológico e biotecnológico, foram visualizados em microscopia eletrônica de varredura. O preparo começou com a precipitação das células e lavagem com tampão PBS (*phosphate-buffered saline*) por três vezes. As amostras foram fixadas em solução Karnovsky: (2% (v/v) paraformaldeído, 2% (v/v) glutaraldeído, 3% (w/v) sacarose e 0,005M CaCl em 0,05M de tampão cacodilato. A segunda fixação ocorreu em 1% de tetróxido de ósmio. O material foi desidratado em soluções de acetona com concentração crescente (50/70/90/100% v/v) e após em ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido. Após montagem no porta-amostra, a amostra recebeu a cobertura de uma fina camada de ouro ( $\approx 10\text{nm}$ ) [74]. As imagens foram geradas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL JSM-7001F (JEOL Ltd., Tóquio, Japão).

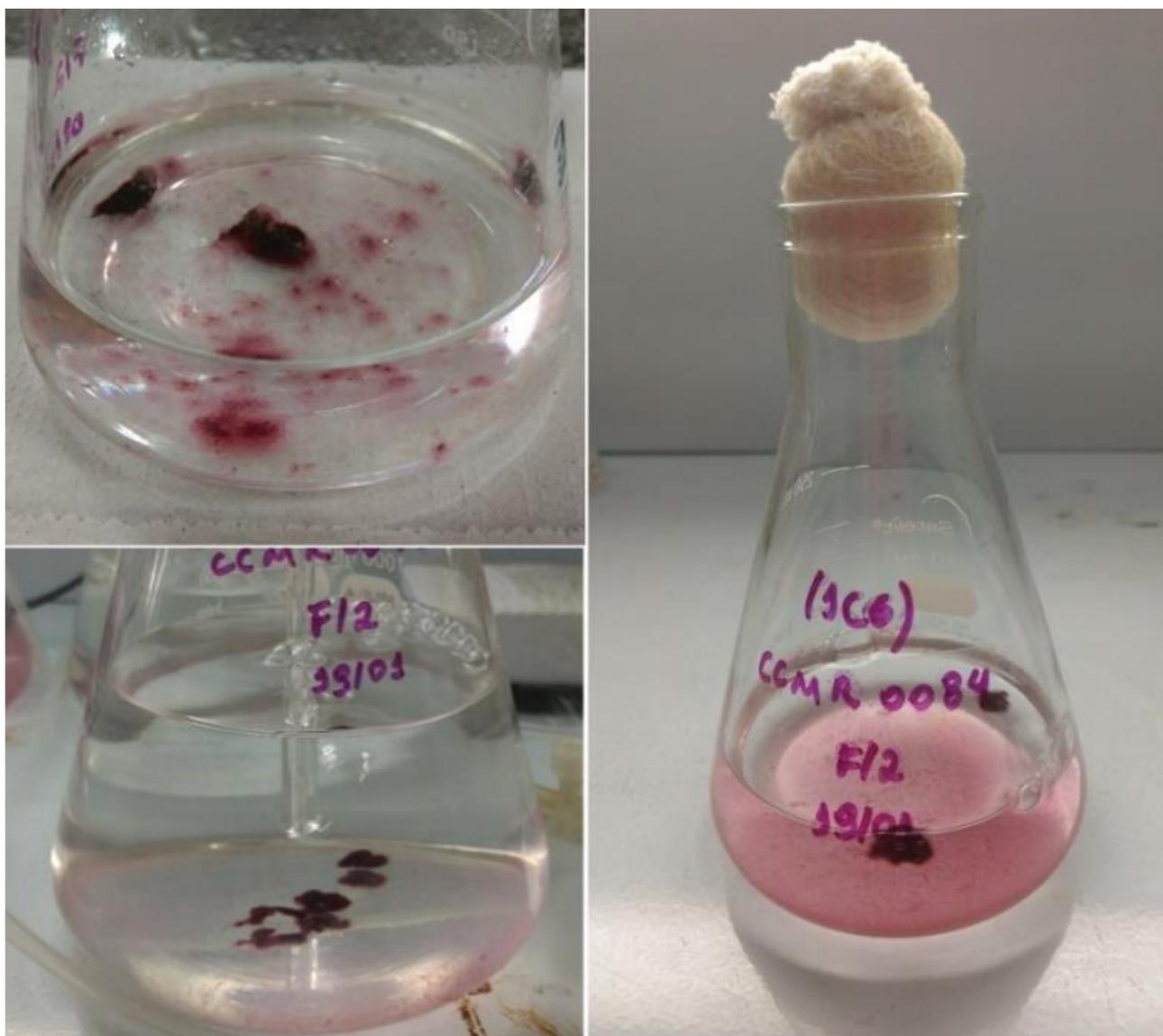
### 1.4.4 Isolamento de bactérias heterotróficas e identificação através do *rRNA 16S*

O isolamento de bactérias heterotróficas a partir dos co-cultivos de cianobactérias marinhas (CCMR0080 – 87) foi realizado em placas de Petri com meio complexo DIFCO 2216 acrescido de ágar (1,5% p/v). Aproximadamente 1mL dos co-cultivos de cianobactérias contendo biomassa celular foi destacado para plaqueamento. Dessa alíquota, uma porção do sobrenadante (200 $\mu\text{L}$ ) foi semeado por espalhamento nas placas com meio sólido, com auxílio de uma alça de Drigalski. Uma porção do sobrenadante foi descartada após centrifugação ( $\approx 300\mu\text{L}$ ). A porção restante foi colocada em banho ultrassônico por 3 minutos, para a desagregação das células, e  $\approx 200\mu\text{L}$  foram semeados no ágar DIFCO 216. As placas foram incubadas por 24h a 28°C e estriamentos sequenciais com alça de platina foram feitos até a obtenção de colônias bacterianas isoladas. As colônias passaram por avaliação visual e os diferentes morfotipos identificados foram inoculados em caldo DIFCO 2216 e estocados a -80°C após crescimento, utilizando glicerol (20% v/v) como crioprotetor. A coloração diferencial de Gram foi realizada para as colônias que foram criopreservadas.

Os morfotipos bacterianos foram identificados através do sequenciamento bidirecional (*forward* e *reverse*) tipo Sanger do marcador molecular *rRNA 16S*. O DNA genômico foi obtido a partir de biomassa celular da cultura pura crescida em meio sólido. A extração do material genético foi realizada com o kit comercial *GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*, Sigma-Aldrich. A PCR do gene *rRNA 16S* foi realizada nas mesmas condições descritas a seguir no item 1.4.6.1.1. A purificação do produto de PCR foi realizada após eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). As bandas do gel foram cortadas e fundidas a 70°C em bloco térmico seco para utilização do kit *GeneJET Gel Extraction Kit*, *Thermo Fisher Scientific*, segundo adaptação de protocolo proposta por [75]. O sequenciamento foi realizado na empresa MacroGen (Seoul – Coréia do Sul). As sequências foram avaliadas e aparadas, somente aquelas com '*Phred score*' maior que 30 foram mantidas e comparadas ao banco de dados *RDP [Ribosomal Database Project (RDP) Classifier]* [76].

### 1.4.5 Extração e purificação de *DNA* dos co-cultivos de cianobactérias

A biomassa para a extração de *DNA* das linhagens CCMR0080 à CCMR0087 foi recolhida dos frascos com o auxílio de uma alça de níquel esteril. Como essas cianobactérias são bentônicas, uma parte do co-cultivo cresce aderida ao frasco e outra flutuante (Figura 1.7). O cuidado em recolher parte das duas porções foi observado. Para as linhagens Cyn011K e MycISO, que são planctônicas, a biomassa foi obtida por centrifugação e precipitação das células.



**Figura 1.7.** Co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087 provenientes dos *turfs* de Abrolhos. Em cultivo essas cianobactérias formam um biofilme que cresce aderido ao fundo do frasco e também essas massas filamentosas que permanecem flutuantes.

A purificação do *DNA* genômico foi realizada com dois kits de extração disponíveis comercialmente: *GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*, Sigma-Aldrich, com o auxílio do homogenizador de alta potência '*FastPrep*' na etapa de lise celular; e o kit *PowerSoil® DNA Isolation Kit*, MOBio. O *DNA* purificado pelas duas metodologias foi composto na proporção de 1:1 (v/v) para as etapas seguintes de clonagem e sequenciamentos do marcador molecular *rRNA* 16S. A opção pela mistura dos extratos purificados baseou-se em testes preliminares (dado não apresentado) que mostraram os dois métodos como os mais eficientes na etapa de lise celular, tanto para células das cianobactérias quanto para as bactérias associadas.

#### 1.4.6 Análise do gene marcador molecular *rRNA* 16S dos co-cultivos de cianobactérias

##### 1.4.6.1 Biblioteca de clones do *rRNA* 16S

###### 1.4.6.1.1 Clonagem

A clonagem do gene *rRNA* 16s foi realizada para os co-cultivos CCMR0081, CCMR0082 e CCMR0086, com 20 dias de crescimento. Após a purificação do *DNA* (item 1.4.3), a reação em cadeia da (*DNA*) polimerase (PCR) foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1494R (5'-TACGGCTACCTTGTACGAC-3') nas seguintes condições: desnaturação a 95°C durante 3 minutos; desnaturação a 95°C durante 1 minuto; anelamento a 53°C durante 1 minuto; extensão a 72°C durante 1 minuto; repetição das etapas 2 a 4 por 27 vezes; extensão a 72°C durante 10 minutos. A purificação do produto de PCR foi realizada com kit de purificação *BIO RAD (Quantum Prep PCR Kleen Spin Columns)*.

Os fragmentos do *rRNA* 16S purificados foram ligados em vetor *pGEM®-T Easy*, Promega. A transformação bacteriana ocorreu em *Escherichia coli* *EPI300* por choque térmico ou, após diálise do sistema de ligação, por eletroporação. As células transformadas foram espalhadas em meio de cultura Luria Bertani (LB) sólido suplementado com ampicilina (150 µg/mL), X-Gal (0,00625 % p/v) e IPTG (0,5 mM). As colônias positivas para a transformação com plasmídeo e inserto (brancas) foram inoculadas em LB + ampicilina (150 µg/mL). A extração e purificação do *DNA* plasmidial foi realizada com o kit '*mini-prep QIAprep Spin Miniprep Kit*', Qiagen. A confirmação dos transformantes ocorreu por amostragem randômica de 5 em cada 100 clones, aproximadamente, para verificação da presença dos insertos após realização de digestão com a enzima *EcoRI* e avaliação do padrão de bandas em eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v).

###### 1.4.6.1.2 Sequenciamento Sanger e análise de dados

O sequenciamento unidirecional do *DNA* plasmidial dos clones foi realizado em plataforma Sanger na empresa Macrogen (Seoul, Coréia do Sul); utilizando o oligonucleotídeo iniciador para o promotor T7. A ferramenta Asparagin, disponível em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>,

foi utilizada para a avaliação da qualidade Phred score e remoção dos pares de bases provenientes do vetor [77–79]. As sequências maiores que 600 pb e com *Phred score* maior que 30 foram mantidas para as análises subsequentes. A remoção de quimeras foi realizada com o algoritmo *UCHIME2* [80]. O programa *Mothur* foi utilizado para o agrupamento das sequências com similaridade maior que 97%, tomado como referência para classificação das *operational taxonomic unit (OTU)* ao nível de espécie, e identificação das sequências representativas. A assinatura taxonômica das sequências foi realizada através da base de dados *Ribosomal Database Project (RDP-DB)* em sua versão *on-line*, com confiabilidade mínima de 80% [76]. A posição evolutiva das OTUs foi estimada pela construção de árvore filogenética pelo método *Maximum-likelihood (ML)* com 1000 repetições de amostragem (*Bootstrap*), utilizando tanto das sequências clonais representativas quanto *rRNA 16S* de espécies válidas listadas em *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - LPSN* e depositadas no banco de dados *GenBank/EMBL/DDBJ* [81,82]. O número de acesso das sequências e os endereços para obtenção de informações e atualizações taxonômicas sobre as espécies estão disponíveis na tabela S3 do anexo. A árvore filogenética foi construída com o programa *Fasttree* e editada com o programa *MEGA 7* [83,84].

#### 1.4.6.2 Sequenciamento NGS do rRNA 16S e análise de dados

O DNA metagenômico purificado, dos co-cultivos marinhos (CCMR0080 à CCMR0087) com 30 dias de crescimento e dos dulcícolas (*Cyn011K* e *MycISO*) com 15 dias de crescimento, foi enviado à *DNA Services (DNAS) facility - Research Resources Center* da Universidade de Illinois, Chicago-USA. O sequenciamento do marcador *rRNA 16S* foi realizado em plataforma *mini-seq Illumina*, gerando *paired-end reads* de 153 pares de base (bp) cada. A preparação da biblioteca para sequenciamento foi realizada em protocolo de duas etapas com o kit *Fluidigm*, disponível comercialmente. A região do gene *rRNA 16S* sequenciada foi a V4, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 515F (5' – GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) e 806R (5' – GGACTACHVGGGTWTCTAAT) [85].

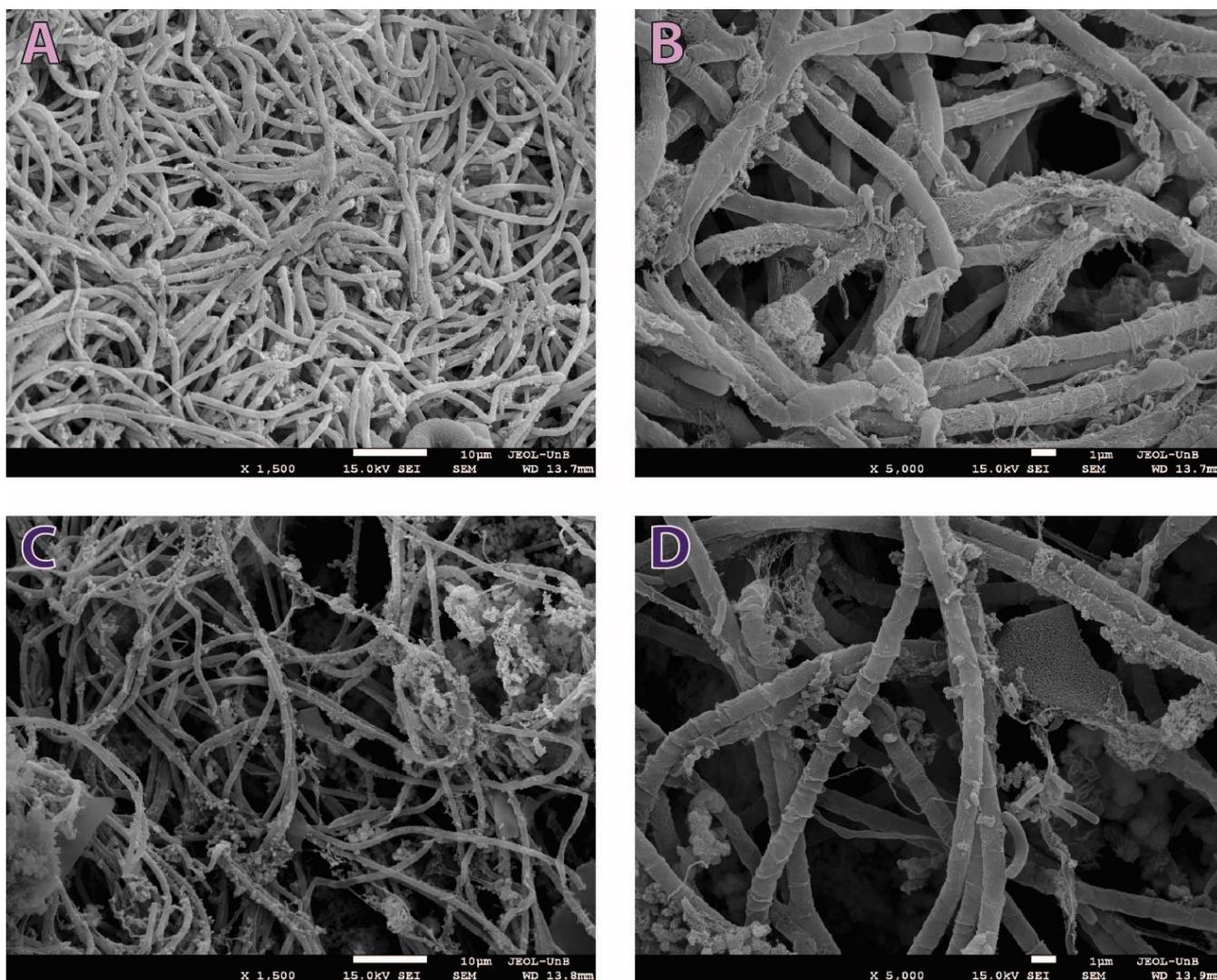
Os dados brutos do sequenciamento foram recebidos ordenados por amostra e livres de sequências de *barcodes*, adaptadores e do controle de sequenciamento *phiX*. Os *reads forward* e *reverse* foram unidos com o programa *PEAR* (versão 0.9.11) e após analisados com o pacote *QIIME2* (versão 20.11) e seus recursos [86,87]. O *plugin cutadapt* foi utilizado para a remoção dos oligonucleotídeos iniciadores (515F e 806R) [88]. A qualidade das sequências e a determinação de *Amplicon Sequence Variants (ASV)* foi avaliada com a ferramenta *Deblur*; apenas sequências com *Phred score* maior que 20 foram mantidas e todas as sequências foram limitadas ao tamanho de 230 pb [77,89]. Os dados esperados para as comunidades dos co-cultivos eram de riquezas pequenas em relação ao volume de dados gerados em sequenciamentos *NGS Illumina*. O *Deblur* possui um filtro de qualidade positivo e um negativo para as *ASV*, assim artefatos já conhecidos das técnicas de sequenciamento (exemplo: sequências do controle *phiX*) e as sequências com similaridade menor que 60% àquelas do banco de dados de *rRNA 16S Greengenes* são removidas das análises posteriores [89].

Dessa maneira, o *Deblur* foi escolhido por ser considerado o pacote mais estrito e que apresentava menor chance de falsos positivos [90,91]. A taxonomia das ASV foi determinada utilizando o *plugin taxa* do QIIME2, tendo como referência o banco de dados Silva (versão 138, 02/11/2020) [92–95].

As tabelas de abundância de ASV, de taxonomia assinada para cada uma dessas sequências e de metadados foram os arquivos necessários para as análises posteriores utilizando a linguagem de programação R (versão 4.0.3), dentro do aplicativo *RStudio* (versão 1.3.1093) [96,97]. O principal pacote utilizado para gerar os gráficos de rarefação, abundâncias e análises estatísticas dos dados foi o *Phyloseq* [98]. Além das dependências do *Phyloseq*, outros pacotes foram instalados e estão listados na tabela S2 do anexo. As métricas de  $\alpha$ -diversidade foram avaliadas após análise da curva de rarefação e normalização da amostragem pela profundidade do sequenciamento em 95% da menor biblioteca de ASV, no caso aquela referente à amostra CCMR0081.

## 1.5 Resultados e Discussão

A análise microscópica dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087 revela uma cianosfera abundante, indicando a presença de diferentes morfotipos celulares nos co-cultivos (Figura 1.8). Apesar de não ser possível a resolução taxonômica dos grupos de micro-organismos através das técnicas clássicas de microscopia utilizadas, elas foram importantes para indicar a complexidade dos arranjos formados nessas comunidades. A ampliação de 1500x (Figura 1.8 A e C) permite a visualização da malha formada pelos filamentos das cianobactérias. A visualização com amplificação de 5000x (Figura 1.8 B e D) permite a identificação de morfotipos de bactérias agregados aos filamentos e à bainha.



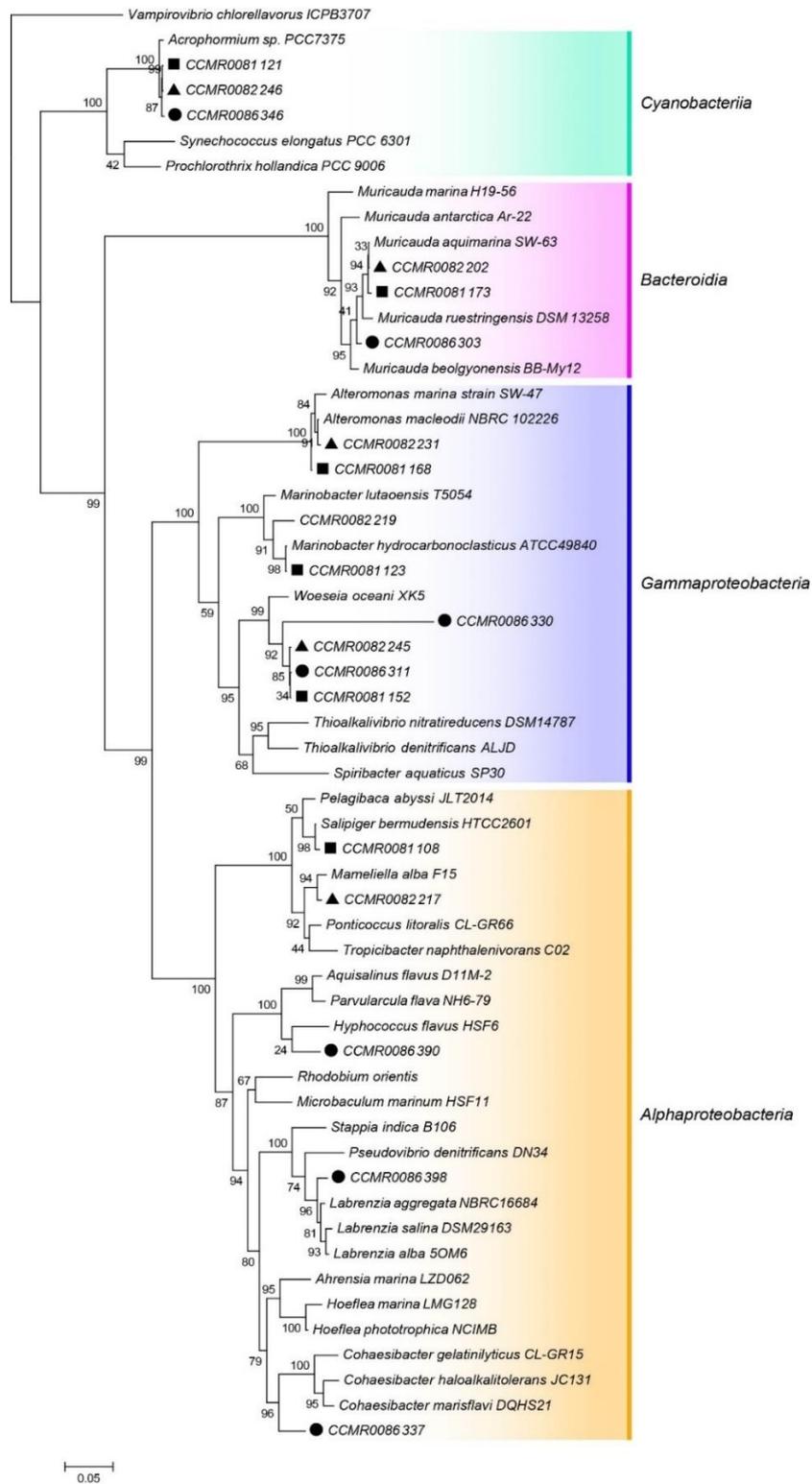
**Figura 1.8.** Fotomicrografia em sistema de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens A e B são do co-cultivo CCMR0080. As imagens C e D são do co-cultivo CCMR0086. Ampliação de 1500x (A e C) barra branca indicando 10 µm, ampliação de 5000x (B e D) barra branca indicando 1 µm.

A Tabela 1.1 apresenta as linhagens de bactérias heterotróficas isoladas em cultura pura a partir dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087. A indicação taxonômica foi atribuída a partir da sequência parcial do *rRNA* 16S, de acordo com o *RDP-DB*, obtida após PCR e sequenciamento Sanger. Dentre as linhagens isoladas estão representadas bactérias pertencentes às classes *Flavobacteriia* (*Bacteroidia*, em *Silva-DB*), *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*, todas prevalentes nos co-cultivos. O meio de cultura utilizado para o isolamento das culturas foi o *DIFCO Marine Broth – 2216*, um meio complexo não-seletivo. A escolha do meio de cultura está relacionada aos resultados alcançados: todos os isolados pertencem a categorias de micro-organismos cultiváveis e representam os grupos taxonômicos abundantes nos co-cultivos. A obtenção de um número maior de isolados bacterianos depende de um maior esforço amostral, baseado em diferentes estratégias como o uso de diferentes técnicas de separação das células e meios de cultura oligotróficos ou seletivos. Destaca-se a possibilidade de muitas dessas bactérias não serem viáveis em culturas puras, devido às relações ecológicas obrigatórias com os micro-organismos da comunidade.

**Tabela 1.1** Linhagens de bactérias heterotróficas isoladas em cultura pura a partir dos co-cultivos de cianobactérias dos *turfs* de Abrolhos. A classificação e taxonomia apresentada foi obtida pelo *RDP-DB*.

Co-cultivo de origem	Linhagem Bac. Het. Isolada	Identidade	Qualidade	Tamanho do fragmento	Classificação					
					Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
CCMR0082	A	986.667	98	900	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Muricauda
CCMR0080	C / K001	100	99	827	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Muricauda
CCMR0087	F	980.256	96	861	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Muricauda
CCMR0082	H1	99.725	99	1091	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Muricauda
CCMR0080	E2	993.243	99	443	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Pelagibaca
CCMR0082	H2	991.579	99	473	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Pelagibaca
CCMR0087	G1	977.556	97	802	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Ruegeria
CCMR0086	K1	990.826	99	436	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Ruegeria
CCMR0080	B2	991394	99	579	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Roseovarius
CCMR0080	B1	987.613	96	902	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	---
CCMR0086	J2	100	99	330	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	---
CCMR0087	L	987.613	96	902	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	---
CCMR0081	D	998.302	99	599	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Alteromonas
CCMR0080	E1	998.628	99	729	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter
CCMR0087	G2	100	100	1051	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter
CCMR0086	I	994.565	98	920	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter
CCMR0086	K2	100	100	460	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter

A clonagem seguida de sequenciamento em plataforma Sanger do *rRNA* 16S dos co-cultivos CCMR0081, CCMR0082 e CCMR0086 permitiu a identificação de outras bactérias presentes nos co-cultivos, além das obtidas em cultura pura. Porém, assim como as linhagens isoladas em cultura pura, na biblioteca de clones *rRNA* 16S detectou-se apenas sequências referentes às classes *Bacteroidia*, *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*, além de *Cyanobacteriia* (*Silva-DB*). A Tabela S4 apresenta o *best hit* de cada *OTU*, analisada em comparação ao *RDP-DB*. O posicionamento filogenético de cada *OTU* está apresentado na árvore filogenética da Figura 1.9.

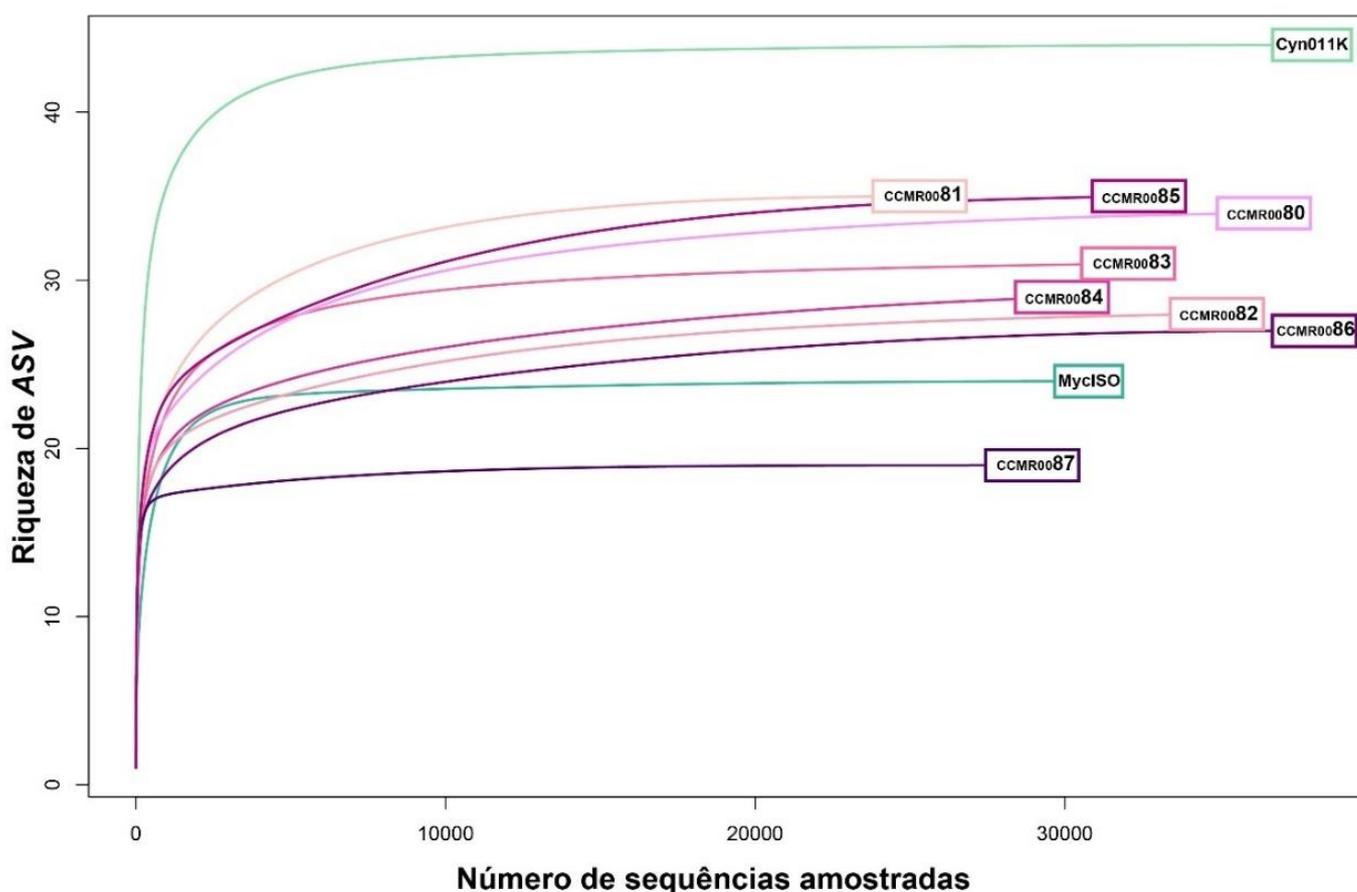


**Figura 1.9.** Árvore filogenética (*Maximum likelihood*) baseada na seqüência parcial do gene marcador molecular *rRNA* 16S obtida por clonagem e sequenciamento Sanger. As OTU representativas foram obtidas a partir do agrupamento de seqüências com similaridade maior que 97%. Os clados estão destacados por cores, indicando as classes do domínio *Bacteria*: Verde – *Cyanobacteriia*, Rosa – *Bacteroidia*, Azul– *Gammaproteobacteria* e Laranja – *Alphaproteobacteria*. O formato dos marcadores indica o co-cultivo de onde foi obtida a seqüência clonal: quadrado - CCMR0081, triângulo CCMR0082 e círculo – CCMR0086. A nomenclatura utilizada está baseada em *Silva-DB* v.138.

Através do sequenciamento *NGS Illumina* do *rRNA* 16S foi possível acessar a riqueza das cianosferas das linhagens CCMR0080 à CCMR0087, Cyn011K e MycISO. Os dados foram gerados em quantidade e qualidade suficientes para que a avaliação da comunidade pudesse ser realizada e os índices de diversidade calculados.

O sequenciamento gerou o total de 78.268 *reads*. Após todos os filtros de qualidade aplicados, restaram 32.688 seqüências (ASV) (Figura S.1), que compõem as ASV utilizadas para a avaliação dos índices de diversidade e determinação do perfil taxonômico dos co-cultivos (Figura 1.10). A análise da curva de rarefação indicou que a amostragem realizada foi suficiente para estimar a riqueza da comunidade bacteriana dos co-cultivos. A partir do gráfico apresentado na Figura 1.6, infere-se que o aumento na profundidade do sequenciamento do marcador *rRNA* 16S não resultaria em um número maior de ASV distintas.

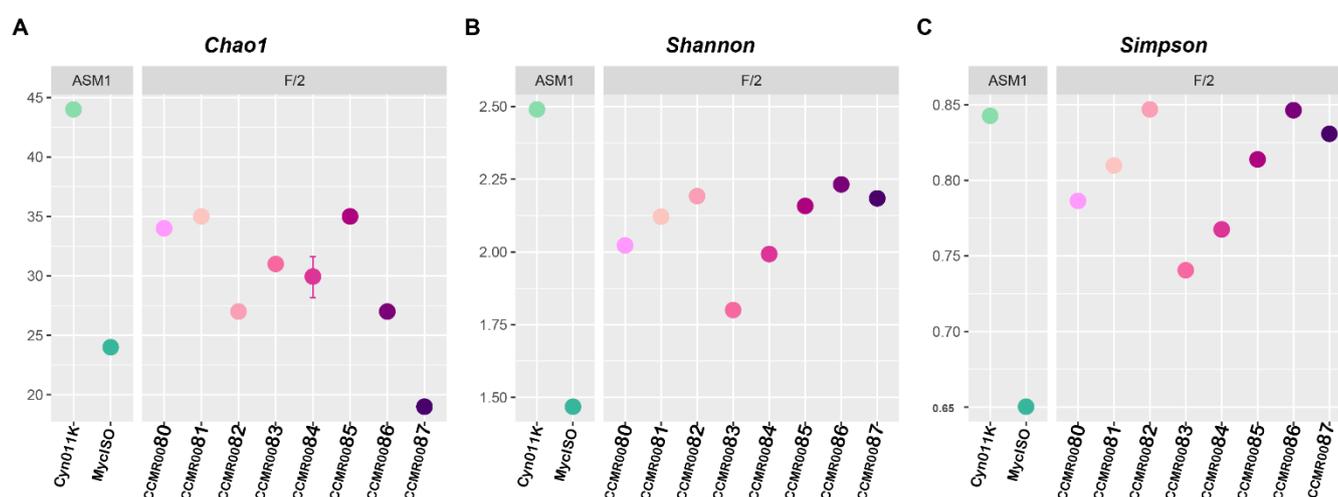
Dentre as linhagens provenientes dos *turfs* de Abrolhos, as linhagens CCMR0080, CCMR0081 e CCMR0085 apresentaram riquezas semelhantes, com os maiores valores, e a linhagem CCMR0087 apresentou-se como o co-cultivo de menor riqueza.



**Figura 1.10.** Curva de rarefação dos *reads* gerados pelo sequenciamento *NGS Illumina* do *rRNA* 16S dos co-cultivos das cianobactérias dos *turfs* de Abrolhos CCMR0080 à CCMR0087 (tons de roxo) e dulcícolas Cyn011K e MycISO (tons de verde). A amostragem foi suficiente para estimar a riqueza da comunidade.

### 1.5.1 Diversidade dos co-cultivos de cianobactérias

A Figura 1.11 apresenta os principais índices de diversidades calculados para os co-cultivos das cianobactérias CCMR0080 à CCMR0087, Cyn011K e MycISO. De maneira geral, os indicadores avaliados para os co-cultivos provenientes de Abrolhos (CCMR0080 à CCMR0087) apresentaram valores similares aos determinados para os co-cultivos dulcícolas (Cyn011K e MycISO), utilizadas como referência metodológica. Co-cultivos de *Microcystis* spp. (disponíveis no *Institute of Bioscience & Biotechnology e Freshwater Bioresources Culture Collection, Coréia do Sul*) apresentaram índice de diversidade de Shannon com valores próximos de 2, assim como os co-cultivos avaliados neste trabalho [99]. Valores semelhantes também foram determinados para co-cultivos de cianobactérias provenientes de ambientes extremos marinhos ou salinos, isoladas entre 2000 e 2003 por Shaw et al 2020 (disponíveis na CCMEE - *Culture Collection of Microorganisms from Extreme Environments – University of Oregon/EMSL, USA*) [100]. Esses valores similares podem indicar que o tempo de isolamento e manutenção em laboratório tem pouca influência sobre a diversidade dos co-cultivos. Porém, são necessários avaliações mais amplas, que ponderem outros parâmetros para a determinação da influência da variável tempo sobre a diversidade dos co-cultivos. Cyn011K apresentou os maiores valores para riqueza e diversidade, em relação aos demais co-cultivos. Porém, a determinação do quão significativas podem ser essas diferenças em relação aos demais co-cultivos depende da análise de mais réplicas biológicas e experimentais.



**Figura 1.11.** Índices de diversidade calculados para os co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087 (tons de roxo), Cyn011K e MycISO (tons de verde), com base nos dados gerados pelo sequenciamento *NGS Illumina* do *rRNA* 16S. **A** – Estimador de riqueza *Chao 1*; **B** Índice de diversidade de *Shannon*; **C** – Índice de diversidade de *Simpson* (1-D).

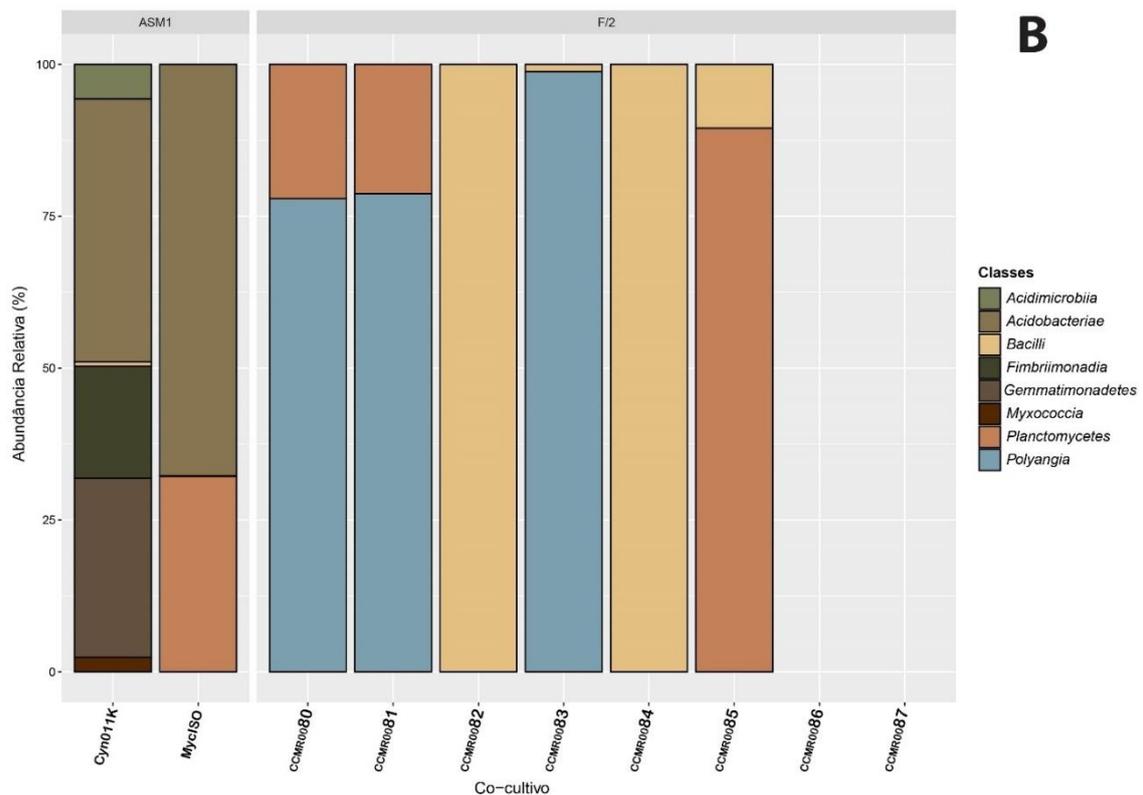
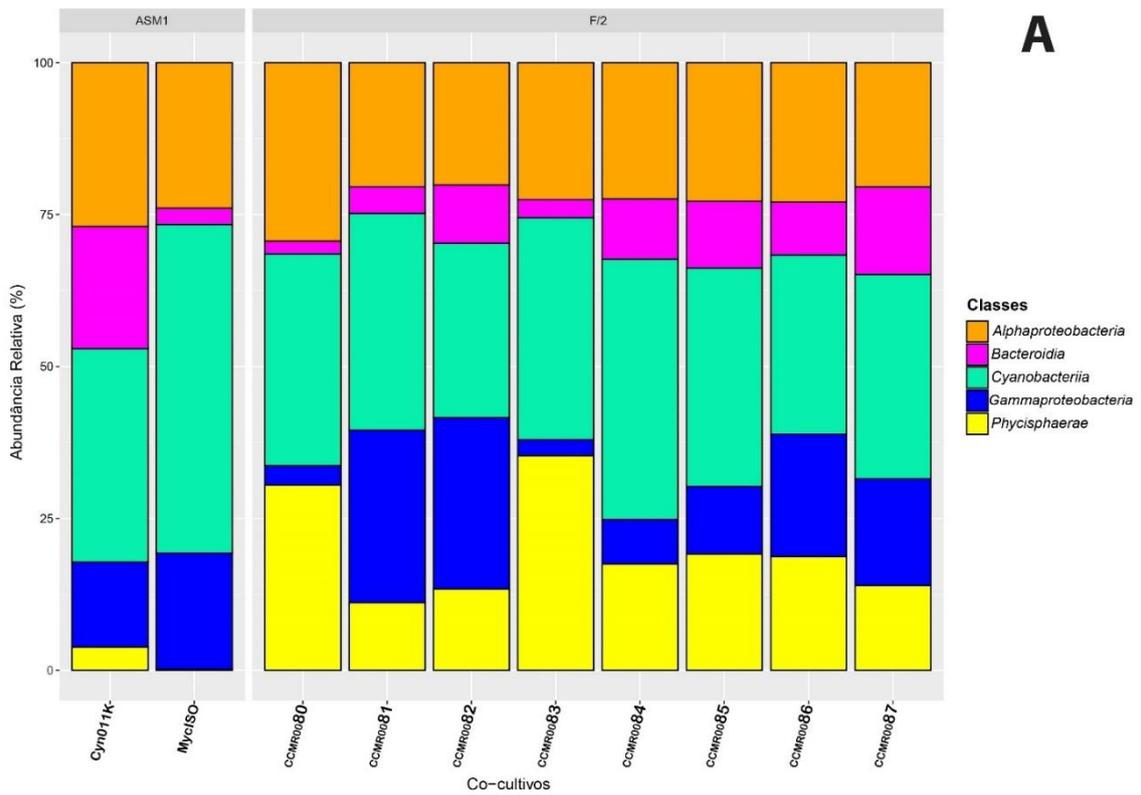
Fatores como procedência de diferentes ambientes (dulcícolas: Cyn011K, Austrália; MycISO, Rio de Janeiro - Basil; marinhas: CCMR0080 à CCMR0087, Abrolhos-Brasil), diferenças quanto à morfologia e os processos de isolamento distintos podem estar relacionados à diversidade nos co-cultivos. Quanto à morfologia, a MycISO é uma cianobactéria cocóide (células arredondadas), que

durante o processo de isolamento e repiques sucessivos perdeu sua organização colonial. É possível que a redução da mucilagem e estrutura colonial tenha levado à diminuição do número de bactérias aderidas às cianobactérias. Em *Microcystis* spp. a comunidade de bactérias aderidas é diferente da comunidade de bactérias livres [101]. A esse fato soma-se a etapa adicional de isolamento em meio sólido realizado com esse co-cultivo. Esses dois fatores podem ter contribuído para os valores reduzidos de riqueza e diversidade do co-cultivo MycISO, observados na Figura 1.7. As linhagens marinhas (CCMR0080 à CCMR0087) e a dulcícola Cyn011K apresentam a mesma morfologia, são filamentosas. Porém, as linhagens CCMR0080 à CCMR0087 passaram por etapa adicional de isolamento. Como descrito no item 1.4.1 (Figura 1.4), após separação manual dos filamentos ao microscópio, os co-cultivos marinhos foram fragmentados e inoculados nos meios de cultura com o auxílio de ultrassom, citômetro de fluxo e FACS. Assim, o processo de isolamento mais estrito pode estar relacionado aos menores valores de riqueza e diversidade dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087 em relação ao Cyn011K. Em perspectiva futura, desenhos experimentais podem ser realizados para comparar o efeito dos diferentes processos de isolamento na composição da cianosfera dos co-cultivos. Esses dados podem contribuir para determinar quais são as relações interespecíficas obrigatórias estabelecidas nos co-cultivos.

### 1.5.2 Composição bacteriana dos co-cultivos de cianobactérias

Os dados provenientes dos sequenciamentos NGS do *rRNA* 16S indicaram que os co-cultivos marinhos CCMR0080 à CCMR0087 estão estruturados em 6 filos, 8 classes, 23 ordens e 27 famílias de procariotos. A identidade de cada ASV representativa está detalhada na Tabela 2.

O perfil microbiano dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087 é formado predominantemente (abundância relativa do total de ASV  $\geq$  1% do total de ASV) pelos filos *Cyanobacteria* (38,54%), *Proteobacteria* (28,99%), *Planctomycetota* (22,85%) e *Bacteroidota* (8,79%). Padrão similar foi determinado para as cianobactérias de água doce Cyn011K e MycISO (Figura 1.12. A). Em níveis hierárquicos mais altos a predominância desses grupos é recorrente na cianosfera, tanto em cultivos como em ambientes naturais [50,102,103]. A classe *Betaproteobacteria* (ordem *Burkholderiales* em *Silva-DB v.138*) que aparece como dominante em algumas cianosferas não foi identificada nos co-cultivos marinhos [101,104–106]. Os filos com menor abundância relativa foram *Firmicutes* (0,01%) e *Myxococcota* (0,85%). (Figura 1.12 B).



**Figura 1.12.** Gráfico de barras indicando a abundância relativa (%) das ASV nas classes de *Bacteria* dos co-cultivos de cianobactérias CCMR0080 à CCMR0087, Cyn011K e MycISO. **A** – Distribuição das classes abundantes nos co-cultivos, com abundância relativa em relação à soma total de ASV das classes abundantes. **B** – Distribuição das classes de bactérias raras nos co-cultivos, com abundância relativa referente à soma total de ASV das classes raras.

Os *turfs* de Abrolhos apresentaram composição bacteriana similar em relação à encontrada nos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087, com a dominância de *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* e *Bacteroidetes* [4]. Porém, destaca-se nos co-cultivos o enriquecimento do filo *Planctomycetota*, que figura entre os *taxa* prevalentes com a classe *Phycisphaerae*. Apenas a amostra CCMR0085 apresentou *reads* mitocondriais, indicativo da presença de organismo eucarioto na comunidade [100]. Como esse mesmo co-cultivo também apresentou *reads* referentes a cloroplasto, é possível que alguma alga eucariótica presente no *turf* tenha se mantido incrustada nos filamentos da cianobactéria.

A assinatura taxonômica das ASV (Tabela 2) revela a presença de organismos ‘*uncultured*’ nos co-cultivos. Inicialmente é necessário destacar a inadequação do termo ‘*uncultured*’, dado que as sequências foram obtidas a partir de um cultivo de micro-organismos. Porém, a assinatura dessas ASV como organismos ‘incultiváveis’ revela a riqueza, potencial biotecnológico e a importância da disponibilidade dessas linhagens de cianobactérias em coleções de cultura. Parte da biodiversidade de micro-organismos em um determinado ambiente pode ser acessada em co-cultivos de cianobactérias coletados naquele local, mesmo após longos anos de manutenção das linhagens em laboratório [103]. Mesmo que de maneira associada, esses micro-organismos são mantidos ao longo do tempo em condições controladas, facilmente descritas e replicáveis. A própria capacidade, ou não, de uma bactéria ser cultivada de maneira isolada pode trazer respostas sobre seu metabolismo e funções ecológicas. Além disso, mesmo que não sejam passíveis de isolamento total, em uma comunidade de riqueza reduzida, em relação à maioria das amostras ambientais, o acesso a genomas utilizando as ferramentas de montagens de genomas a partir de metagenomas (*bin*) é muito menos oneroso, em termos de custos do sequenciamento e demanda computacional de análise de dados [107]

Durante florações de cianobactérias ocorre uma sucessão no bacterioplâncton, que altera quantitativamente sua composição ao longo do tempo [54,59–61,108,109]. O DNA dos co-cultivos utilizados para a clonagem e sequenciamento NGS *Illumina* foram extraídos com diferentes tempos de, 20 e 30 dias, respectivamente. Uma das possibilidades para a ausência de sequências referentes à classe *Phycisphaerae* na biblioteca de clones *rRNA* 16S é a possível variação temporal na diversidade bacteriana das cianosferas, considerando os diferentes estágios de amostragem.

**Tabela 1.2.** Assinatura taxonômica de cada ASV obtida através das análises do sequenciamento NGS *Illumina* do rRNA16S. A taxonomia das ASV está de acordo com a anotação do *Silva-DB 138*.

Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	CCMR00 80	CCMR00 81	CCMR00 82	CCMR00 83	CCMR00 84	CCMR00 85	CCMR00 86	CCMR00 87	
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Tannerellaceae	NA	2	0	0	0	0	0	0	0	
			Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Muricauda	0	1115	3360	6	2908	3514	3315	4181	
	Cyanobacteria	Cyanobacterilia	Chloroplast	Chloroplast	Chloroplast	0	0	0	0	0	153	0	0	
			Phormidesmiales	Phormidesmiaceae	Acrophormium	Acrophormium	0	0	0	0	0	0	0	9664
					Acrophormium	Acrophormium	12074	8966	9928	11472	12823	11418	11464	0
					Acrophormium	Acrophormium	0	2	0	0	1	1	0	0
					Acrophormium	Acrophormium	1	2	4	1	6	2	3	0
					Acrophormium	Acrophormium	2	0	0	0	1	3	2	0
					Acrophormium	Acrophormium	4	2	1	3	2	2	2	0
					Acrophormium	Acrophormium	4	5	2	0	4	0	2	0
	Firmicutes	Bacilli	Alicyclobacillales	Alicyclobacillaceae	Effusibacillus	0	0	0	7	2	3	0	0	
			Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0	0	4	0	0	0	0	0	
	Myxococota	Polyangia	Polyangiales	Sandaracinaceae	Uncultured	1177	86	0	639	0	0	0	0	
			Planctomycetota	Phycisphaerae	SM1A02	SM1A02	0	0	6	0	0	0	3	0
	SM1A02	SM1A02			0	2806	4594	0	5246	0	7184	4043		
	SM1A02	SM1A02			10705	0	0	11014	0	6218	0	0		
	Planctomycetes	Planctomycetales	Gimesiaceae	Gimesia	Gimesia	320	25	0	0	0	30	0	0	
			Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Hyphomonadaceae	Maricaulis	0	13	0	0	0	0	0
	Parvularculaceae	NA			1470	428	472	598	557	244	120	0		
	Deftluvicoccales	Uncultured			Uncultured	194	1394	2003	179	1258	1183	3170	1496	
	NA	NA			6	0	0	39	0	0	0	0		
	NA	NA			370	0	0	0	350	333	173	312		
	Rhizobiales	Rhizobiaceae			NA	895	0	363	2485	1181	1653	826	615	
	Stappiaceae	Roseitalea			588	928	2054	465	1037	728	1957	292		
	Stappiaceae	Labrenzia			0	50	45	40	0	5	0	0		
	Stappiaceae	Labrenzia			2	5	8	11	0	4	0	3		
	Stappiaceae	Labrenzia			1959	0	0	0	736	0	735	1402		
	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae			NA	0	0	0	0	0	0	20	186	
	Rhodobacteraceae	NA			12	87	0	12	0	3	0	0		
	Rhodobacteraceae	NA			18	960	975	0	0	97	0	0		
	Rhodobacteraceae	NA			44	17	34	96	0	129	0	0		
	Rhodobacteraceae	NA			558	685	364	1742	1020	1033	1174	0		
	Rhodobacteraceae	Roseovarius	0	0	0	67	0	0	0	0				
	Rhodobacteraceae	Roseovarius	0	7	87	3	223	76	331	443				
	Rhodobacteraceae	Roseovarius	0	172	282	0	0	0	35	0				
	Rhodobacteraceae	Roseovarius	233	26	0	117	35	63	0	147				
	Rhodospirillales	Thalassospiraceae	Thalassospira	11	0	0	0	0	4	0	0			
	Thalassospiraceae	Thalassospira	98	103	299	68	66	3	10	0				
	Thalassospiraceae	Thalassospira	3448	244	0	855	197	1563	34	1062				
	Rickettsiales	Mitochondria	Mitochondria	0	0	0	0	0	43	0	0			
	Thalassobaculales	Thalassobaculaceae	Thalassobaculum	396	29	96	361	59	273	22	0			
	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Aestuuriibacter	0	9	0	0	0	0	921	1664	
				Alteromonadaceae	Alteromonas	524	5087	5575	305	9	7	1725	0	
				Marinobacteraceae	Marinobacter	0	0	321	25	0	0	0	0	
				Marinobacteraceae	Marinobacter	0	1016	77	20	1207	0	625	1252	
				Marinobacteraceae	Marinobacter	11	0	0	0	0	87	0	0	
			Marinobacteraceae	Marinobacter	11	48	2	12	12	1075	778	1676		
			Cellvibrionales	Spongiibacteraceae	Spongiibacter	0	3	0	0	37	0	0	0	
			Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia-Shigella	0	0	0	0	2	0	0	0	
			K189A clade	K189A clade	K189A clade	258	4	0	0	0	0	0	0	
			Nitrosococcales	Methylphagaceae	Methylphaga	5	111	417	0	0	1450	0	0	
			Oceanospirillales	Alcanivoracaceae1	Alcanivorax	0	0	0	0	46	0	2	94	
			Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	0	0	0	70	501	4	0	6	
			Salinisphaerales	Algiphilaceae	Algiphilus	7	6	3	34	0	74	0	0	
			Steroidobacteriales	Woeseiaceae	Woeseia	267	859	3528	382	382	914	3570	406	

O valor taxonômico da identificação de micro-organismos pela análise de uma única região hipervariável do *rRNA* 16S (V4) é muito baixo, porém essa estratégia é amplamente empregada na ecologia microbiana. A técnica propicia a avaliação da comunidade no seu contexto geral, permitindo a estimativa da diversidade bacteriana em pesquisas descritivas ou experimentais. Dessa forma, a maior relevância dessa metodologia é o seu valor comparativo. A ampla difusão e padronização metodológica aumenta a confiabilidade e permite a comparação dos perfis microbianos de diferentes ambientes [110]. Nesse trabalho o uso de clonagem e sequenciamento Sanger foi a estratégia escolhida para aumentar a confiabilidade na classificação filogenética dos micro-organismos da comunidade detectados pela técnica de *NGS Illumina* dos cultivos CCMR0080 à CCMR0087. Aspectos sobre os resultados alcançados com a combinação das duas técnicas de sequenciamento, somadas ao esforço de isolamento de linhagens bacterianas em culturas puras, serão apresentados a seguir.

#### 1.5.2.1 Classe *Cyanobacteriia*

Todos os co-cultivos analisados apresentaram apenas uma espécie de cianobactéria, associada a uma comunidade de bactérias heterotróficas. Essa é a composição esperada para as linhagens de cianobactérias disponíveis em coleções de culturas e laboratórios. As linhagens CCMR0081 e CCMR0082 possuem genomas depositados no *GenBank*, que foram analisados por Walter et al (2020) e resultaram na descrição de uma nova espécie de cianobactéria, *Adonisia turfae* [6]. A nomenclatura da espécie ainda não possui validação pelo ICN ou INCP e, portanto, não possui o nome incluído na '*List of Prokary names with Standing in Nomenclature*' (LSPN). Por esse motivo as ASV do sequenciamento *Illumina* e as OTU representativas da clonagem do *rRNA* 16S (clones CCMR0081 121, CCMR0082 246 e CCMR0086 346) tiveram taxonomia assinalada como *Acrophormium* (*Silva-DB v.138*), tendo como referência a linhagem PCC7375.

As cianobactérias marinhas CCMR0081 e CCMR0082 possuem características genômicas e fisiológicas que podem determinar sua capacidade de adaptação às variações físico-químicas do ambiente [6]. Dentre esses atributos destacam-se a capacidade de fixação de nitrogênio, crescimento em temperaturas relativamente altas, aclimação cromática e a produção de metabólitos secundários [6]. Impactos ambientais, como a redução de herbivoria devido à pesca excessiva e aumento da matéria orgânica nos recifes de Abrolhos, somados à plasticidade das cianobactérias podem estar relacionados com a predominância dos *turfs* sobre os corais [6].

A fixação de carbono através da fotossíntese, a fixação biológica do nitrogênio e a possibilidade de metabólitos secundários atuarem em *quorum sensing* ou proteção contra herbivoria são alguns dos recursos que essas cianobactérias podem dispor em relações ecológicas, tanto no ambiente quanto nos microecossistemas em co-cultivos. Investigações específicas são necessárias para determinar quais vias metabólicas das cianobactérias marinhas são expressas em variadas condições ambientais e o como isso influencia suas relações com a cianosfera.

### 1.5.2.2 Classe *Phycisphaerae*

A classe *Phycisphaerae*, ordem *Phycisphaerales*, é a mais abundantes da cianosfera dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087. Apesar disso, não foram identificados representantes dentre os isolados em cultura pura e biblioteca de clones do *rRNA* 16S. As ASV foram atribuídas ao grupo SM1A02, dentro da família *Phycisphaeraceae*. SM1A02 é um grupo de micro-organismos descritos como 'uncultured'. A descrição formal da classe *Phycisphaerae* foi realizada a partir de uma linhagem isolada da alga marinha *Porphyra* sp. Sua ocorrência em ficosferas é reportada na literatura em co-cultivos de microalgas [111]. Outras linhagens cultiváveis da classe puderam ser isoladas a partir de *mats* de cianobactérias [112]. As espécies dessa classe podem ser aeróbias, anaeróbias facultativas ou anaeróbias obrigatórias, característica que pode determinar uma variedade de nichos dentro da organização da cianosfera [113].

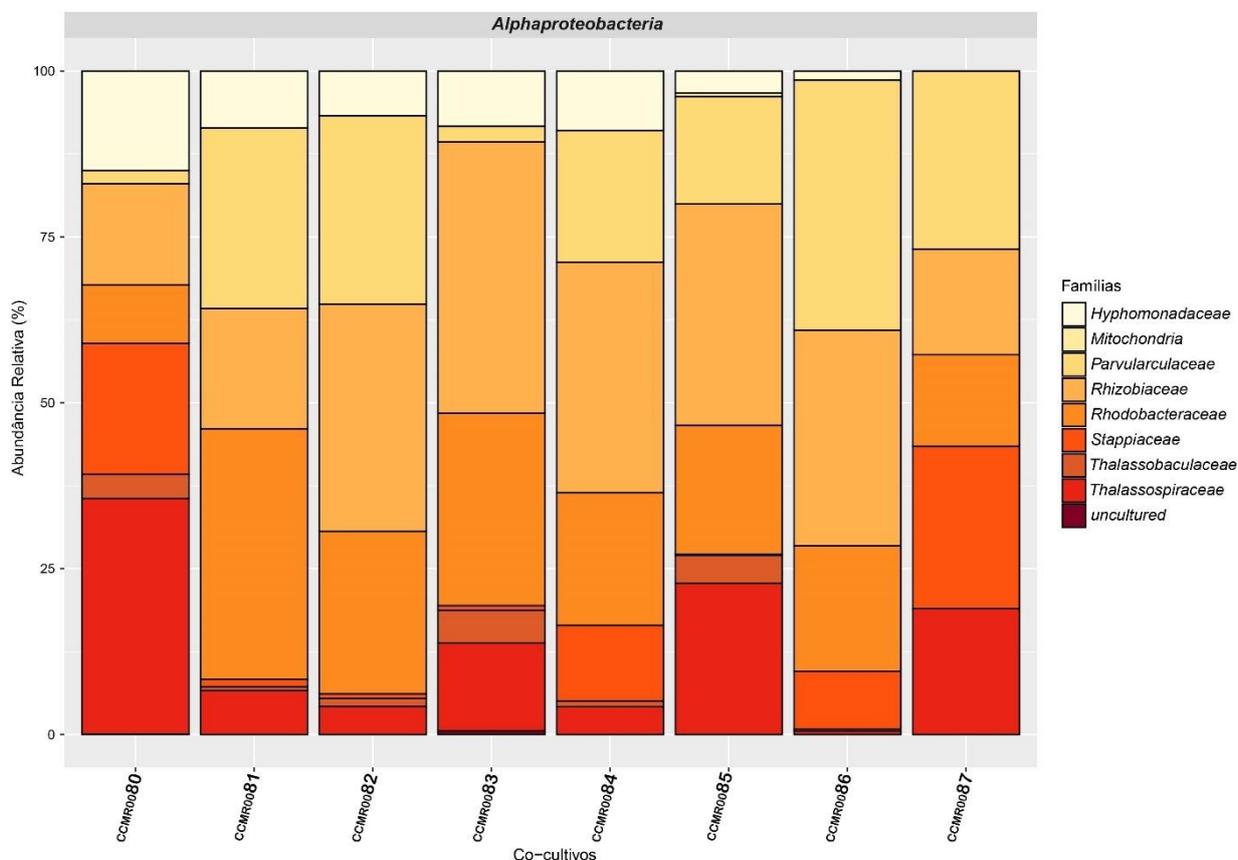
### 1.5.2.3 Classe *Alphaproteobacteria*

As *Alphaproteobacteria* formam um dos *taxa* mais ricos na cianosfera dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087 (Figura 1.13). A família *Rhodobacteraceae*, também conhecida como clado *Roseobacter*, é um dos grupos mais abundantes nos ambientes marinhos [114]. O sequenciamento da região V4 do *rRNA*16S não apresentou boa resolução para assinalar a taxonomia das ASV da família, apenas o gênero *Roseovarius* pode ser identificado. O sequenciamento Sanger após clonagem permitiu a identificação de OTU relativas aos gêneros *Mameliella* (clone CCMR0082 217) e *Salipiger* (clone CCMR0081 108). Entre as linhagens isoladas em cultura pura foram identificadas linhagens pertencentes aos gêneros *Mameliella* (linhagens B1 e J2), *Roseovarius* (linhagem B2), *Ruegeria* (linhagens G1 e K1) e *Salipiger* (linhagens E2 e H2). Dentre as linhagens, a cultura J2 foi escolhida para a realização de sequenciamento genômico.

O clado artificial *Roseobacter* tem papel relevante no ambiente marinho pela sua participação no ciclo do carbono e enxofre. Várias espécies são capazes de catabolizar o dimetilsulfoniopropionato (DMSP), que pode ser produzido por cianobactérias, algas e plantas [114–117]. Algumas espécies são capazes de realizar fotossíntese aeróbica anoxigênica (*AAP bacteria*), contribuindo com a fixação de carbono no microecossistema.

A ordem *Rhizobiales* está representada por duas famílias nos co-cultivos marinhos. Os *taxa* *Satappiaceae* e *Rhizobiaceae*, foram identificados tanto pelo sequenciamento NGS quanto pela clonagem do *rRNA* 16S (clones CCMR0086 398 e CCMR0086 337), nenhuma linhagem foi isolada em cultura pura. A ordem *Rhizobiales* possui espécies fixadoras de nitrogênio e patogênicas a humanos [118,119]. Esses micro-organismos podem contribuir para a fixação biológica do nitrogênio, cumprindo esse papel no ciclo biogeoquímico juntamente com as cianobactérias. Porém, existe a possibilidade da cianosfera ser um reservatório de micro-organismos patogênicos para os corais [120]. Ao se considerar o crescente impacto ambiental das ações antrópicas nos recifes de Abrolhos, aprofundar as

investigações sobre esses micro-organismos é importante também para a saúde pública, uma vez que a cianosfera pode vir a ser um reservatório de patógenos humanos.



**Figura 1.13.** Gráfico de barras indicando a abundância relativa (%) das ASV nas famílias da classe *Alphaproteobacteria* dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087. Cada família está representada um tom da cor laranja. A abundância relativa refere-se à soma total de ASV da classe *Alphaproteobacteria*.

*Caulobacterales* é uma das ordens de *Alphaproteobacteria* mais abundantes da cianosfera dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087, representada pelas famílias *Hyphomonadaceae* e *Parvularculaceae*. Apesar disso, foi identificada apenas em um clone da biblioteca de clones do *rRNA* 16s (clone CCMR0086 390). Nenhuma linhagem foi isolada em cultura pura. Alguns representantes da ordem já foram isolados a partir de amostras ambientais e co-cultivos de cianobactérias e de algas, uma de suas colaborações parece ser no metabolismo de vitaminas [121,122]. Membros das famílias *Hyphomonadaceae* e *Parvularculaceae* foram encontrados juntamente com a cianobactéria *Geitlerinema* sp. em co-cultivos provenientes de corais doentes de *Black Band Disease (BBD)* [123]. Assim, a compreensão das interações entre esses micro-organismos e suas contribuições para o ambiente faz-se necessária para determinar seus efeitos sobre os corais nos recifes de Abrolhos.

A ordem *Rhodobacterales* foi representada no cultivo pela família *Thalassospiraceae*, gênero *Thalassospira*, identificada nos co-cultivos apenas pelo sequenciamento *NGS* do marcador *rRNA* 16S. A ordem abriga espécies capazes de fixar nitrogênio, realizar fotossíntese anoxigênica e habitar ambientes extremos [124–126]. A ocorrência da família *Thalassospira* já foi descrita para alguns

ambientes marinhos em associação com hospedeiros, pouco é conhecido sobre a fisiologia e o papel dessas bactérias [126,127].

*Thalassobaculales* é uma ordem representada por apenas uma família e um gênero nos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087. Em estudo realizado em um estuário afetado por poluição com metais pesados, o gênero *Thalassobaculum* foi um dos *taxa* com maior redução populacional entre os pontos a montante e a jusante da fonte poluidora [128]. Esses fatos realçam a importância da manutenção desses micro-organismos em cultura, podendo ser utilizados como modelos experimentais para a simulação de eventos de origem antrópica ou natural e indicadores de condições ambientais. Porém, a literatura sobre esses micro-organismos é escassa, dificultando a discussão sobre sua dinâmica na cianosfera. O gênero está presente em quase todos os co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087.

A ordem *Defluviococcales* foi identificada pelo sequenciamento do *rRNA* 16S apenas em um cultivo. Não houve atribuição aos *taxa* de hierarquia inferior à ordem, pois a ASV apresentou identidade com bactéria '*uncultured*'. Bactérias da ordem foram capazes de fazer a desnitrificação e acumular glicogênio e polihidroxialcanoato (PHA) como substâncias de reserva [129]. Pouco se conhece sobre o grupo, porém se os metabolismos citados forem comuns a todos integrantes da classe, *Defluviococcales* poderia contribuir no ciclo do nitrogênio e carbono nos microecossistemas.

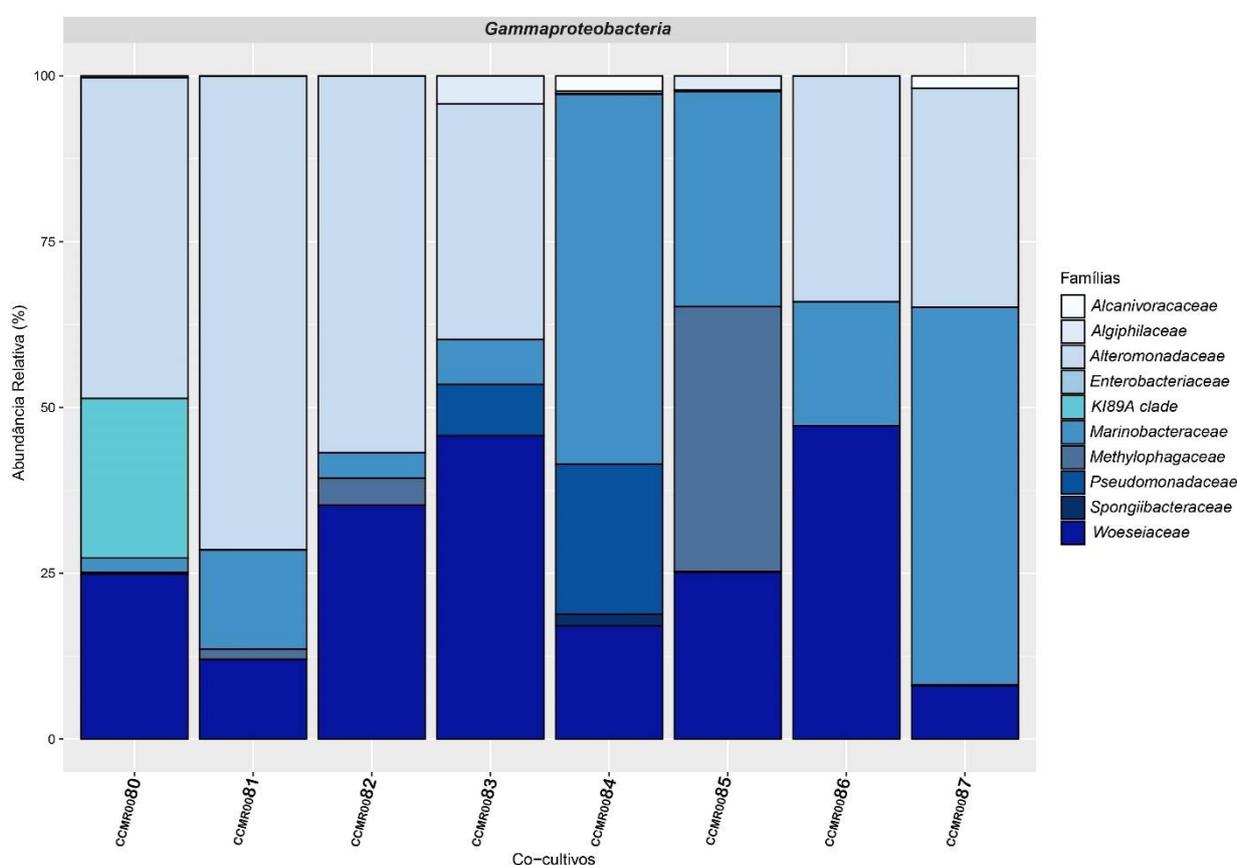
#### 1.5.2.4 Classe *Gammaproteobacteria*

A classe *Gammaproteobacteria* é abundante na cianosfera dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087 (Figura 1.14). Além do sequenciamento NGS, também foi possível identificar alguns membros da classe na biblioteca de clones do *rRNA* 16S (clones CCMR00852 231, CCMR0081 168, CCMR0082 219, CCMR 0081 123, CCMR0082 245, CCMR0086 311 e CCMR0081 152). Dentre as linhagens isoladas em culturas puras, seis delas pertencem a dois gêneros da classe, *Marinobacter* (linhagens E1, I, G2, K2 e I) e *Alteromonas* (linhagens D).

Representantes da ordem *Alteromonadales* foram identificados pelas 3 estratégias utilizadas nesse trabalho. Dentre os micro-organismos já descritos em cianosferas, a família *Alteromonadaceae* é um dos mais conhecidos e estudados. Em trabalho com a cianobactéria do gênero *Prochlorococcus* uma linhagem da bactéria do gênero *Alteromonas* foi identificada como uma '*helper-bacteria*', favorecendo o crescimento da cianobactéria. Com o avanço das pesquisas sobre essa associação, identificou-se uma simbiose onde a cianobactéria depende de *Alteromonas* sp. para a quebra do peróxido de hidrogênio, pois não possui os genes que codificam a enzima catalase [67,68]. Em experimento de exposição de linhagem de *Prochlorococcus* sp. a longos períodos de escuro, houve a indicação de que nessas condições a linhagem de *Alteromonas* sp. é a responsável pela manutenção de vias bioquímicas essenciais naquele microecossistema [56]. Em laboratório observou-se que os co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087 permanecem viáveis e com bom aspecto, mantendo sua coloração púrpura por longos períodos, desde que mantidas no escuro. A possível contribuição do gênero

*Alteromonas* nesse processo de resiliência dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087 é um aspecto interessante que pode ser investigado posteriormente.

*Marinobacteraceae* (gênero *Marinobacter*) e *Alcanivoracaceae* (gênero *Alcanivorax*) são famílias que possuem a capacidade de degradar hidrocarbonetos [130,131]. Algumas cianobactérias produzem hidrocarbonetos, assegurando uma fonte de carbono para essas bactérias nos oceanos [132]. O gênero *Marinobacter* foi atribuído a três isolados bacterianos em cultura pura. Bactérias do gênero *Alcanivorax* são degradadoras obrigatórias de hidrocarbonetos (OHCB), portanto o cultivo desses micro-organismos demanda meios de culturas com fontes de carbonos específicas e em baixas concentrações. De maneira similar, a família *Algiphilaceae* é formada por uma espécie do grupo OHCB. Essa especificidade nutricional pode estar relacionada com a baixa abundância do grupo nos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087.



**Figura 1.14.** Gráfico de barras indicando a abundância relativa (%) das ASV nas famílias da classe *Gammaproteobacteria* dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087. Cada família está representada um tom da cor azul. A abundância relativa refere-se à soma total de ASV da classe *Gammaproteobacteria*.

O clado *KI89A* faz parte de um grupo chamado Gamaproteobactérias Oligotróficas Marinhas (*Marine Oligotrophic Gammaproteobacteria* - *OMG*). A maioria das espécies do grupo foram identificadas apenas por técnicas independentes de cultivos, por isso sua taxonomia não está completamente estabelecida [112]. *KI89A* é um clado que ainda não possui nenhum genoma disponível nas bases de dados, sua posição filogenética é baseada apenas em sequências do *rRNA* 16S. ASV

correspondente ao clado pode ser identificada apenas em dois co-cultivos, CCMR0080 e CCMR0081. Na biblioteca de clones do *rRNA* 16S não há nenhuma *OTU* referente ao grupo. Se confirmadas as presenças dessas bactérias nos co-cultivos, a investigação mais aprofundada das CCMR0080 à CCMR0087 pode contribuir para uma melhor caracterização do clado KI89A.

A família *Methylophagaceae* (gênero *Methylophaga*) é a representante da ordem *Nitrosococcales* nas cianosferas analisadas. A ASV do grupo aparece em quatro co-cultivos: CCMR0080, CCMR0081, CCMR082 e CCMR0085. Nenhum representante da família foi identificado nas linhagens isoladas em culturas puras e biblioteca de clones *rRNA* 16S. Assim como alguns representantes do clado clado *Roseobacter*, o grupo participa dos ciclos biogeoquímicos do enxofre e nitrogênio. Algumas espécies são capazes de realizar a redução do nitrato a nitrito e redução de dimetilsulfóxido (DMSO) a dimetilsulfeto (DMS) [133,134].

A família *Woeseiaceae* aparece como um dos *taxa* prevalentes na cianosfera dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087. Apesar da sua presença em todos os co-cultivos, detectada pelo marcador *rRNA* 16S, nenhuma linhagem foi isolada em cultura pura. O grupo possui apenas uma única espécie descrita, *Woeseia oceani* [135]. A família é globalmente distribuída no sedimento dos oceanos [136]. A descrição de possíveis metabolismos desses micro-organismos indica sua participação nos ciclos do nitrogênio e enxofre, realizando a oxidação do tiosulfato e redução do nitrito [137]. Até o momento, representantes da família *Woeseiaceae* foram detectados apenas em sedimentos marinhos.

A ordem *Cellvibrionales*, representada pela família *Spongiibacteraceae*, foi detectada apenas em dois co-cultivos (CCMR0081 e CCMR0084). Uma espécie do gênero *Spongiibacter*, *S. tropicus*, foi isolada a partir de co-cultivo da cianobactéria *Synechococcus* [138]. Porém não existe informação sobre o seu papel naquela comunidade.

*Pseudomonadaceae* é uma das famílias identificadas apenas pelo sequenciamento NGS do *rRNA* 16s, presente apenas em três co-cultivos (CCMR0083, CCMR0084 e CCMR0085). *Pseudomonas aeruginosa* foi uma das primeiras espécies de bactéria heterotrófica descritas na cianosfera, em co-cultivo de *Anabaena* sp. em 1982 [139]. Alguns compostos provenientes de cianobactérias, como exopolissacarídeos, são capazes de reduzir a formação de biofilme e inibir *quorum sensing* em *Pseudomonas* [140]. As interações do grupo na cianosfera ainda não foram elucidadas. A família *Pseudomonadaceae* engloba várias espécies e linhagens patogênicas a humanos, portanto novamente destaca-se a necessidade de monitoramento dos *turfs* diante da possibilidade de serem um reservatório desses patógenos. Nessa perspectiva, a presença de ASV atribuída à família *Enterobacteriaceae* no co-cultivo CCMR0084 corrobora com essa demanda.

#### 1.5.2.5 Classe *Bacteroidia*

O filo *Bacteroidota* está entre os *taxa* abundantes nos co-cultivos marinhos. O *rRNA* 16S referente ao gênero *Muricauda* foi identificado em todos os co-cultivos avaliados, tanto pelo sequenciamento NGS *Illumina* quanto na biblioteca de clones (clones CCMR0081 173, CCMR0082 202

e CCMR0086 303). Dentre as linhagens de bactérias heterotróficas isoladas em cultura pura, 5 linhagens apresentaram o *rRNA* 16S com identidade maior que 95% com espécies do gênero *Muricauda* (linhagens A, C, F, H1 e J1). Dentre essas, a linhagem *Muricauda-K001* foi escolhida para sequenciamento do genoma, considerando sua menor identidade com *rRNA* 16S de outras bactérias do gênero disponíveis no *GenBank*.

O gênero *Muricauda* já foi descrito em co-cultivos de cianobactérias e microalgas, indicando que sua presença na ficosfera é recorrente [141–143]. Em experimentos realizados com linhagens de *Muricauda* spp. a correlação das taxas de crescimento com as linhagens autotróficas não foi uniforme [141,143,144]. A influência sobre as cianobactérias ou algas depende das espécies envolvidas e das condições ambientais [145]. Esses aspectos reforçam a necessidade de investigações aprofundadas em co-cultivos disponíveis em coleções de culturas, especialmente quando oriundos de ambientes de alta biodiversidade, como os recifes de Abrolhos.

O grupo *Bacteroidia* é um dos listados como responsáveis pela ciclagem de matéria orgânica em florações de algas [146]. Algumas espécies do grupo foram isoladas a partir de ambientes contaminados com derivados de petróleo ou reatores com hidrocarbonetos, indicando o potencial repertório do grupo em enzimas capazes de metabolizar fontes de carbono recalcitrantes [147–150]. A associação de bactérias do gênero *Muricauda* pode ter relação com sua capacidade de degradação de exudados e exopolissacarídeos produzidos pelas cianobactérias.

A heterogeneidade dos ambientes onde *Muricauda* spp. foram isoladas também chama a atenção. Águas superficiais, sedimento, profundidade maiores que 1000m, fontes termais, Antártida são alguns exemplos de locais onde já foram encontradas [147,149,151–154]. Essa plasticidade do gênero é aspecto relevante e pode ter influência sobre a predominância dos *turfs* nos recifes de Abrolhos. Variações na temperatura da água e outros impactos prejudiciais aos corais podem favorecer o alastramento dos *turfs*, uma vez que os micro-organismos que formam esse holobionte são mais resilientes a essas mudanças ambientais.

#### 1.5.2.6 Classe *Polyangia*

A classe *Polyangia* foi representada apenas por uma ASV, atribuída à família *Sandaracinaceae*. A família apresenta apenas um gênero e uma espécie descrita formalmente na literatura, *Sandaracinus amylolyticus* [155]. A espécie é capaz de degradar amido, um polissacarídeo de reserva que pode ser produzido por cianobactérias fixadoras de nitrogênio [156,157]. A espécie é incapaz de viver em meio de cultura sem fonte de vitamina B12 [155]. A ASV atribuída à *Sandaracinaceae* pode indicar a presença nos cultivos de bactéria dessa família com metabolismo similar e que se beneficie das fontes de carbono e vitaminas produzidas pelas cianobactérias e outros membros da cianosfera.

#### 1.5.2.7 Classe *Planctomycetes*

A ordem *Planctomycetales* é a única representante da classe *Planctomycetes* nos co-cultivos marinhos. O gênero *Gimesia* foi proposto a partir de um isolado marinho proveniente do estado do Rio de Janeiro – Brasil. As células desse gênero possuem um pedúnculo, formado por várias fibras, que pode ser utilizado para fixação em superfícies [158,159]. Essa característica pode favorecer a ocorrência do grupo em cianosferas. O grupo possui via metabólica para a oxidação de metilfosfonato e hidroximetilfosfonato como fonte de fósforo para as células [160,161]. O fósforo é um recurso escasso no ambiente marinho, é possível que a contribuição do gênero na cianosfera dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087 esteja atrelado ao fornecimento de fósforo.

#### 1.5.2.8 Classe *Bacilli*

A classe teve representantes identificados apenas pelo sequenciamento *NGS* do *rRNA* 16S e ocorrência rara nos co-cultivos. *Bacillus* é um gênero de bactérias ubíquo, de distribuição ampla e com grande repertório de metabólitos secundários. *Bacillus* podem produzir compostos antibiofilme como estratégia de se estabelecer como cultura única [162]. *Effusibacillus* é um gênero de bactérias termófilas (temperatura ideal 50-52°C), anaeróbias facultativas e formadoras de esporos [163]. Nos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087 ambos os gêneros podem ser competidores ou oportunistas que estão em condições ambientais desfavoráveis.

### 1.5.3 Delineamento de possíveis interações nos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087

A avaliação de características descritas em bactérias dos *taxa* presentes nos ecossistemas permitiu a prospecção de vias metabólicas que se complementam, se opõem ou se sobrepõem. Respeitando-se o limite das técnicas utilizadas, é possível delinear uma interação teórica entre os micro-organismos.

A primeira interação importante entre organismos do fitoplâncton e bacterioplâncton é a fixação de carbono e o fluxo de energia. Os fotoautotróficos fixam o carbono em moléculas orgânicas, que consumidas pelos heterotróficos iniciam o fluxo de energia pela cadeia trófica [164]. A fixação do carbono ganha um reforço nos co-cultivos com a presença de bactérias das famílias *Rhodobacteraceae* e *Thalassospiraceae*, capazes de realizar fotossíntese anoxigênica.

O carbono ao ser fixado pode ser disposto em moléculas de fácil processamento ou compostos como amido, hidrocarbonetos ou PHA. Apenas determinados micro-organismos são capazes de clivar esses componentes recalcitrantes de carbono, permitindo a continuidade do fluxo de matéria e energia desse elemento. Bactérias da ordem *Defluviococcales* e as famílias *Sandaracinaceae*, *Marinobacteraceae* e *Algiphilaceae* representam grupos com essa capacidade. *Sandaracinaceae* é uma família composta por uma única espécie que depende de fonte exógena de vitamina B12, molécula que representantes da ordem *Caulobacterales* são capazes de produzir.

O nitrogênio é um recurso importante e escasso no ambiente marinho. Além das cianobactérias, bactérias da família *Thalassospiraceae* e da ordem *Rhizobiales* parecem contribuir para a fixação biológica do nitrogênio. Em outras etapas do ciclo desse elemento, membros da família *Methylophagaceae* são capazes de realizar a redução do nitrato a nitrito. A redução do nitrito a óxido nítrico pode ser realizada por grupos dos taxa *Woeseiaceae* e *Defluviococcales*.

O fósforo é outro recurso limitante no oceano. Bactérias do gênero *Gimesia* são capazes de disponibilizar fósforo no ambiente a partir da oxidação de compostos de enxofre. O clado *Roseobacter* e a família *Methylophagaceae* participam do ciclo do enxofre, clivando DMSP e reduzindo DMSO a DMS.

Os metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias podem cumprir o papel de coordenar toda essa complexa e dinâmica rede metabólica. O metabolismo secundário também é destaque em grupos capazes de produzir pigmentos como o clado *Roseobacter* e o gênero *Muricauda*. *Pseudomonas* e *Bacilli* também são proeminentes na produção de metabólitos secundários, mas aqui é possível que ocorra uma relação antagônica ou oportunista.

Danos celulares e adaptação a situações como a ausência de luz parecem destacar a participação de *Alteromonadaceae* no co-cultivo.

Os micro-organismos dos co-cultivos possuem metabolismos complexos que podem resultar em interações intrincadas. As possibilidades apresentadas acima são apenas algumas alternativas a serem avaliadas. A complexidade presumida desses co-cultivos pode resultar na resiliência do core bacteriano que faz parte dos *turfs*. Assim, avançar na compreensão da dinâmica dessas comunidades é fundamental para elucidar questões ambientais complexas como a mudança de fase nos recifes de Abrolhos.

## 1.6 Conclusões

As cianosferas das cianobactérias dos recifes de Abrolhos apresentam, em hierarquia taxonômica alta, composição similar à cianosfera de outras espécies do filo *Cyanobacteria*. A abordagem com mais de uma técnica para a avaliação do *rRNA* 16S proporcionou maior precisão na classificação filogenética de bactérias abundantes nos co-cultivos, ao passo que permitiu também a detecção das bactérias raras. A presença de sequências de *rRNA* 16S classificadas em *taxa* que possuem poucas espécies descritas, ou ainda poucos *child taxa* e *ASV* assinadas como '*Uncultured*' comprovam a complexidade desses co-cultivos. O entendimento das dinâmicas metabólicas e populacionais dentro dessas comunidades, que formam o *core* bacteriano dos *turfs*, é essencial para elucidar as questões ambientais relacionadas à prevalência da formação em relação aos corais em Abrolhos e outros recifes. O isolamento de linhagens de bactérias a partir das cianosferas permite avanços em pesquisas ecológicas, biotecnológicas e taxonômicas.

Os resultados alcançados nesse capítulo propiciaram uma visão minuciosa sobre os co-cultivos das cianobactérias dos *turfs* de Abrolhos. Assim, tornam-se o ponto de partida para qualquer pesquisa a respeito desses micro-organismos. Nesta tese, os capítulos dois e três apresentam avanços alcançados na investigação genômica ou fenotípica das cianobactérias e linhagens de bactérias heterotróficas isoladas a partir dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087.

## Capítulo 2 – Caracterização genômica de bactérias presentes em co-cultivos de cianobactérias dos recifes de Abrolhos.

### 2.1 Introdução

A avaliação da comunidade bacteriana associada às cianobactérias dos *turfs* dos recifes de Abrolhos permitiu a determinação de quais grupos estão presentes nos co-cultivos. Apesar da composição taxonômica em níveis hierárquicos altos apresentar padrão semelhante a outros co-cultivos de cianobactérias, a complexidade taxonômica em níveis hierárquicos mais baixos e a riqueza funcional da comunidade só pode ser acessada por meio da avaliação de características genômicas dos micro-organismos presentes nos co-cultivos. A interação entre cianobactérias e bactérias heterotróficas é uma das relações mais importantes no ambiente aquático. Em primeira ordem a interação está baseada na troca de carbono e ciclagem de nutrientes. Cianobactérias realizam fotossíntese, fixando carbono utilizando energia luminosa, e oferecem moléculas orgânicas às bactérias que, por sua vez, fazem a ciclagem de nutrientes, através da remineralização de macromoléculas [50]. Porém, as relações estabelecidas entre esses organismos ainda são pouco conhecidas e podem ser muito mais elaboradas e específicas do que a simples relação de troca de recursos na cadeia trófica [50]

Os avanços tecnológicos com relação ao sequenciamento de ácidos nucleicos e processamento de dados têm ditado o ritmo dos avanços na microbiologia moderna. A tal ponto onde até as áreas mais clássicas, como a taxonomia, demandam o sequenciamento genômico para a descrição de novos *taxa* [165]. As análises *in silico* viabilizam a padronização de métricas em estudos comparativos, como a filogenia, e otimizam recursos nas áreas aplicadas, como a bioprospecção de novos compostos microbianos. Porém, o estabelecimento de culturas de micro-organismos em condições reprodutíveis continua sendo indispensável para a validação de informações e principalmente para os progressos biotecnológicos.

Os recifes de Abrolhos são considerados como a área de maior biodiversidade do Atlântico Sul [3,166]. As cianobactérias são micro-organismos de fisiologia e genomas diversificados, que possuem cianosferas de composição rica e diversa. Diante dessas características e da disponibilidade dos co-cultivos de cianobactérias e de culturas puras de bactérias da cianosfera, nesse capítulo ferramentas genômicas serão utilizadas para o estudo de características desses micro-organismos. Dessa maneira, espera-se contribuir com (i) a identificação precisa da taxonomia das linhagens analisadas, (ii) análise de possíveis interações, com base na composição genômica das linhagens e (iii) prospecção de aplicações biotecnológicas dos micro-organismos integrantes dos co-cultivos.

## 2.2 Objetivos

### 2.2.1 Objetivo geral

Avaliar, a partir de dados genômicos e metagenômicos, as características de cianobactérias e bactérias heterotróficas dos recifes de Abrolhos que permitem a interação desses micro-organismos na cianosfera.

### 2.2.2 Objetivos específicos

Realizar o sequenciamento genômico de linhagens de bactérias isoladas a partir dos co-cultivos de cianobactérias dos *turfs* de Abrolhos, utilizando diferentes plataformas de sequenciamento *NGS*, *Illumina* e *Oxford Nanopore Technologies*.

Realizar a montagem dos genomas de bactérias heterotróficas isoladas em cultura pura e analisar os genomas montados a partir de dados metagenômicos.

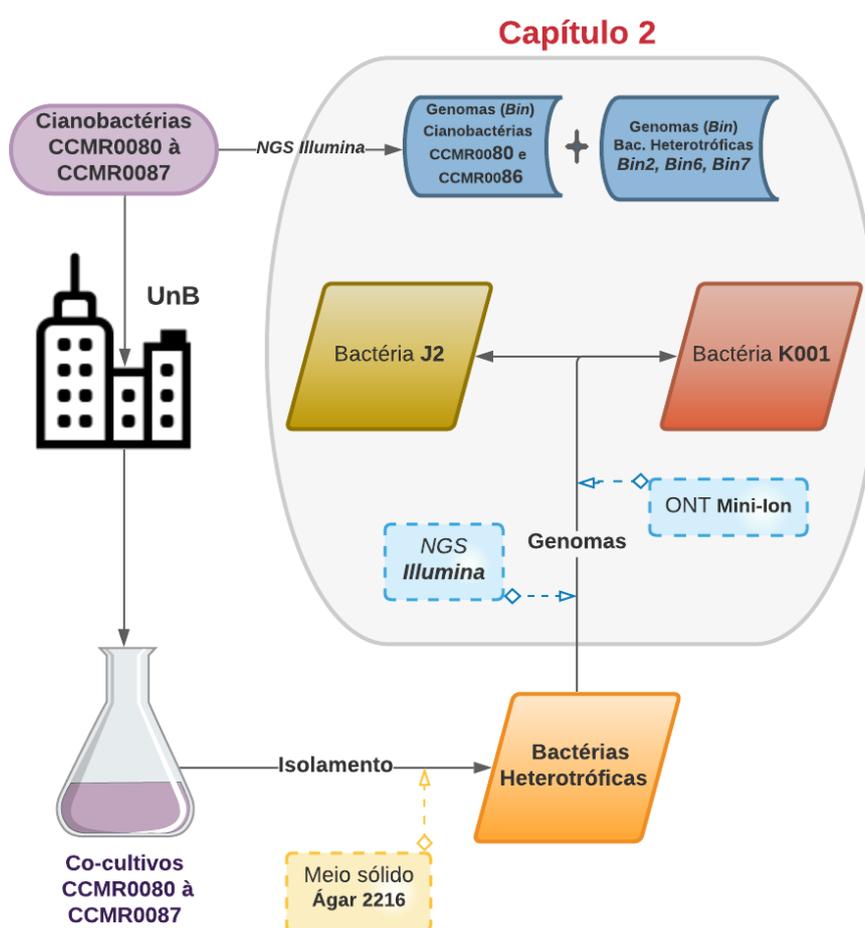
Determinar a posição taxonômica de bactérias heterotróficas das cianosferas dos co-cultivos de cianobactérias de Abrolhos através de critérios filogenômicos.

Avaliar características funcionais dos genomas de cianobactérias e bactérias heterotróficas presentes nos co-cultivos.

## 2.3. Materiais e métodos

### 2.3.1 Fluxograma metodológico

A figura 2.1 apresenta o fluxograma das análises apresentadas no capítulo 2 dessa tese. Os genomas de duas linhagens de bactérias heterotróficas isoladas em cultura pura a partir dos co-cultivos de cianobactérias dos *turfs* de Abrolhos foram sequenciados. Os sequenciamentos dessas duas linhagens (K001 e J2) foram realizados com duas tecnologias: *NGS Illumina* e *Oxford Nanopore Technology (ONT)*. A partir de sequências genômicas geradas em trabalhos anteriores pelos colaboradores da UFRJ, e ainda não publicadas, foram obtidos os genomas de duas cianobactérias (CCMR0080 e CCMR0086) e os genomas de 3 bactérias heterotróficas (aqui nomeadas de *bin2*, *bin6* e *bin7*). Esses sete genomas foram avaliados quanto a sua qualidade, taxonomia e características funcionais, a fim de caracterizá-los e estimar possíveis relações entre as bactérias e cianobactérias presentes nos co-cultivos provenientes dos *turfs* de Abrolhos.



**Figura 2.1.** Fluxograma indicando as metodologias utilizadas para alcançar os resultados apresentados no capítulo 2.

### 2.3.2 Isolamento de bactérias heterotróficas

Conforme metodologia exposta no item 1.4.3, algumas bactérias heterotróficas presentes na cianosfera das cianobactérias CCMR0080 à CCMR0087 provenientes dos recifes de Abrolhos foram isoladas em cultura pura. Dentre as 17 linhagens de bactérias isoladas, duas foram escolhidas para sequenciamento genômico total. A linhagem *K001*, que foi escolhida pois estava presente em todos os co-cultivos, apresenta pigmentação da colônia amarela, indicando a produção de metabólitos secundários e possíveis aplicações biotecnológicas. A linhagem *J2* foi escolhida pois foi um morfotipo colonial presente apenas na cianosfera de CCMR0086 e apresentou sequência parcial do *rRNA* 16S similar a quatro linhagens distintas de bactérias do clado *Roseobacter*, indicando que poderia tratar-se de uma bactéria ainda não descrita na literatura.

### 2.3.3 Extração e purificação de DNA das linhagens *K001* e *J2*

O DNA genômico foi obtido a partir de cultura em meio sólido. A extração foi realizada com o kit comercial '*GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*', Sigma-Aldrich, com o auxílio do homogenizador de alta potência '*FastPrep*' na etapa de lise celular. A eficiência da extração foi avaliada em gel de agarose (1% v/v). A quantificação do DNA foi realizada com o fluorômetro *Qubit* (Invitrogen, USA) através do kit *dsDNA BR Quant-it assay kit* (Invitrogen).

### 2.3.4 Sequenciamento do genoma total das linhagens *K001* e *J2*

#### 2.3.4.1 Sequenciamento em plataforma NGS Illumina

O sequenciamento NGS Illumina foi realizado em parceria com a *DNA Services Facility* (*Research Resources Center, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois, USA*). A biblioteca de DNA foi preparada utilizando *Nextera XT kit* (Illumina) e o sequenciamento foi realizado em plataforma *NextSeq500*, gerando *reads paired-end* de 150 pares de base [167].

#### 2.3.4.2 Sequenciamento Oxford Nanopore Technologies

O sequenciamento NGS com tecnologia *long reads* foi realizado em plataforma *Oxford Nanopore Technologies (ONT)* (Oxford, UK). A biblioteca de DNA foi preparada com o *Rapid Sequencing Kit (SQK-RAD004)* e o sequenciamento foi realizado em *Flow cell FLO-MINSP6* no dispositivo *MinION (MIN-101B)*. Os dados brutos foram gerados em formato *FAST5*.

#### 2.3.4.3 Análise de dados e montagem dos genomas

Os dados brutos do sequenciamento NGS Illumina passaram por limpeza com o pacote de dados *Trimmomatic* [168] para retirada de sequências dos adaptadores, eliminação de *reads forward* e

*reverse* não-pareados e das sequências com *Phred score* menor do que 20 [169]. A montagem *de novo* de um *draft genome* foi realizada com o programa *SPADES* (v. 3.11.1) [170], para confirmação da identidade da linhagem e posterior mapeamento dos *long reads*.

Os dados brutos do sequenciamento *NGS ONT* passaram pelo processo de *base-calling* através do programa *Guppy* em modo de alta acurácia [171]. Os *long reads* passaram por alinhamento para melhorar a precisão de montagem de sequências contíguas com o *Nanopolish* [172] e montados com o programa *Canu* [173]. Os *contigs* foram transferidos para o *software Geneious* (v. 11.0.2) e mapeados contra um genoma de referência com o algoritmo de mapeamento (*mapper*) *Geneious*, no modo de alta sensibilidade com três iterações. Para a linhagem *K001*, foi possível utilizar a o genoma da própria linhagem, obtido com os *reads Illumina* e depositado no *GenBank* (*QBTW01000000.1*), como referência para o mapeamento dos *long reads*. Para a linhagem *J2* o genoma montado com os dados *Illumina* da própria linhagem não possuía qualidade satisfatória (>300 *contigs*). Logo, foi utilizada como referência para o mapeamento o genoma da bactéria do mesmo gênero disponível nos bancos de dados, *Mameliella alba* (*GenBank NZ\_AP022337.1*). Após o mapeamento, foi definida a ordem dos *contigs* e os genomas montados foram curados com os *reads* pareados do sequenciamento *NGS Illumina*.

### 2.3.5 Banco de dados local (UFRJ - UnB)

Este trabalho foi realizado através de parceria estabelecida com o grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia – CCS / UFRJ. As pesquisadoras e pesquisadores do grupo foram responsáveis pelo isolamento das cianobactérias CCMR0080 à CCMR0087 e depósito em coleções de cultura. Em trabalhos anteriores foram gerados os dados de sequenciamento dos co-cultivos das cianobactérias. Alguns dos metagenomas gerados foram disponibilizados e serão utilizados em algumas análises realizadas nesse capítulo.

Os detalhes sobre a montagem dos genomas podem ser acessados em *Walter et al* (2020) [6]. De maneira simplificada, os dados brutos foram gerados em plataforma *NGS Illumina MiSeq* com *reads paired-ends* de 250 pb. Por se tratar de amostras de metagenomas, as montagens (*assembly*) envolvem mais etapas para que possam ser gerados genomas a partir de metagenomas, processo conhecido como *bin*. As ferramentas que permitem essas montagens envolvem a análise de tetranucleotídeos, conteúdo GC(%) e taxonomia das sequências. Duas ferramentas utilizadas para montar as *bins* analisadas nesse trabalho foram o *Emergent self-organizing maps (ESOM)* [174] e o *MetaBAT2* [175].

Os arquivos de extensão *.fasta* correspondente ao genoma das cianobactérias CCMR0080, CCMR0086 e três *bins* de bactérias heterotróficas (*bin2*, *bin6* e *bin7*), montadas a partir do metagenoma do co-cultivo CCMR0086) serão utilizados em algumas análises funcionais, juntamente com os genomas obtidos a partir das culturas puras.

### 2.3.6 Avaliação da qualidade das montagens de genomas e bins

Todos os genomas foram avaliados para averiguação de parâmetros de qualidade das montagens. O *software CheckM* foi utilizado para determinação de sequências contaminantes e completude dos genomas [176]. A cobertura dos *reads Illumina* e *ONT* foi determinada por mapeamento dos *reads*, após limpeza, contra os genomas com o *software Geneious* (v. 11.0.2) utilizando o *mapper Geneious*. A média de cobertura para cada nucleotídeo foi calculada [96,97]. Os parâmetros *L50* e *N50* foram obtidos com o programa *Quast* [177].

### 2.3.7 Classificação taxonômica baseada em genomas

A classificação taxonômica das bactérias e confirmação da identidade das cianobactérias foi realizada na plataforma *TYGS – DSMZ*, pela hibridização digital dos *DNA (DDH)* no servidor *GGDC – DSMZ* e pelo software *GTDB-Tk* (v. 1.7.0), disponibilizado na plataforma *Kbase* [178–183].

### 2.3.8 Predição de genes e anotação funcional

A anotação do genoma foi realizada com o *software Prokka* (v. 1.14.5) [184] que utiliza os seguintes pacotes para anotação geral: *Prodigal* [185]- predição de genes; *Barnap* e *RNAmmer* [186] – identificação de *rRNA*; Aragon [187] – identificação de *tRNA*; *Blast+* [188]- anotação de proteínas baseada banco de dados; *HMMER3* [189] - busca de similaridades entre famílias de proteínas; *SigalP* [190] – identificação de peptídeo sinal nas sequências codantes; *Infernal* [191]– identificação de *RNA* não codante (*ncRNA*); *minced* [192] – identificação de *CRISPR* e *TBL2ASN* – formatação para depósito de sequências na *GenBank*.

As categorias funcionais baseadas na classificação *COG (Clusters of Orthologous Groups)* foram obtidas pela versão *on-line* do *eggNOG-mapper v.2* [193], vias metabólicas e genes de interesse foram comparados ao banco de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)* [194]. O *software AntiSMASH* (v. 6.0) [195] foi utilizado para a identificação de genes e *clusters* gênicos relacionados ao metabolismo secundário dos micro-organismos. Algumas anotações funcionais foram avaliadas com o aplicativo *FAMA* dentro da plataforma *KBase* [181,196].

## 2.4 Resultados e Discussão

As estatísticas gerais sobre a estrutura dos genomas sequenciados estão apresentadas na Tabela 1. Os genomas das linhagens *Muricauda-K001* e J2 puderam ser fechados em apenas um *contig* devido à associação de duas tecnologias de sequenciamento, *short-reads* e *long-reads*. Os genomas das cianobactérias CCMR0080 e CCMR0086 estão ordenados em 14 e 101 *contigs*, respectivamente. Essa diferença no número dos *contigs* pode estar relacionada à qualidade do sequenciamento de cada amostra ou diferentes estratégias de montagens. A partir dos dados gerados para o sequenciamento genômico da cianobactéria CCMR0086 foi possível a montagem de mais seis genomas de bactérias heterotróficas, sendo que três deles (*bin2*, *bin6* e *bin7*) apresentaram boa qualidade, com baixos valores de contaminação (<5%) e boa completude (>70%).

**Tabela 2.1.** Estatísticas das montagens dos genomas das linhagens isoladas em cultura pura J2 e K001 e dos genomas montados a partir de DNA metagenômico extraído dos co-cultivos CCMR0080, CCMR0086, *bin2*, *bin6* e *bin7*. (\*) dado não identificado na anotação, (-) dado não avaliado.

	<b>J2</b>	<b>K001</b>	<b>Bin 2</b>	<b>Bin 6</b>	<b>Bin 7</b>	<b>CCMR0080</b>	<b>CCMR0086</b>
<b>Número de contigs</b>	1	1	313	947	45	14	101
<b>Maior contig</b>	5363919	3803919	29361	40414	817601	7613668	640824
<b>Tamanho total</b>	5363919	3803919	2380484	6083495	4183311	8762571	8470623
<b>N50</b>	5363919	3803919	9635	7571	117102	7613668	158040
<b>L50</b>	1	1	80	265	8	1	15
<b>Contaminação (%)</b>	0,15	0,65	0	3,65	0,3	2,99	1,36
<b>Completude (%)</b>	98,69	99,34	70,69	88,26	99,57	99,46	99,64
<b>CDS</b>	5205	3364	2456	5208	3847	7447	7247
<b>rRNA</b>	9	6	*	*	3	6	*
<b>tRNA</b>	54	39	29	35	43	61	54
<b>tmRNA</b>	-	1	1	1	1	1	1
<b>misc. RNA</b>	28	13	*	*	*	36	40
<b>Cobertura Illumina</b>	50x	274x	-	-	-	-	-
<b>Cobertura ONT</b>	9x	33x	-	-	-	-	-
<b>GC (%)</b>	65,15	41,68	51,1	40,7	57,49	47,51	47,3

Os genomas aqui apresentados ilustram dois aspectos que estão diretamente relacionados aos progressos da microbiologia ambiental nos últimos anos: o aprimoramento de tecnologias de sequenciamento, que reflete em melhores montagens e redução de custos; e o avanço das tecnologias de processamento de dados, que permite a resolução de sequências mesmo em amostras complexas [42]. A associação de duas diferentes tecnologias, *Illumina* e *ONT*, permite uma montagem muito próxima do completo para genomas de bactérias cultivadas, com boa qualidade e boa cobertura. Os dados *long reads* utilizados para os genomas de *Muricauda-K001* e J2 foram gerados em colaboração

com pesquisadores dos laboratórios de Virologia e Fitopatologia do IB-UnB, com equipamento e consumíveis de relativo baixo custo. Para os co-cultivos CCMR0080 e CCMR0086 foram utilizados apenas *short reads* e o desenho experimental foi executado com esforço de sequenciamento voltado para a montagem dos genomas das cianobactérias (*cyn80* e *cyn86*). Ainda assim, com o aprimoramento dos *softwares*, foi viável o aproveitamento dos dados para a análise dos genomas de três bactérias heterotróficas [175]

### 2.4.1 Taxonomia baseada em genomas

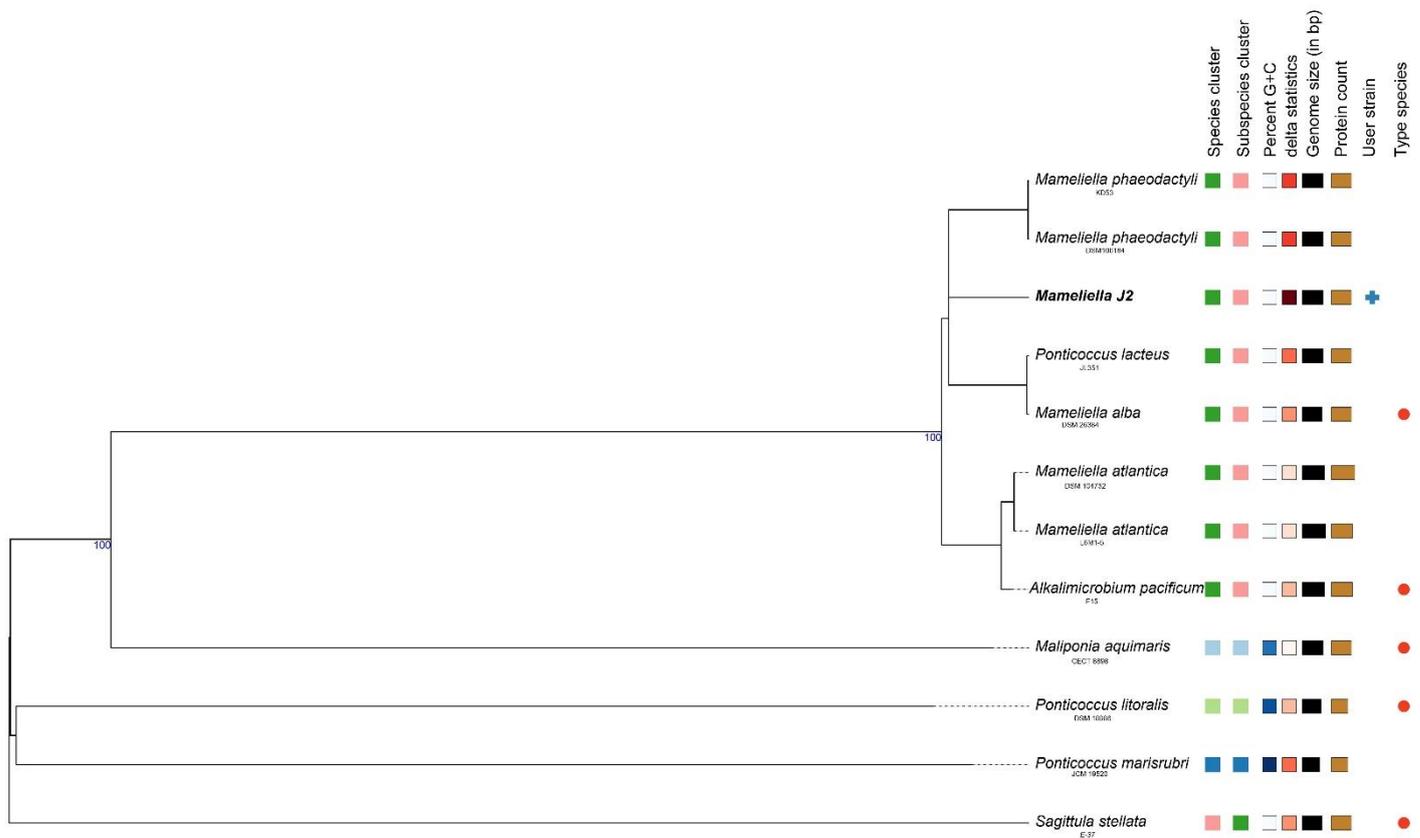
Os co-cultivos CCMR0080 e CCMR0086 são formados por linhagens de cianobactérias dos *turfs* dos recifes de Abrolhos, isoladas juntamente com as linhagens CCMR0081 à CCMR0085 e CCMR0087 [4]. Todas essas cianobactérias foram classificadas como diferentes linhagens da mesma espécie, classificadas inicialmente de forma genérica como *Leptolyngbya-Like*. Após confirmação de que as cianobactérias não pertenciam a nenhuma espécie já descrita, as linhagens CCMR0081 e CCMR0082 foram utilizadas para a descrição da espécie *Adonisia turfae*, sendo CCMR0081 a linhagem tipo da nova espécie [6]. Para a confirmação de que as cianobactérias CCMR0080 e CCMR0086 também pertencem à espécie *A. turfae* foi realizada a hibridização digital do *DNA* entre as linhagens (*DDH*) (Tabela 2.2). Com a confirmação de que as cianobactérias pertencem à mesma espécie, as linhagens passam a ser referidas no texto como *A. turfae80* e *A. turfae86*.

**Tabela 2.2.** Valores de *DDH* dos genomas *cyn80* e *cyn81* das cianobactérias dos co-cultivos CCMR0080 e CCMR0081, respectivamente, com o genoma de *Adonisia turfae* (linhagem tipo CCMR0081). Os valores maiores que 70% indicam que as linhagens pertencem a mesma espécie.

	<i>A. turfae80</i>	<i>A. turfae86</i>
<b>DDH estimado</b>	99,90%	89%
Probabilidade de pertecerem a <b>mesma espécie</b>	98,27%	95,45%
Probabilidade de pertecerem a <b>mesma subespécie</b>	80,13%	63,67%

A avaliação da taxonomia das duas linhagens de bactérias heterotróficas isoladas em cultura pura na plataforma *TYGS – DSMZ* indicou que a linhagem *Muricauda-K001* pertence a uma nova espécie e *J2* é uma linhagem da espécie *Mameliella alba* [178,197–199]. O filograma gerado pela plataforma com o posicionamento da linhagem *Mameliella-J2* está apresentada na Figura 2.2. As investigações sobre a classificação taxonômica de *Muricauda-K001* foram aprofundadas e resultaram na descrição de uma nova espécie dentro do gênero *Muricauda*, apresentada no capítulo 3 deste

trabalho. Assim, a identificação das linhagens no texto passa a incluir o seu gênero: *Mameliella*-J2 e *Muricauda*-K001.

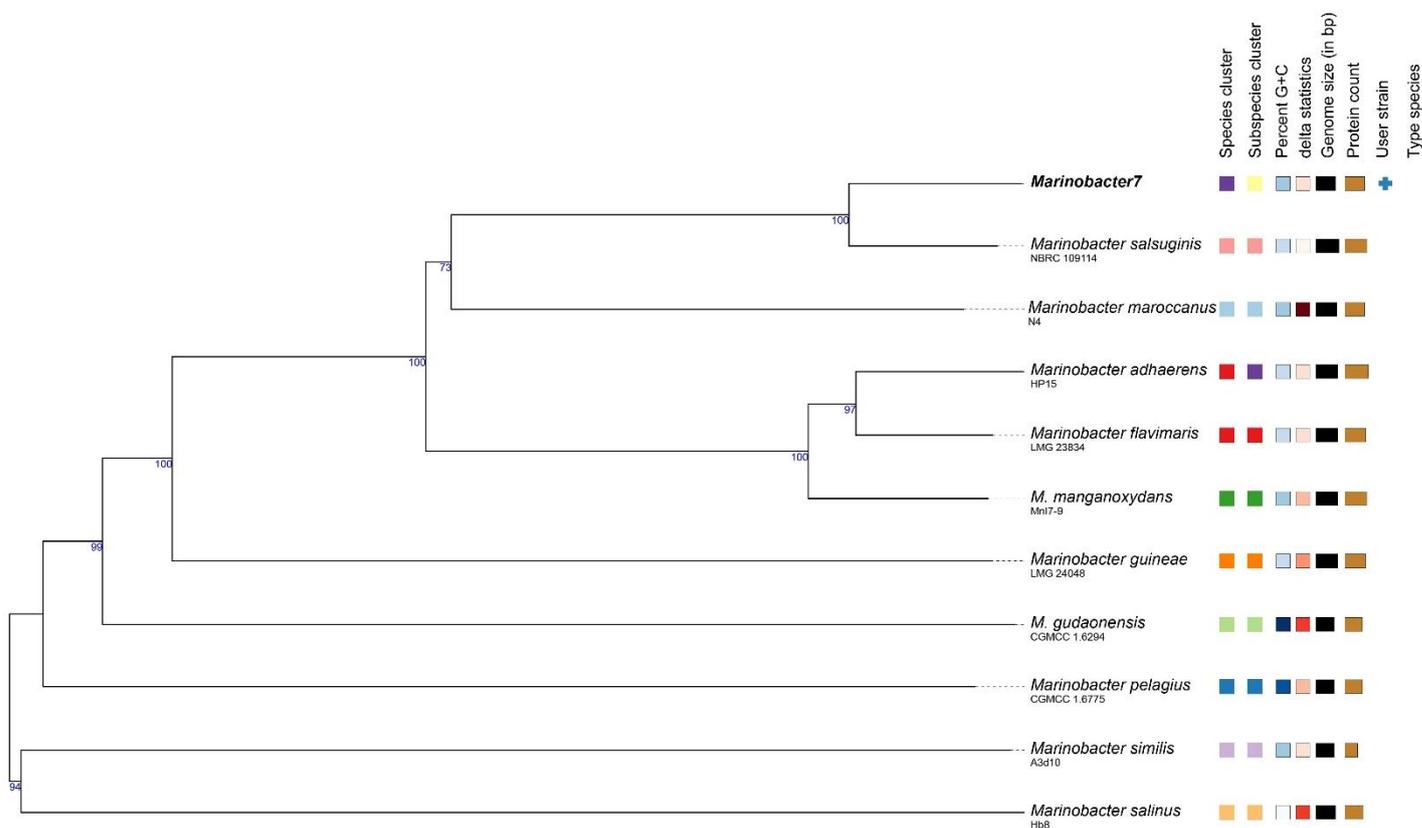


**Figura 2.2.** Filograma produzido a partir da sequência total do genoma J2, gerado na plataforma *TYGS-DSMZ*, indicando o posicionamento taxonômico da linhagem *Mameliella*-J2, uma nova linhagem da espécie *Mameliella alba*.

A plataforma *TYGS-DSMZ* determina as dez linhagens filogeneticamente mais próximas da linhagem analisada com base na similaridade da sequência do *rRNA* 16S, assim essas onze linhagens seguem para comparação dos parâmetros genômicos de classificação taxonômica, como a distância entre genomas (*GBDP*) [178,180]. A bactéria do genoma *bin7* foi classificada dentro do gênero *Marinobacter* (*Gammaproteobacteria*), o filograma proposto para linhagem está apresentado na Figura 2.3. A montagem dos genomas *bin2* e *bin6* não recuperou a sequência do *rRNA* 16S, logo não foi possível estabelecer as linhagens mais próximas para comparação e identificação pela *TYGS-DSMZ*. Nesse caso, o *software* *GTDB-Tk* foi utilizado para determinar a classificação taxonômica das bactérias [182,183,200]. A *bin2* foi atribuída ao gênero *Methylophaga* (*Gammaproteobacteria*). A *bin6* foi classificada apenas até o nível de família, *Cyclobacteriaceae*, uma família que faz parte da ordem *Cytophagales*, classe *Cytophagia*, dentro do filo *Bacteroidetes* (o filo vem passando por reclassificações baseadas principalmente nos critérios genômicos para a definição dos *taxa*. *Bacteroidetes* é denominado como *Bacteroidota* em *Silva-DB*. Porém nesse capítulo será utilizada a nomenclatura validada pela *LSPN-DSMZ* e incluída no *GTDB*, por tratar-se de classificação taxonômica baseada em

genomas. Assim, as linhagens passam a serem indicadas no texto como *Methylophaga2*, *Cytophagia6* e *Marinobacter7*.

*Methylophaga2*, *Cytophagia6* e *Marinobacter7* foram genomas montados a partir do metagenoma do co-cultivo CCMR0086 e pertencem a duas classes de micro-organismos abundantes nos co-cultivos (*Bacteroidetes* e *Gammaproteobacteria*), assim como ocorreu no processo de clonagem e isolamentos de bactérias em culturas puras (capítulo 1). Para que seja possível o acesso aos genomas de outras espécies presentes nos co-cultivos é necessário um desenho experimental voltado para o sequenciamento das bactérias heterotróficas. O enriquecimento dos cultivos com condições específicas de cultivo, aumentando assim a abundância de grupos específicos, e a associação de outras técnicas de sequenciamento são alguns exemplos de estratégias que podem ser utilizadas. Além de recuperar genomas dos micro-organismos menos abundantes, essas estratégias podem contribuir para o refinamento na montagem dos genomas já obtidos.



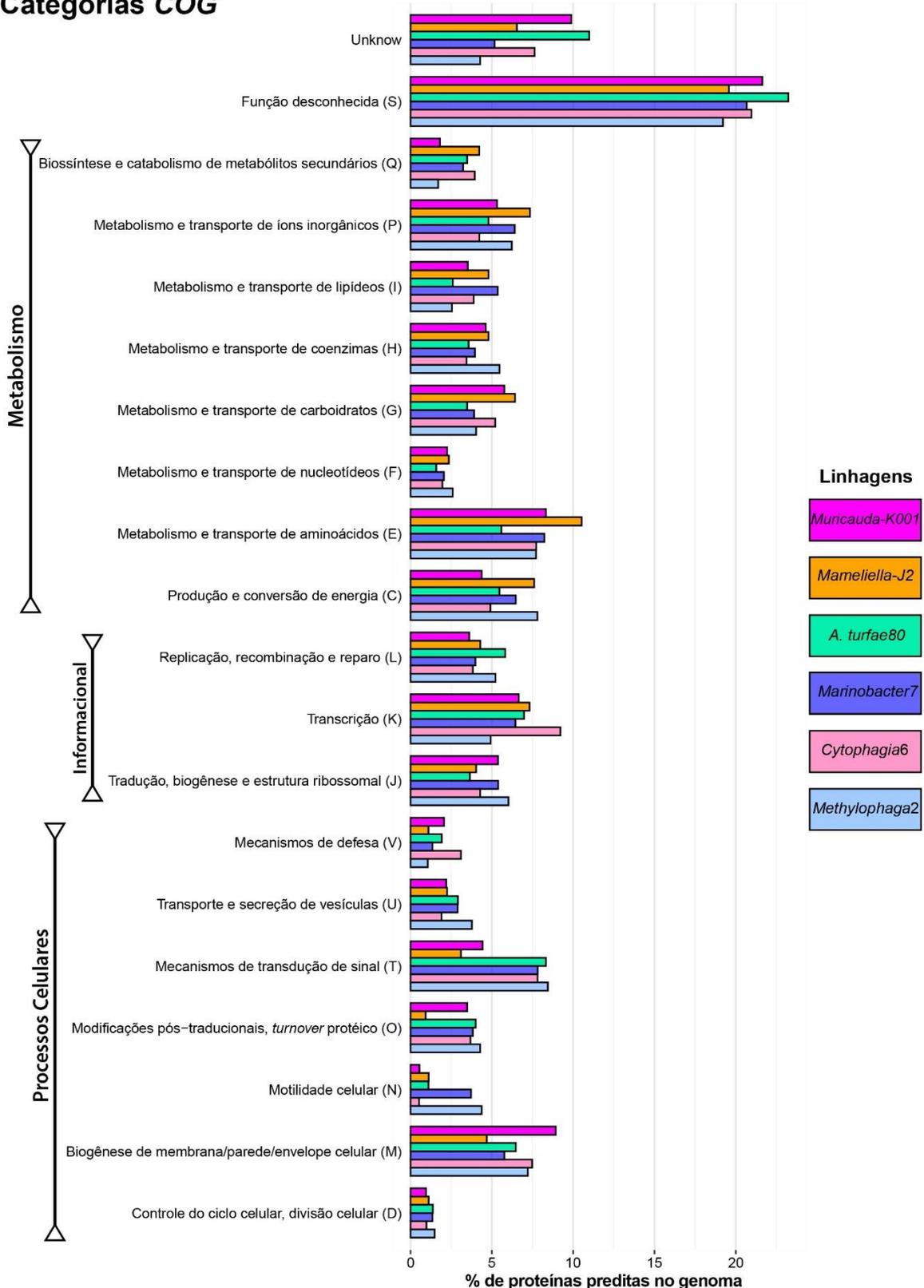
**Figura 2.3.** Filograma produzido a partir da sequência total do genoma *bin7*, gerado na plataforma *TYGS-DSMZ*, indicando o posicionamento taxonômico da linhagem *Marinobacter7*.

## 2.4.2 Características funcionais dos genomas

Os genomas dos micro-organismos fornecem indícios valiosos sobre seus fenótipos, conseqüentemente sobre seu nicho ecológico e papel nos ecossistemas. Porém o grande volume de dados gerados nos sequenciamentos de ácidos nucleicos passa ser informacional apenas quando comparado a bancos de dados através de programas matemáticos e estatísticos. Além da projeção funcional de características dos genomas, a referência de uma base de dados permite a comparação entre diferentes micro-organismos, que passam a ser analisados sob critérios semelhantes e padronizados. Uma das bases de dados e modelo matemático mais utilizados na microbiologia bacteriana é o *Clusters of Orthologous Groups of proteins (COGs)* [201]. O sistema COG permite a anotação das proteínas dos genomas em 26 categorias funcionais, que podem considerar a sequência completa ou domínios funcionais das proteínas preditas nos genomas. Assim, uma proteína pode fazer parte de mais de uma categoria. A proporção de proteínas distribuídas em cada categoria tornou-se um dos parâmetros a serem determinados nos genomas sequenciados [202].

A Figura 2.4 apresenta a distribuição das proteínas dos genomas sequenciados neste trabalho nas respectivas categorias COG. A categoria COG 'S' refere-se a proteínas de função desconhecida e reflete o atual nível de conhecimento sobre o proteoma desses micro-organismos [202]. Aproximadamente 20% das proteínas dos seis genomas foram atribuídas a esse grupo. A categoria 'S' é diferente da fração indicada no gráfico como '*unknow*', que representa as proteínas que não foram anotadas em nenhuma das categorias COG. Ambas as frações apontam uma das limitações da anotação de genomas com referência em bancos de dados que, por mais confiáveis e curados que sejam, sempre farão prospecções baseadas em estruturas já descritas. Portanto, a biologia experimental com a caracterização de proteínas e moléculas segue sendo essencial, bem como a evolução das análises computacionais [202,203].

## Categorias COG



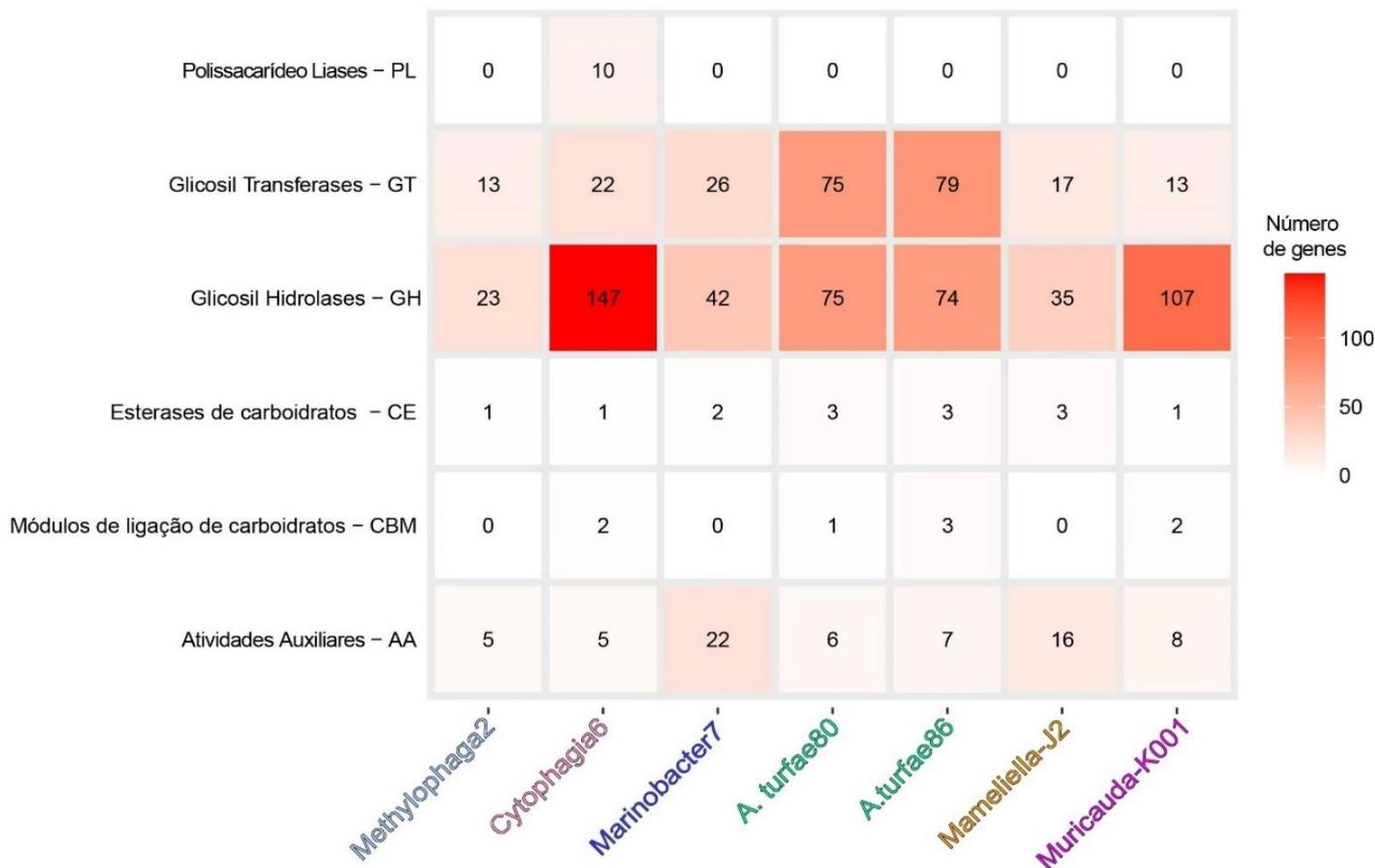
**Figura 2.4.** Classificação das proteínas preditas nos genomas das bactérias dos co-cultivos de cianobactérias de Abrolhos, de acordo com as categorias funcionais COG. *Unknow* - proteínas não classificadas em nenhuma categoria. Apenas a cianobactéria *A. turfae80* está representada no gráfico. A categoria funcional (COG) R aparece apenas nas linhagens *A. turfae80* e *A. turfae86*, com abundância menor que 20 proteínas.

As categorias 'E', 'K' e 'T', referentes ao metabolismo de aminoácidos, transcrição e transdução de sinais, estão entre as mais abundantes nos genomas. Genes dessas categorias foram os mais expressos em experimento realizado com cianobactérias dos gêneros *Dolichospermum* e *Microcystis* e suas cianosferas [204]. Nesse mesmo experimento a identificação taxonômica dos mRNA indicou *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* e *Bacteroidetes* entre os grupos mais abundantes, de maneira semelhante ao apontado pelos dados de sequenciamento de DNA. O autor destaca que possivelmente os micro-organismos mais abundantes nas cianosferas são também os mais ativos [204].

A categoria 'M' aparece na maior parte das bactérias com mais de 5% das proteínas preditas nos genomas. Nessa categoria, *Muricauda-K001* apresentou a maior proporção de proteínas preditas dentre as demais linhagens. Bactérias do gênero são capazes de formar apêndices que possuem vesículas na extremidade e tem como uma das funções a fixação em substratos [148]. Esses longos prolongamentos podem estar relacionados a essa pronunciada fração de proteínas envolvidas na síntese dos envoltórios celulares. Proteínas da categoria 'M' também podem estar relacionadas à formação das inúmeras vesículas que podem ser encontradas no ambiente marinho. As vesículas são compostas por lipídeos, aminoácidos, carboidratos e fragmentos de DNA e podem ter função relacionada aos processos de virulência, *quorum sensing*, formação de biofilme, reações de oxirredução, defesa celular e transferência horizontal de genes [205–207]. A avaliação de vesículas isoladas em ambiente marinho identificou a presença de sequências de DNA de *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Cyanobacteria* [205]. Vesículas da cianobactéria *Prochlorococcus* adicionadas em meio de cultura foram suficientes para promover o crescimento de *Alteromonas* e *Halomonas*, duas *Gammaproteobacteria* integrantes da sua cianosfera [205]. A proporção de proteínas da categoria COG 'M' relativamente alta nos genomas das cianobactérias de Abrolhos e suas cianosferas pode ser um indicativo de que esse mecanismo de liberação de vesículas tenha papel relevante naquele ecossistema, justificando assim a necessidade de aprofundamento das pesquisas sobre o tema.

As categorias COG 'C' e 'G', relacionadas ao metabolismo de carboidratos e fluxo energético, abrangem as enzimas responsáveis pelo processo de fixação de carbono, síntese e hidrólise de carboidratos e fluxo de energia pelos diferentes níveis tróficos. Além das proteínas dos fotossistemas I e II da fotossíntese oxigênica realizada pelas cianobactérias, o co-cultivo conta também com os genes relacionados à fotossíntese anoxigênica (*pufQ*, *pufL*, *pufM* e *pufC* / *bchX,P,Y,Z,C,M,F*) presentes no genoma de *Mameliella-J2*, uma *Alphaproteobacteria* do clado artificial *Roseobacter*.

As enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos identificados pelo aplicativo *dbCAN* na base de dados *CAZY* estão apresentadas na figura 2.5, identificadas por categoria e por genoma [208].



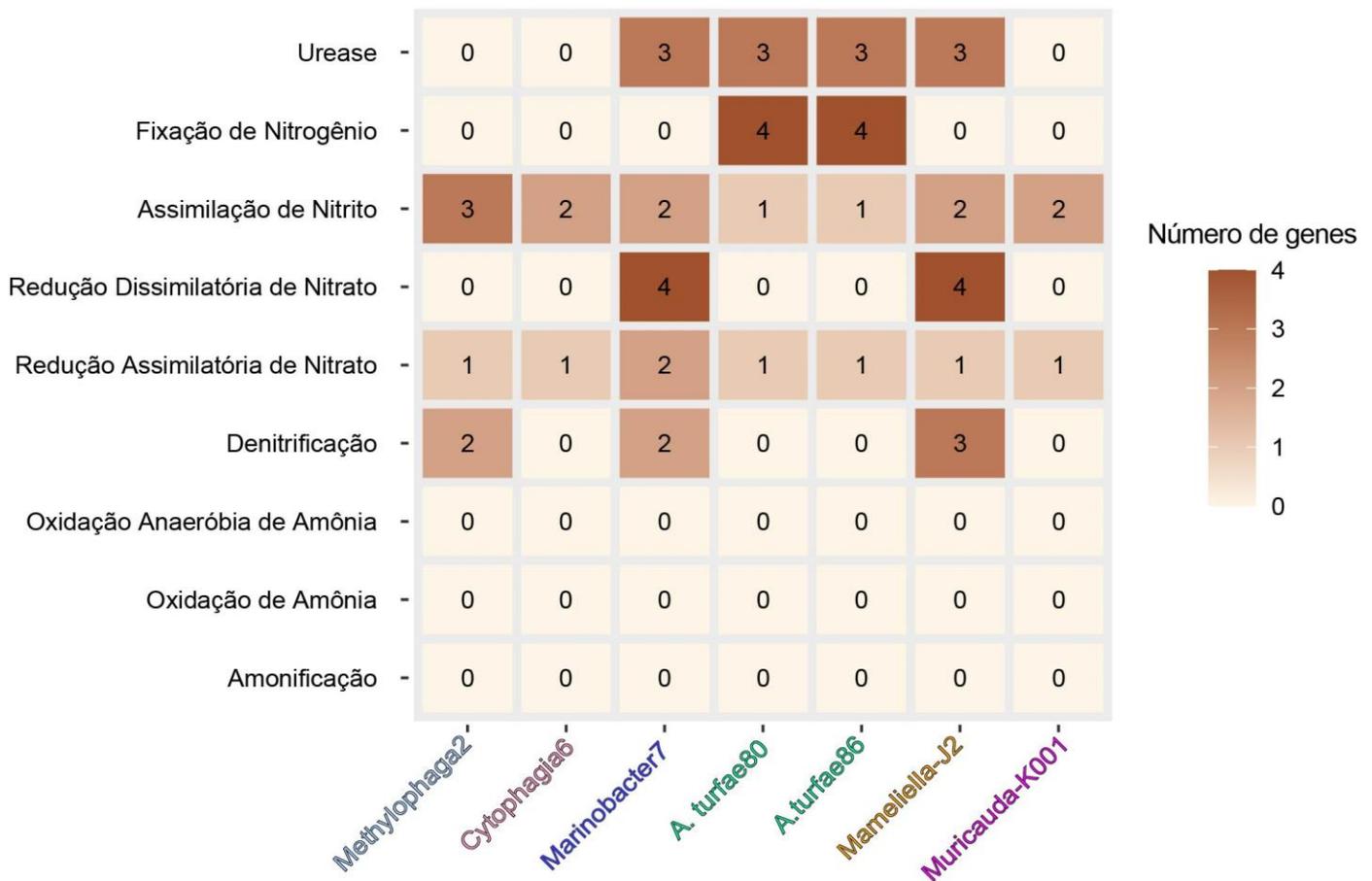
**Figura 2.5.** Quantidade de genes codificadores de enzimas relacionadas às diferentes categorias de metabolismo de carboidratos identificadas em cada genoma. Identificação realizada pelo aplicativo *dbCAN* em busca no banco de dados *CAZY*.

Destaca-se o número de enzimas preditas relacionadas ao metabolismo de carboidratos encontradas nas duas linhagens do filo *Bacteroidetes* (*Cytophagia6* e *Muricauda-K001*). O papel relevante do filo na hidrólise de carboidratos já foi identificado em experimentos de laboratório e em florações de cianobactérias [204,209]. Um amplo repertório de enzimas capaz de catalisar compostos de carbono pode beneficiar tanto bactérias heterotróficas quanto cianobactérias. Assim como *Trichodesmium*, *A. turfae* é uma cianobactéria fixadora de nitrogênio que não possui diferenciação celular, não possui heterocito [63]. Logo, depende do consumo do oxigênio local para evitar a interrupção da reação de fixação. A produção de moléculas complexas e/ou recalcitrantes de carbono e aparato enzimático para a digestão dessas substâncias pode ser atributo selecionado ao longo do tempo evolutivo que determina a associação de determinados grupos de cianobactérias e bactérias heterotróficas. *Cytophagia6* foi a única dentre as bactérias sequenciadas que apresentou enzimas do tipo polissacarídeo liases (*PL*). Dos 10 genes *PL* encontrados, 3 não tiveram função identificada, 3 codificam precursores da Alginato Liase (EC 4.2.2.3) e 4 codificam Alginato Liases (EC 4.2.2.3). O alginato é um polissacarídeo estrutural componente de parede celular das algas marrons (*Phaeophyceae*), mas também pode ser produzido por algumas *Gammaproteobacteria* [210].

Investigações mais detalhadas são necessárias para a identificação dessa enzima predita, que pode contribuir com a entrada de carbono no co-cultivo, através da quebra de moléculas recalcitrantes produzidas por algas, ou seja, componentes externos ao conjunto cianobactéria-cianosfera. Ou é possível ainda que a enzima esteja sendo produzida para a quebra de moléculas similares produzidas pelos próprios micro-organismos dos co-cultivos. Uma das linhagens de bactérias isoladas em cultura pura, a linhagem *E1*, produz uma grande quantidade de substância mucóide/gelatinosa quando cultivada em meio DIFCO-2216 sólido (dado não apresentado). A identificação pelo *rRNA* 16S indicou que a linhagem é uma *Gamma*proteobactéria, é possível que essa substância mucóide seja alguma molécula do tipo alginato. Considerando-se verdadeira essa possibilidade, as enzimas alginato liases de *Cytophagia6* poderiam realizar a quebra dessa substância e seriam uma evidência de interações entre as bactérias heterotróficas. As relações poderiam ser estabelecidas de forma lateral na cianosfera, não apenas entre cianobactérias e heterotróficas.

A categoria COG 'P' é uma das frações que também se destacam nos genomas avaliados. A categoria abrange proteínas relacionadas aos ciclos de elementos como fósforo (P), nitrogênio (N) e enxofre (S), dentre outros. A atuação desses micro-organismos nos ciclos de N/P/S tem influência na dinâmica entre cianobactérias e cianosfera, mas seus efeitos são sistêmicos devido à interseção com o ciclo do carbono e a formação de gases que contribuem para o aquecimento global [211].

A Figura 2.6 apresenta o número de genes identificados em cada genoma para os processos celulares que compõem as reações envolvendo o nitrogênio inorgânico. Dentre os micro-organismos sequenciados, apenas as cianobactérias são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico em amônia. Não foi identificada a presença de genes da oxidação da amônia (*amoA*).



**Figura 2.6.** Distribuição dos genes referentes a reações do ciclo do nitrogênio nos genomas de *Methylophaga2*, *Cytophagia6*, *Marinobacter7*, *A. turfae80*, *A. turfae86*, *Mameliella-J2* e *Muricauda-K001*.

As bactérias *Mameliella-J2* e *Marinobacter7* destacam-se pela sua contribuição para o ciclo do nitrogênio nos co-cultivos. Ambas possuem genes de enzimas que participam dos processos de nitrificação (nitrito → nitrato), denitrificação (nitrato → nitrito → óxido nítrico → óxido nítrico → nitrogênio) e redução dissimilatória do nitrato (nitrato → nitrito → amônia), como está detalhado na Figura 2.7. Juntamente com as cianobactérias ambas atuam também na catálise da ureia a amônia, reação que pode ter influência também no pH do microambiente e contribuir para a precipitação de carbonatos [212].



como já descrito em outros ambientes [214,215]. A proliferação excessiva pode estar relacionada à redução e doenças dos corais dos recifes e pode colaborar para o efeito estufa, uma vez que gases óxido nítrico e óxido nitroso fazem parte do conjunto de gases responsáveis pelo aumento das temperaturas do planeta (*greenhouse gases*) [211,213].

Com relação ao metabolismo do fósforo e sua mineralização para biodisponibilidade, todas os genomas, exceto *Cytophagia6*, apresentaram ao menos uma cópia do gene que codifica a fosfatase alcalina (*phoD*), as cianobactérias e *Mameliella-J2* possuem ao menos uma C-P liase (E.C 4.7.1.1) [216]. Todas as bactérias apresentam o sistema de transportadores de membrana *pstSCAB*, que é responsivo à baixa concentração do íon fosfato, e *Mameliella-J2* apresenta também o gene *pitA* relacionado ao transporte de Pi [217]. O gene *ppk* uma quinase, relacionada ao acúmulo de polifosfato como reserva Pi, está presente em todos os genomas [218]. O gene regulatório *phoU* está presente em todas as linhagens, exceto *Muricauda-K001*, e *phoR* não está presente em em *Methylophaga2* [219].

Em relação ao ciclo do enxofre, todos os genomas apresentaram os genes associados à redução assimilatória do sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). A assimilação de compostos sulfonados a partir do meio externo é realizada pelas cianobactérias, *Mameliella-J2* e *Methylophaga2*. As reações de oxirredução dissimilatórias de sulfato são realizadas por *Mameliella-J2* e cianobactérias. *Mameliella-J2* e *Methylophaga2* apresentam conjuntos de genes do sistema *sox*, possibilitando a oxidação de tiosulfato a sulfato.

Nenhum dos genomas de bactérias heterotróficas analisados apresentou gene codificador da catalase *kata* (EC 1.11.1.6), uma enzima que oxida o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , evitando sua redução e liberação do radical de oxigênio reativo  $\text{HO}\bullet$ . Uma das relações mais bem descritas entre cianobactérias e bactérias heterotróficas é o papel de *Alteromonas* na produção da catalase e protegendo *Prochlorococcus* dos efeitos nocivos do radical  $\text{HO}\bullet$ , uma vez que a cianobactéria não possui o gene *kata* em seu diminuto genoma [67,68,220]. Enquanto as bactérias heterotróficas apresentaram apenas o gene *katG*, codificador da catalase-peroxidase (EC 1.11.1.21); as cianobactérias *A. turfae80* e *A. turfae86* possuem os dois genes, *kata* e *katG*. Ao contrário do reportado para *Alteromonas* e *Prochlorococcus*, é possível que nos co-cultivos das cianobactérias dos *turfs* de Abrolhos a cianobactéria seja a responsável pelo aumento na proteção contra os danos causados pelo radical  $\text{HO}\bullet$  [221].

As concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas águas marinhas são maiores próximas à superfície, devido à foto-oxidação do carbono orgânico dissolvido [222]. Esse  $\text{H}_2\text{O}_2$  em presença de metais como ferro ou cobre pode ser reduzido, levando à liberação de  $\text{HO}\bullet$  (reação de Fenton) [223]. O  $\text{HO}\bullet$  pode prejudicar a saúde de corais zooxantelados, que vivem em associação mutualística com o dinoflagelado *Symbiodinium*. O aumento de temperatura na água estaria relacionado ao aumento na produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em algumas linhagens de *Symbiodinium*, que acabam abandonando o hospedeiro, resultando no branqueamento de corais [224]. As cianobactérias *A. turfae80* e *A. turfae86* foram coletadas em profundidades de 10m, na zona fótica dos recifes de corais de Abrolhos, com alta incidência de luz e

altas temperaturas. Esses fatos poderiam somar-se como uma das influências relacionadas ao favorecimento dos *turfs* em detrimento dos corais nos recifes de Abrolhos, uma vez que as cianobactérias apresentam características genômicas que podem promover maior a proteção a sua cianosfera. Enquanto isso, o holobionte coral-*Symbiodinium* estaria sendo afetado pelo branqueamento devido ao aumento na produção de  $H_2O_2/ HO\bullet$ . Porém, o branqueamento de corais não parece ser um dos problemas mais impactantes nos recifes de Abrolhos [225]. Uma forte correlação positiva foi identificada entre *turfs* e corais da ordem *Scleratinia* em algumas áreas dos recifes avaliadas [5]. Diante disso, fica aberta a hipótese de que a enzima catalase produzida pelas cianobactérias pode contribuir na proteção não apenas dos micro-organismos da sua cianosfera, mas também dos *Symbiodinium* dos corais, uma vez que os *turfs* crescem sobre os corais, com contato direto.

O metabolismo secundário é uma das características marcantes nos genomas de cianobactérias. Muitos dos seus metabólitos secundários são tóxicos e bastante conhecidos por causarem prejuízos em balneários e reservatórios de abastecimento. O número de *clusters* gênicos e os tipos de metabólitos identificados nos genomas das cianobactérias *A. turfae* e bactérias heterotróficas está apresentado na Tabela 2.3. O total de 105 *clusters* foram detectados no conjunto de cianobactérias-cianosfera. As cianobactérias apresentaram valores muito parecidos (19 e 20) e *Cytophagia6* destacou-se pela quantidade de grupos (44). Muitos genes identificados em *Cytophagia6* apresentam similaridade com genes de metabólitos secundários de cianobactérias, como anabaenopeptina e nodularina, de *Nostoc* sp. Ao considerar-se que esse foi o genoma de maior nível de contaminação (3,65%) dentre os avaliados, é preciso cautela ao observar esses dois pontos e considerar a possibilidade de sequências contaminantes na montagem do genoma. Os genes encontrados em todas as linhagens apresentam baixa similaridade com outros já descritos, com exceção de alguns *clusters* nas linhagens *A. turfae80* e *A. turfae86*. Esse dado reflete que muito ainda precisa ser explorado sobre os metabólitos secundários desses micro-organismos para o entendimento do seu papel na fisiologia de cada um e na dinâmica da comunidade.

**Tabela 2.3.** Quantidade e tipos de *clusters* gênicos referentes ao metabolismo secundário identificados no genoma de cada linhagem. *PKS* – policetídeo sintases, *RiPP* – peptídeo ribossomal modificado pós-tradução, *NRP* – peptídeo não ribossomal, outro – tipo não adequado em nenhuma categoria.

<b>Metabólitos Secundários</b>		
<b>Genoma</b>	<b>N° Clusters</b>	<b>Tipos</b>
<i>A. turfae80</i>	19	PKS, RiPP, NRP, Terpeno (Carotenoide), outro.
<i>A. turfae86</i>	20	PKS, RiPP, NRP, Terpeno (carotenoide), Alcalóide, outro.
<i>Muricauda-K001</i>	3	RiPP, Terpeno (carotenoide).
<i>Mameliella-J2</i>	7	PKS, NRP, Terpeno (carotenoide), outro.
<i>Methylophaga2</i>	7	RiPP, Terpeno, Outro.
<i>Cytophagia6</i>	44	PKS, RiPP, NRP, Terpeno, Alcalóide, outro.
<i>Marinobacter7</i>	5	Sacarídeo, outro.

Bactérias do gênero *Mameliella* já foram correlacionadas positivamente com *Symbiodinium*, *Alexandrium tamiyavanichii* e corais. A composição genômica identificada em *Mameliella-J2* vai ao encontro desses resultados. Uma vez que a linhagem possui bacterioclorofila (*puf* genes), em situação anóxica pode contribuir com a fixação de carbono no co-cultivo. Em uma situação transiente onde a própria proliferação excessiva das cianobactérias e cianosfera provoquem a redução de oxigênio dissolvido no ambiente, é provável que a linhagem *Mameliella-J2* passe a ser um dos micro-organismos prevalentes na fixação de carbono. Ao mesmo tempo, a capacidade de participar de reações de oxidação do enxofre permite que a bactéria obtenha energia sem o consumo de carbono, favorecendo sua manutenção em situações de escassez de carboidratos. A linhagem apresenta uma proporção de *clusters* gênicos referentes ao metabolismo secundário próxima àquela encontrada em *A. turfae80* e *A. turfae86*, é provável que os metabólitos dessas vias estejam envolvidos na comunicação que permitiria essa resposta adaptativa rápida às alterações das condições ambientais.

### 2.4.3 Potencial biotecnológico de cianobactérias e cianosfera

Os co-cultivos de *A. turfae* dos recifes de Abrolhos apresentaram-se como microecossistemas ricos e com amplo repertório genômico. Os micro-organismos já estão estabelecidos em sistemas de

cultura artificiais, facilitando a avaliação de características *in silico* e a execução de ensaios experimentais. Diante disso, os co-cultivos reservam um grande potencial biotecnológico a ser investigado.

As bactérias *Muricauda-K001* e *Cytophagia6* apresentam um elevado número de enzimas relativas ao metabolismo de carboidratos, especialmente as glicosil hidrolases. A indústria apresenta demanda crescente por novas enzimas, e aquelas relacionadas a matrizes energéticas menos poluentes, permitindo o aproveitamento de diferentes biomassas, ganham destaque porque vão ao encontro dos objetivos da agenda 2030 – ONU [226]. A bactéria *Muricauda-K001* pode ser um dos pontos de partida para a investigação desse grupo de enzimas, pois já está estabelecida em cultura pura e com condições de cultivo bem determinadas.

*Marinobacter* é um gênero de bactérias utilizadas como indicador de contaminação por derivados de petróleo e seu uso é avaliado em processos de biorremediação [227]. *Marinobacter7* apresenta, por exemplo, o gene *alkB* que codifica uma alceno hidroxilase, que degrada hidrocarbonetos [228]. Algumas culturas puras isoladas em cultivo pertencem ao gênero e podem ter seu potencial de degradação de hidrocarbonetos e derivados de petróleo investigados. Além da avaliação de modelos para seu uso como bioindicador de poluição.

O metabolismo do nitrogênio é proposto como um dos fatores associados à degradação de polietileno, um dos plásticos mais recalcitrantes disponíveis atualmente e presente virtualmente em todos os produtos industriais [229]. Peixoto, J. (2018) propõe que as espécies reativas produzidas pelas enzimas oxidorreduzases no processo de redução do dissimilatória do nitrogênio são responsáveis pela modificação oxidativa extracelular do polietileno, dando início assim ao processo de biodegradação desse plástico [229] (artigo em preparação). *Mameliella-J2* e *Marinobacter7* são bactérias que participam dessa etapa do ciclo do nitrogênio nos microecossistemas, logo também apresentam potencial para uso na biorremediação da poluição por plásticos.

Esses são alguns destaques das possíveis aplicações dos micro-organismos apresentados nesse trabalho. A disponibilidade dos genomas e das culturas permite uma avaliação detalhada dessas linhagens. Experimentos voltados para a compreensão da fisiologia dessas bactérias podem convergir respostas sobre seus papéis ecológicos e potenciais biotecnológicos.

## 2.5 Conclusões

O microbioma bacteriano associado às cianobactérias dos *turfs* dos recifes de Abrolhos apresenta diversidade ainda desconhecida de micro-organismos, apesar de ter composição em níveis hierárquicos altos semelhante a outras culturas de cianobactérias.

Dados brutos de sequenciamento de DNA de culturas de cianobactérias podem ser aproveitados para a avaliação de características genômicas de bactérias abundantes nos co-cultivos. Diante das características genômicas encontradas, as culturas apresentam alto potencial para uso biotecnológico.

A diversidade genômica apresentada pelos micro-organismos nos ecossistemas parece ser complementar. Assim, como já relatado em outras cianobactérias e cianosferas, bactérias heterotróficas apresentam amplo repertório para metabolizar o carbono fixado pelas cianobactérias *A. turfae*. Nessa interação metabólica o processo de fixação de nitrogênio pela cianobactéria não é interrompido e a heterotrófica se beneficia de fonte de carbono e nitrogênio. Os genomas avaliados indicaram a participação de micro-organismos nos processos de fixação, nitrificação, denitrificação assimilatória e dissimilatória do nitrogênio. As cianobactérias *A. turfae* apresentam mais de uma via de oxidação do peróxido de hidrogênio, podendo contribuir com a redução dos efeitos nocivos desse composto no co-cultivo. A presença de uma bactéria fotossintetizante não-oxigênica confere aos micro-organismos uma via alternativa para a fixação de energia, diante de alterações nas condições físico-químicas do ambiente. O potencial para a produção de metabólitos secundários pelos micro-organismos é alto, indicando refinamento e complexidade no metabolismo de cianobactérias e bactérias heterotróficas.

## Capítulo 3 – *Muricauda brasiliensis* K001 sp. nov., uma nova espécie isolada a partir da cianosfera de cianobactérias dos recifes de Abrolhos.

### 3.1 Introdução

O filo *Bacteroidetes* é um dos grupos taxonômicos abundantes nas ficosferas em geral e na cianosfera das cianobactérias dos *turfs* de Abrolhos [230–232]. *Flavobacteriaceae* é a maior família dentro do filo e uma das mais abundantes nos ambientes marinhos [233]. Dentro da família, o gênero *Muricauda* apresenta 34 espécies descritas; isoladas a partir de variados nichos marinhos, como sedimentos, águas superficiais, oceano profundo, areia, mares poluídos, entre outros.

O gênero *Muricauda* é formado por bactérias Gram-negativas de formato bacilar. A característica que dá nome ao táxon é a presença de um apêndice presente em algumas células que tem função relacionada à fixação em substrato [148]. Várias espécies do grupo foram isoladas a partir de ambientes contaminados com derivados de petróleo, despertando interesse para seu potencial uso biotecnológico [147–154, 234–243].

A investigação sobre bactérias heterotróficas presentes em co-cultivos de cianobactérias provenientes dos *turfs* dos recifes de Abrolhos resultou no isolamento de 17 linhagens de microorganismos. Um dos morfotipos de colônia despertou a atenção pois estava presente em todos os co-cultivos CCMR008087. A linhagem foi denominada como *Muricauda-K001* e sua identidade foi atribuída ao gênero *Muricauda* pela identificação por similaridade da sequência do marcador molecular *rRNA* 16S. A colônia amarela destaca-se pela produção de pigmentos e possivelmente outros metabólitos secundários pela estirpe. Após avaliação de características genômicas, no âmbito da avaliação da comunidade presente na cianosfera dos co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087, apontou-se para a possibilidade da linhagem *Muricauda-K001* pertencer a uma nova espécie dentro do gênero *Muricauda*. Assim, optou-se pela caracterização aprofundada da linhagem, possibilitando contribuições para a compreensão do papel ecológico, prospecção de componentes de interesse biológico e a sistemática do grupo.

As características genômicas e fisiológicas investigadas indicam que a linhagem *Muricauda-K001* pertence a uma nova espécie dentro do gênero *Muricauda*. Esse capítulo apresenta a caracterização e descrição taxonômica de *Muricauda brasiliensis* sp. nov., a primeira espécie do gênero isolada a partir de uma cianosfera.

## 3.2 Objetivos

### 3.2.1 Objetivo geral

Realizar a descrição fisiológica e taxonômica da bactéria *Muricauda-K001*, a linhagem tipo da nova espécie *Muricauda brasiliensis* sp. nov.

### 3.2.2 Objetivos específicos

Definir o posicionamento filogenético da linhagem *Muricauda-K001* com base na sequência completa do *rRNA* 16s.

Realizar a classificação filogenômica da linhagem com base na sequência genômica.

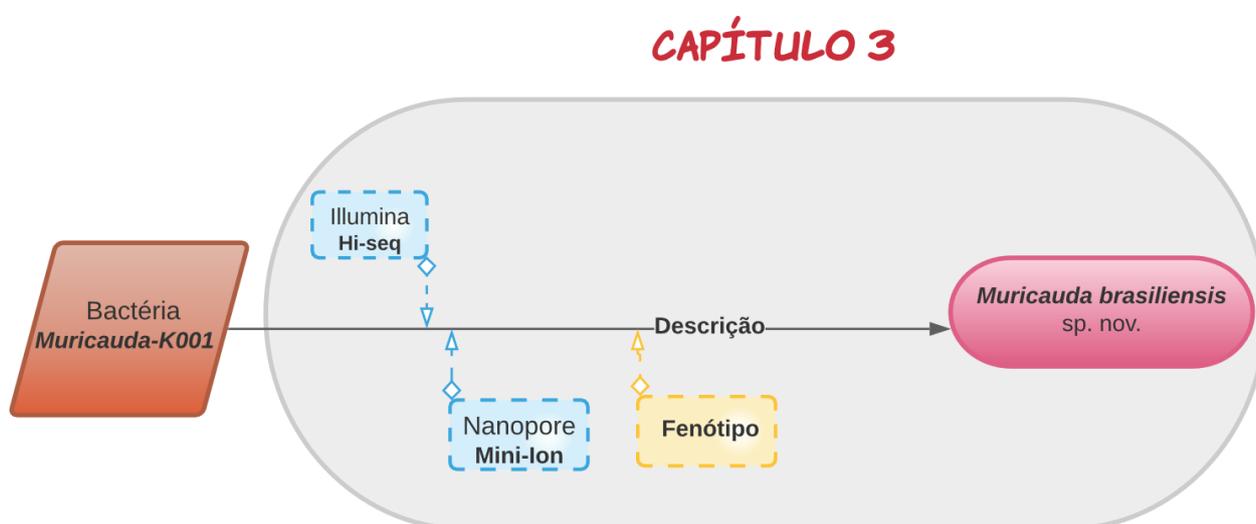
Caracterizar fisiológica e comparativamente a linhagem *Muricauda-K001*, tendo como referência a linhagem tipo do gênero *DSM* 13258.

### 3.3 Materiais e métodos

A linhagem *Muricauda-K001* foi isolada a partir do co-cultivo CCMR0080, segundo metodologia descrita no item 1.4.3 deste trabalho. Alíquotas da cultura foram armazenadas em freezer -80°C com glicerol 15% v/v como agente crioprotetor. A cultura foi depositada em duas coleções filiadas à *World Federation for Culture Collections (WFCC)*: Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde da Fiocruz (CBAS – Fiocruz) e a Coleção Brasileira de Micro-organismos da Unicamp (CBMAI – Unicamp).

#### 3.3.1 Fluxograma metodológico

O fluxograma da figura 3.1 representa a abordagem polifásica para a sistemática bacteriana. As metodologias foram realizadas com a linhagem *Muricauda-K001* para determinar sua posição taxonômica.



**Figura 3.1.** Fluxograma indicando as metodologias utilizadas para alcançar os resultados apresentados no capítulo 3.

#### 3.3.2 Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura

As células da linhagem *Muricauda-K001* foram observadas em microscopia óptica para a determinação das características de membrana, utilizando a coloração diferencial de Gram. Em síntese a coloração é realizada com o espalhamento da cultura na lâmina e fixação em chama. Segue-se com a primeira coloração por cristal violeta (1 minuto) e lavagem com água. A fixação do corante é realizada com solução mordente de Lugol (iodo + iodeto de potássio). A descoloração é realizada com álcool de titulação maior que 92% por 10 segundos (ou menos). Finaliza-se com a segunda coloração (diferencial) com safranina por 30 segundos (ou menos) [244]. A observação foi realizada em microscópio Leica DM750.

Para a visualização em microscopia eletrônica de varredura, as células foram obtidas por centrifugação do cultivo em meio líquido e lavadas por 3 vezes em tampão salino de fosfato (PBS). A fixação ocorreu em tampão Karnovsky (2% (v/v) paraformaldeído, 2% (v/v) glutaraldeído, 3% (p/v) sacarose e 0,05 M de tampão cacodilato). A segunda fixação foi realizada em solução de tetróxido de ósmio (1% p/v) seguida por adesão em lamínula com poli-L-lisina. As células foram desidratadas em solução de acetona com concentração crescente (50/70/90/100%, v/v). A secagem em ponto crítico foi realizada com CO<sub>2</sub> e as células foram cobertas com uma fina camada de ouro [74]. As imagens foram geradas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-7001F (JEOL Ltd., Tóquio, Japão).

### 3.3.3 Taxonomia baseada no gene marcador molecular *rRNA* 16S

A extração de *DNA* para a análise do marcador *rRNA* 16S e sequenciamento genômico foi realizada com o kit comercial *GenElute bacterial genomic DNA kit* (Sigma-Aldrich). A amplificação por PCR, limpeza, clonagem e sequenciamento Sanger foram realizados de acordo com o item 1.4.5.1.

#### 3.3.3.1 Análise do *rRNA* 16S

A sequência do *rRNA* 16s foi analisada dentro do servidor *on-line ExTaxon-e* ([www.ezbiocloud.net](http://www.ezbiocloud.net)) para a determinação das linhagens do gênero com maior similaridade. As linhagens mais próximas foram alinhadas com o programa *CLUSTAL\_W*, implementado no software *MEGA* (v 7.0) [245]. A árvore filogenética *maximum-likelihood (ML)* foi reconstruída com base no modelo Kimura-2 e *bootstrap* de 1000 amostragens [82].

### 3.3.4 Análises taxonômica baseada em critérios genômicos

As análises para classificação taxonômica baseadas em características genômicas foram realizadas utilizando a primeira versão do genoma da linhagem *Muricauda-K001* disponível no *GenBank* sob o número de acesso QBTW00000000.1, obtida por sequenciamento *NGS Illumina* [167]. Em síntese, a biblioteca de *DNA* foi preparada utilizando kit *Nextera XT kit (Illumina)*, o sequenciamento foi realizado em plataforma *NextSeq500*, gerando *reads paired-end* de 150 pares de base. A limpeza dos dados e montagem do genoma foi realizada com o pacote *CLC Genomics Workbench* (Qiagen). A anotação foi realizada com o pacote *Prokka* (v. 1.12), usando a base de dados *UniProt* [184].

Parâmetros genômicos para o delineamento de novas espécies, o *Overall Genome Related Index (OGRI)*, foram estabelecidos para contribuir com a resolução da classificação de bactérias, já que apenas as sequências do *rRNA*16S e características fenotípicas não eram suficientes para a separação de grupos muito semelhantes [165,246]. O *OGRI* abrange a avaliação da identidade de nucleotídeos, hibridização do *DNA*, contaminação, cobertura e completude dos genomas e a construção de árvore filogenética baseada em múltiplos marcadores moleculares proteicos [165]. A avaliação desses parâmetros entre a linhagem *Muricauda-K001* e todas as linhagens com genomas completos

disponíveis nos bancos de dados em 2020 foi realizada. A *Average Nucleotide Identity (ANI)* foi calculada com a ferramenta disponível na plataforma *EZBioCloud* (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) [247]. A hibridização digital do DNA (*DDH*) foi calculada pelo *Genome-to-Genome Distance Calculator from Leibniz Institute—DSMZ* (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>) [180,248–252]. A completude e contaminação do genoma foram avaliadas com as ferramentas *BUSCO* e *CheckM* [176,253]. A cobertura foi determinada com o pacote *Burrows-Wheeler Aligner (BWA)* [254]. A seleção de 31 marcadores moleculares para construção de árvore filogenética foi realizada com o software *AMPHORA2* [255]. As sequências foram primeiramente concatenadas e após alinhadas com o *MAFFT* [256]. A árvore foi construída com o *Fasttree* e editada no *MEGA* (v. 7) [83,245].

Duas plataformas disponíveis *on-line* foram utilizadas para a confirmação dos resultados da identidade da linhagem *Muricauda-K001*: *TYGS (Type Strain Genome Server, DSMZ)* e *TrueBac ID (EZBioCloud)* [180,252].

### 3.3.5 Caracterização fenotípica de *Muricauda-K001*

A linhagem DSM 13258<sup>T</sup> *Muricauda ruestringensis* foi adquirida junto a *DSMZ Leibniz Institute collection of microorganisms and Cell Cultures GmbH* (Braunschweig, Alemanha) para a realização das análises fenotípicas de forma comparativa com a linhagem *Muricauda-K001*. Para a realização das análises, ambas foram cultivadas em meio *DIFCO 2216 marine broth* em meio líquido ou sólido por 48h a 30°C, exceto para realização de testes específicos e detalhados ao longo do texto.

A temperatura ótima de crescimento foi avaliada por uma semana em placas de ágar nas temperaturas de 4, 10, 15, 20, 28, 30, 33, 37 e 42°C. O pH ótimo de crescimento (pH 4, 5, 6, 7, 8 e 9) foi determinado em meio líquido ajustado com HCl ou NaOH. A tolerância a diferentes salinidades foi avaliada a 30°C (temperatura ótima de crescimento) em meio líquido composto por: 0,25% (p/v) peptona bacteriológica, 0,15% (p/v) extrato de levedura em água marinha artificial (0,64g KCl, 4,53g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 5,94g Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 1,3g CaCl<sub>2</sub> em 1L de água destilada) e salinidades ajustadas com NaCl de concentração entre 0 e 5% (p/v), com intervalos de 0,5%. A capacidade de crescimento em meio com NaCl como fonte única de sal foi testada em meio de cultura com 2,25% (p/v) NaCl, 0,25% (p/v) peptona bacteriológica e 0,15% (p/v) extrato de levedura dissolvidos em água destilada [148]. A hidrólise de *Tween* 20, 60 e 80 foi avaliada em meio sólido com acréscimo de 1% (v/v) do respectivo *Tween* [244]. O teste de hidrólise de amido foi realizado em meio sólido com o acréscimo de 0,5% (p/v) de amido e revelação com vapor de iodo após 48h de crescimento [257]. A atividade da catalase foi observada pela formação de bolhas após aplicação de solução 3% (v/v) peróxido de hidrogênio [257]. A presença de pigmentos *Flexirubin-type* foi determinada por alteração de cor em biomassa de células após a adição de solução 20% (p/v) KOH [258].

A presença de carotenoides foi avaliada após extração com 100% acetonitrila (v/v) em sistema de cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa (*RP-HPLC*). A separação dos analitos foi

realizada em coluna de fase reversa C18 (RP<sub>18</sub>) e a detecção em sistema de fotodiodo. A identificação foi realizada com base no tempo de retenção e perfil do espectro de absorção entre os comprimentos de onda entre 300 e 600nm [259].

A habilidade de crescimento em anaerobiose foi determinada em meio de cultura sólido suplementado com cloridrato de cisteína (0,05% p/v), sulfito de sódio (0,05% p/v) e nitrato de potássio (0,1% p/v) [149]. Os frascos de vidro com atmosfera de nitrogênio foram selados com tampas de borracha e selador de alumínio [149].

A suscetibilidade a antibióticos foi avaliada em meio sólido pela formação de halo após aplicação de disco com antibiótico sobre cultura espalhada com alça de Drigalski. Não foram especificados tamanhos de halos, a presença foi determinada como suscetibilidade. Os antibióticos testados foram: (µg disco) ciprofloxacina (5 µg), vancomicina (30 µg), clindamicina (2 µg), oxacilina (1 µg), sulfonamida (300 µg), cloranfenicol (30 µg), amicacina (30 µg), norfloxacina (10 µg), polimixina B (300 U), ofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), ceftazimima (30 µg), penicilina G (10 U), ceftriaxona (30 µg), tetraciclina (30 µg), cefalexina (30 µg), cefazolina (30 µg), doxiciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), ampicilina (10 µg) e piperacilina + tazobactam (110 µg).

A atividade da oxidase, perfil enzimático e formas de carbono assimilados foram avaliados com os kits *API ZYM* e *API 20 NE Biomeurieux*, de acordo com a indicação do fabricante, exceto pelo uso de água marinha artificial para o preparo do inóculo de células. As quinonas e lipídios polares foram extraídos por protocolo em duas etapas. A primeira etapa foi a extração em uma mistura de hexano-metanol (1:2, v/v) para a obtenção das quinonas na fase do hexano. Após, na segunda etapa, os lipídios polares foram recuperados com solução 0,3% (v/v) metanol-solução aquosa de NaCl. As quinonas foram analisadas em RP-HPLC com coluna RP<sub>18</sub> e monitoramento em sistema de absorção de luz de comprimento de onda ultravioleta (UV). Os lipídios polares foram avaliados em cromatografia de camada delgada de sílica revelada com spray para a detecção de grupos funcionais [260–262]. As análises do perfil enzimático, assimilação de carbono, quinonas e lipídios polares foram realizadas pelo serviço de identificação da *DSMZ (Identification Services of DSMZ Leibniz Institute)*. Essas 3 análises foram as únicas realizadas apenas com a linhagem *Muricauda-K001*. Todas as demais análises foram realizadas juntamente com a linhagem de referência *DSM 13258*, com o intuito comparativo e confirmatório.

Os ácidos graxos foram avaliados de acordo com o padrão *Sherlock Microbial Identification System (Sherlock, v. 6.2)*. As células foram coletadas após 48h de crescimento e transferidas para tubos de vidro com tampa de teflon. A saponificação dos ácidos graxos foi realizada com 1 mL de solução metanol/hidróxido de sódio (150 mL água deionizada, 150 mL metanol, 45 g NaOH) à 100°C por 30 minutos. Dois mililitros de metano 6M em HCL foram adicionados aos tubos, que ficaram incubados por 10 minutos à 80°C. A separação dos ésteres metílicos dos ácidos orgânicos foi realizada pela adição de 1,25 mL de hexano/éter terc-butílico (1: v/v), após agitação por 10 minutos. A fase mais pesada foi

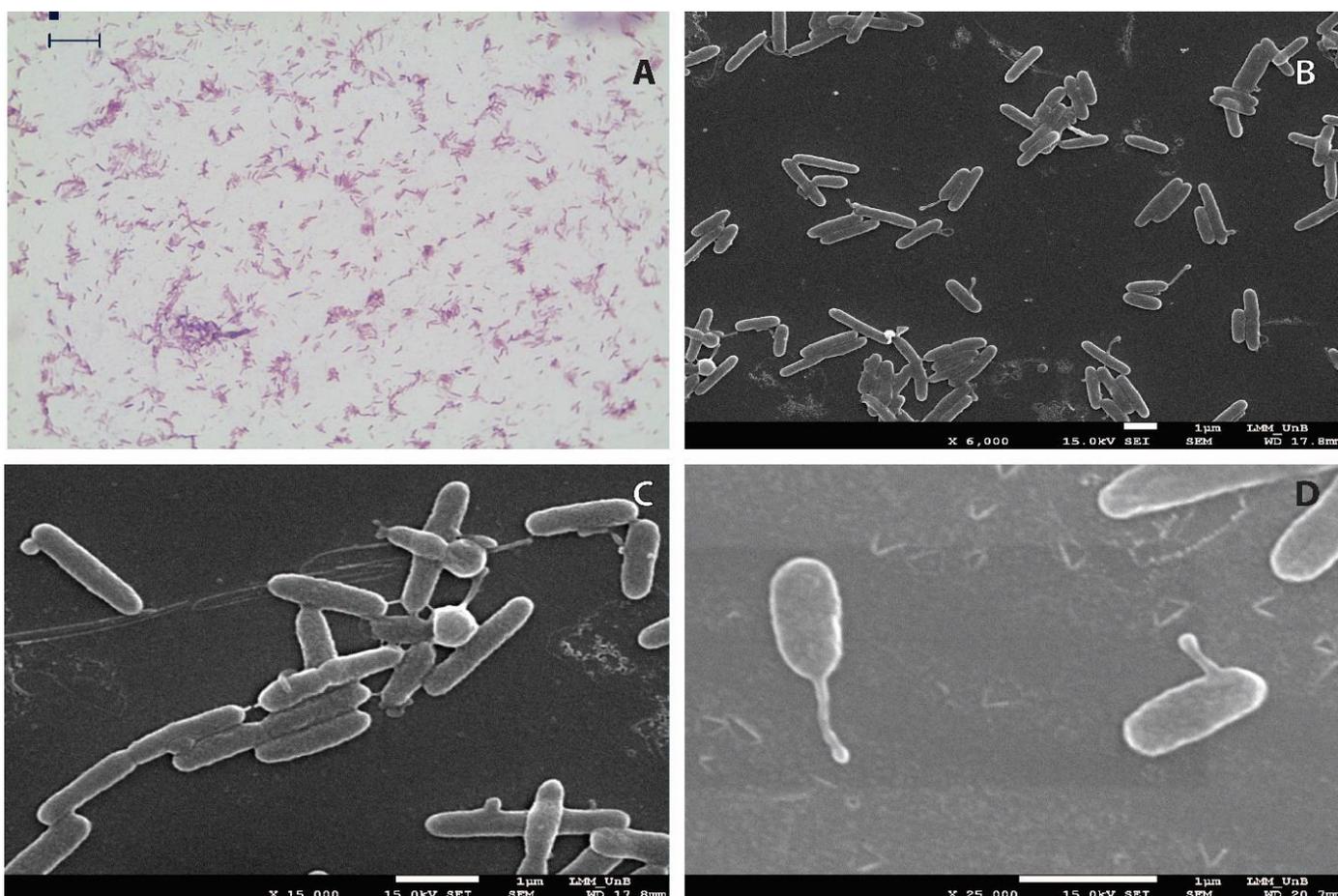
descartada e a fase superior contendo os ácidos graxos metil-ésteres foi recuperada e lavada com 0,25 mol/L NaOH e estocada até a análise. As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso (Agilent 7890<sup>a</sup>) usando o a biblioteca do método RTSBA6 [263,264].

### 3.3.6 Análise comparativa do perfil proteico de *Muricauda-K001*

A análise comparativa do perfil proteico em espectrometria de massa de sistema MALDI-TOF foi realizada para a confirmação de fenótipos distintos entre *Muricauda-K001* e *M. ruestringensis* DSM 13258 [265,266]. As extrações proteicas foram realizadas e os extratos aplicados em sextuplicatas técnicas em placa de aço com 96 poços delimitados. Após, os poços foram cobertos com 1 µL de 10 mg/mL da matriz *α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA)* (50% (v/v) acetonitrila, 0,30% (v/v) ácido trifluoroacético). Os espectros foram obtidos em espectrômetro *Autoflex SpeedII MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics)* no modo linear positivo, com range entre 2000 – 20,000 m/z e aquisição por 2000 tiros por poço, utilizando o *software* FlexControl 3.0 [265,267]. Os espectros foram analisados no *software* MALDI Biotyper 3.0 [265–268]. Os *Main spectra profile (MSP)* foram criados utilizando as sextuplicatas técnicas, comparadas com a base de dados do *software* MALDI Biotyper 3.0 e entre as linhagens *Muricauda-K001* e *DSM 13258*. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas biológicas. O dendrograma foi construído utilizando as informações do *MSP* de cada réplica no *software* MALDI Biotyper 3.0, que também gera *scores* ao comparar os *MSP*. Os *scores* menores que 2 indicam que as bactérias comparadas pertencem a espécies diferentes.

### 3.4 Resultados e Discussão

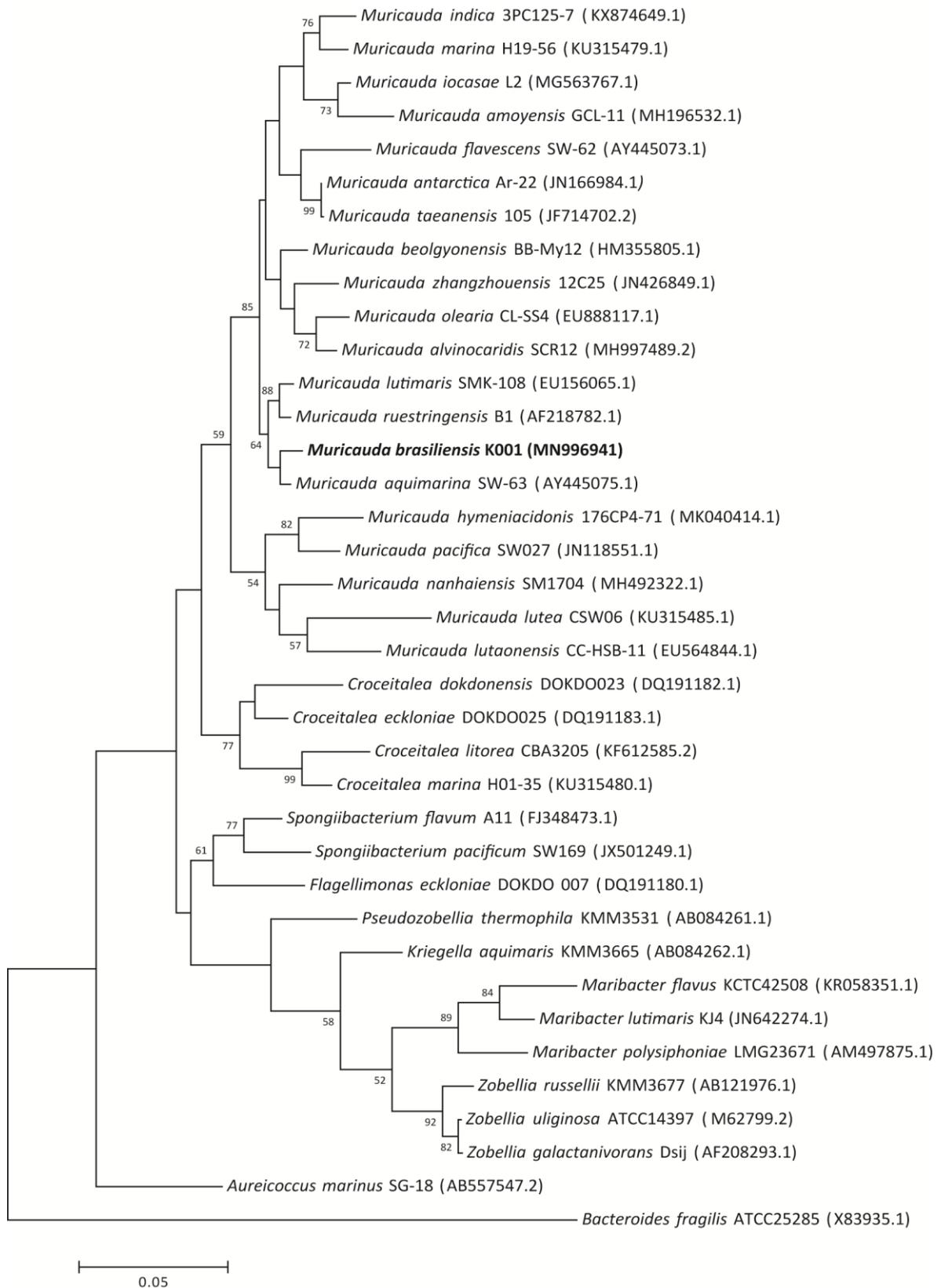
As células da linhagem *Muricauda-K001* são bacilos Gram-negativos (Figura 3.2) e algumas apresentam apêndice, assim como algumas espécies do gênero *Muricauda* e a linhagem referência *DSM 13258*. Ao contrário da *DSM 13258*, nem todas as células de *Muricauda-K001* apresentaram vesículas no topo do apêndice (Figura 3.2). Em *DSM 13258* o papel funcional dos apêndices foi relacionado à função de conexão da célula com o substrato. A funcionalidade do apêndice é aplicável ao nicho ecológico de *Muricauda-K001*, que foi isolada da cianosfera do co-cultivo CCMR0080. Imagens realizadas da cianobactéria mostram bactérias aderidas e entrelaçadas por prolongamentos. Não é possível afirmar a identidade das células devido à limitação dessa técnica, porém é possível que sejam células de *Muricauda-K001*. Após 24h de crescimento em meio líquido observa-se a formação de flocos nas culturas de *Muricauda-K001*, situação observada para culturas *DSM 13258* somente após 48h de crescimento.



**Figura 3.2.** Fotomicrografias da linhagem *Muricauda-K001* ao microscópio de luz após coloração de *Gram* em **A** e ao microscópio eletrônico de varredura em **B** (ampliação 6000x), **C** (ampliação 15000x) e **D** (ampliação 25000x). Algumas células apresentam um apêndice (**B**, **C** e **D**) que não possui um padrão apical ou axial definido, podendo ser prolongado a partir de vários eixos.

### 3.4.1 Taxonomia baseada no gene marcador molecular *rRNA* 16S

A clonagem e sequenciamento Sanger permitiram a confirmação da sequência parcialmente completa do *rRNA* 16S da linhagem *Muricauda-K001*. A sequência de 1490 nucleotídeos obtida foi depositada no banco de dados GenBank/EMBL/DDBJ, sob o número MN996941. A classificação da linhagem baseada nessa sequência confirmou a identidade com o gênero *Muricauda*. As maiores similaridades foram apresentadas com as espécies *M. aquimarina* (98,2%), *M. ruestringensis* (98.20%) e *M. lutimaris* (97.86%). O intervalo de similaridade com as demais espécies do grupo ficou entre 97,86 e 92,72%. A árvore filogenética mostra que *Muricauda-K001* forma um subclado com *M. aquimarina*, *M. ruestringensis* e *M. lutimaris*, no braço com *M. aquimarina* (Figura 3.3).

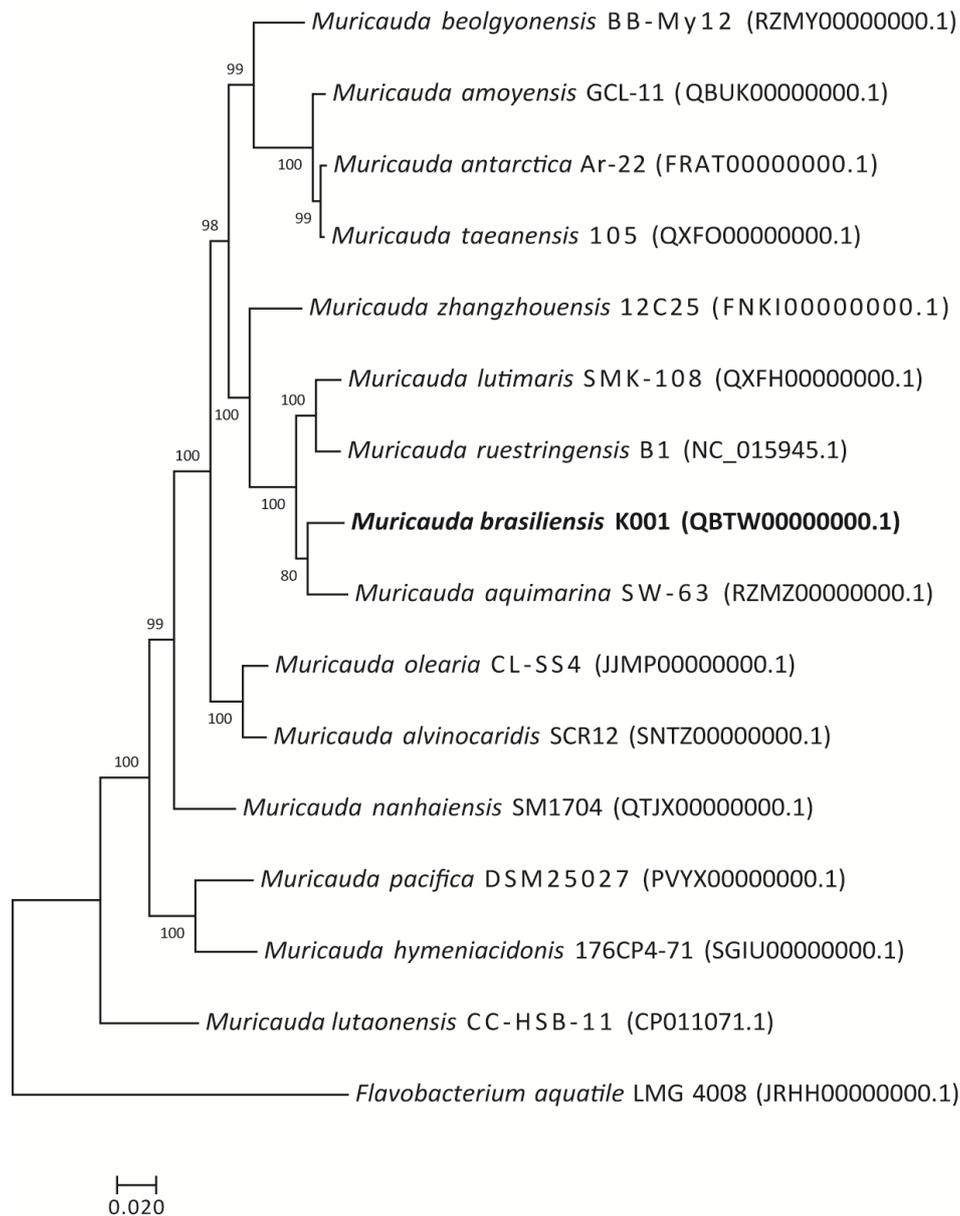


**Figura 3.3.** Árvore filogenética (*Maximum-likelihood*) baseada na sequência do *rRNA* 16S indicando o posicionamento taxonômico de *Muricauda-K001*. Os valores de *Bootstrap* (1000x) maiores que 50% estão apresentados nos ramos. A barra indica 0,05 substituições por nucleotídeo. *Bacteroides fragilis* ATCC25285 foi utilizado como *outgroup*.

### 3.4.2 Taxonomia baseada nos parâmetros *OGRl*

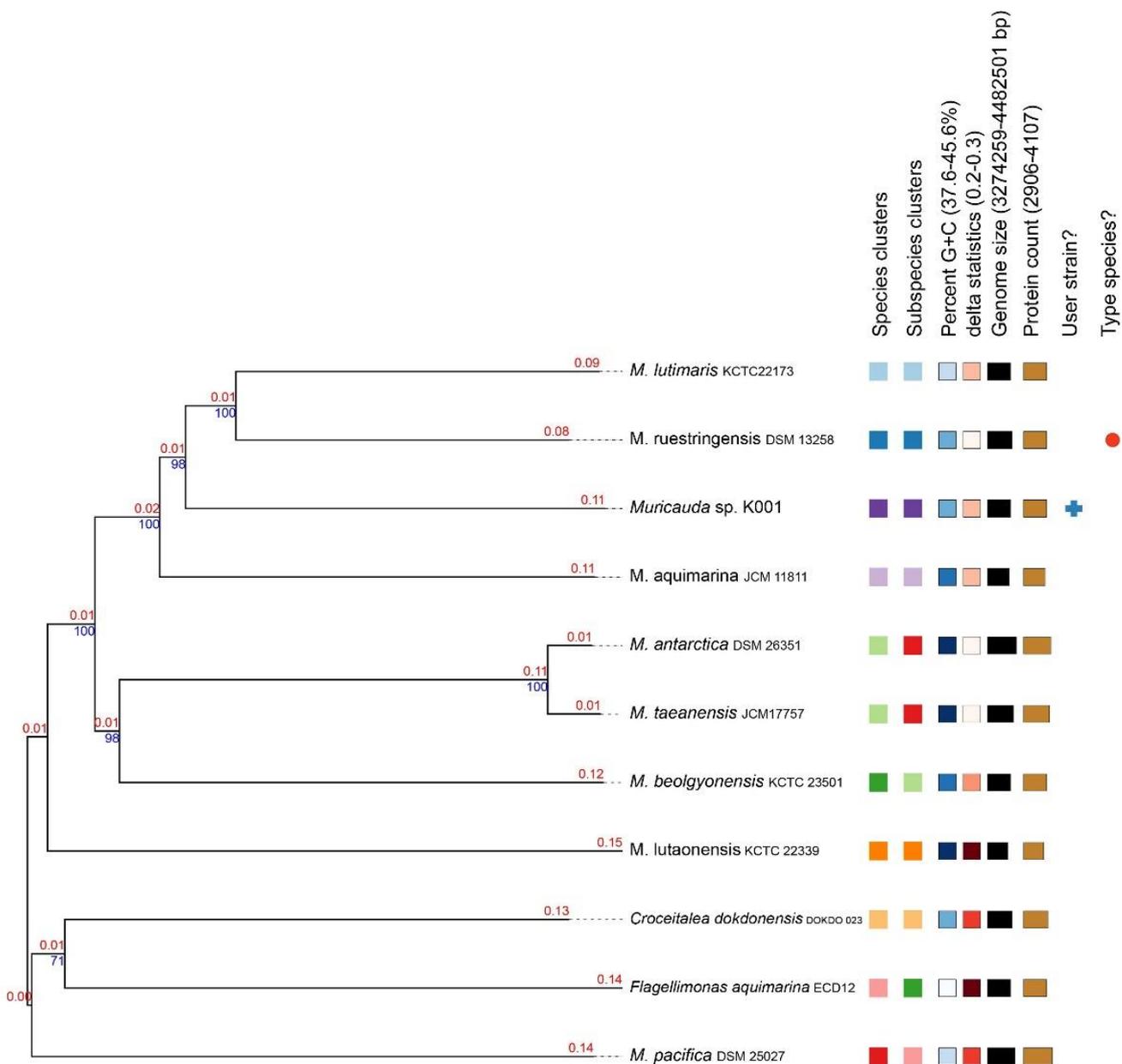
A versão do genoma avaliada para a filogenia foi um *draft* de boa qualidade que, apesar da distribuição em 55 *contigs*, apresentou contaminação de apenas 0,65%, cobertura de aproximadamente 300x, n50 e L50 de 232.816 pares de base e 5 *contigs*, respectivamente [167]. A completude do genoma foi de 98,6% (437 *single copy genes* do conjunto de 443 ortólogos do grupo *Bacteroidetes*) [167]. Essas características de montagem atendem aos critérios propostos para a avaliação dos parâmetros genômicos (*OGRl*) de delimitação de espécies [165]. Baseada nessa montagem e em dados disponíveis em bancos de dados no ano de 2020, os maiores valores de ANI foram calculados entre *Muricauda-K001* e *M. ruestringensis* (80,82), seguido por *M. lutimaris* (79,23) e *M. aquimarina* (79,23). *M. ruestringensis* também apresentou o maior valor de *dddH* (23,40%), seguido por *M. lutimaris* (22,70%) e *M. aquimarina* (21,60%). Ambos os valores indicam que *Muricauda-K001* é uma espécie distinta, com ANI < 95% e *dddH* < 70% [165].

A árvore filogenética baseada em 31 marcadores moleculares proteicos apresentou topologia similar à árvore baseada no *rRNA* 16S, com *Muricauda-K001* aparecendo no mesmo subclado citado. Porém, essa árvore filogenômica aparece com confiança maior em nós que sustentam o clado, aumentando assim a robustez do posicionamento (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Árvore filogenética (*Maximum-likelihood*) baseada em 31 marcadores moleculares proteicos indicando o posicionamento taxonômico de *Muricauda-K001*. Alinhamento dos aminoácidos realizado com *MAFFT*, edição com *MEGA 7* e árvore gerada com o *Fasttree*. *Flavobacterium aquatile* foi utilizado como *outgroup*.

A avaliação realizada na plataforma *TYGS – DSMZ*, que inclui a avaliação do *rRNA 16S*, *ANI* e *dDDH*, confirmaram que a linhagem *Muricauda-K001* pertence a uma nova espécie dentro do gênero *Muricauda*. A figura com a árvore filogenômica calculada pelo *TYGS* está apresentada na figura 3.5. A análise realizada na plataforma *TrueBac ID (EZBioCloud)* também confirmou que *Muricauda-K001* é uma espécie distinta dentro do gênero *Muricauda*. Ambas as plataformas confirmaram a avaliação dos parâmetros avaliados individualmente, corroborando para a indicação de uma nova espécie.



**Figura 3.5.** Árvore filogenômica gerada pela plataforma *on-line* TYGZ – DSMZ mostrando o posicionamento taxonômico de *Muricauda-K001*. A avaliação pelo protocolo automatizado da plataforma indica que *Muricauda-K001* é uma nova espécie dentro do gênero *Muricauda*.

### 3.4.3 Caracterização fenotípica de *Muricauda-K001*

As características fisiológicas da linhagem *Muricauda-K001* e uma comparação com outras espécies do gênero estão sumarizadas na Tabela 3.1. A similaridade entre as espécies é grande, e esse é um dos motivos que atualmente apenas são aceitas descrições de novas espécies com sequência genômica disponível [269]. Como distinção de *M. ruestringensis* DSM 13258 e *M. aquimarina* SW-63, *Muricauda-K001* mostrou a ausência da lipase (C14) no teste *API ZYM* e inabilidade de crescimento em

ácido cáprico no teste *API 20 NE*. Não foi observado crescimento em anaerobiose, motilidade e pigmentos do tipo flexirrubina.

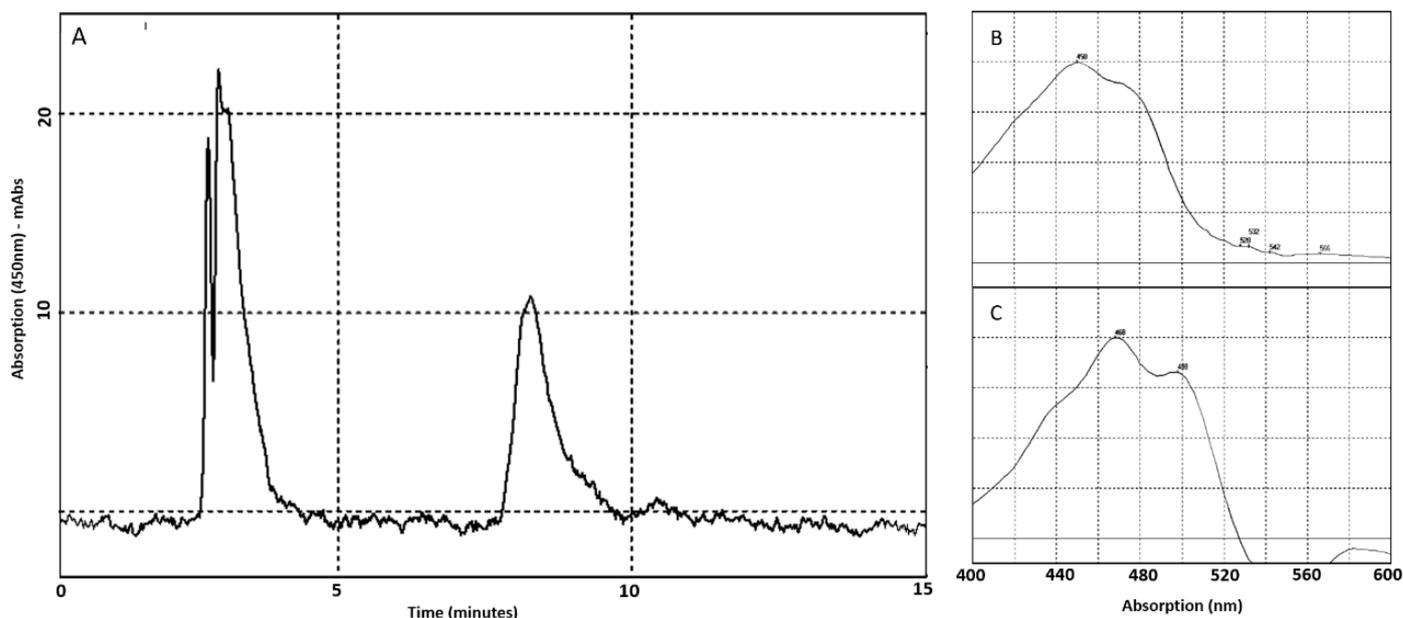
**Tabela 3.1.** Características fenotípicas da linhagem *Muricauda-K001* e linhagens de referências. Linhagens: 1, *Muricauda-K001*<sup>T</sup>; 2, *M. ruestringensis* DSM 13258<sup>T</sup> (dados de Bruns *et al.* 2001 e deste trabalho); 3, *M. aquimarina* SW-63<sup>T</sup> (dados de Yoon *et al.* 2005 [235]); 4, *M. lutimaris* SMK-108<sup>T</sup> (dados de Yoon *et al.* 2008 [240]). Dados dos Kits *API ZYM* e *API 20 NE* em Yang *et al.* 2013 [151]; +, Positivo; -, negativo; W, fracamente positivo; ND, sem dado.

Característica	1	2	3	4
<b>Cor da colônia</b>	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela
<b>Tamanho da célula (µm)</b>				
Comprimento	1.1 - 2.4	1.1 - 2.7	2.5 - 6.0	0.8 - 5.0
Largura	0.3 - 0.5	0.3 - 0.6	0.2 - 0.5	0.2 - 0.4
<b>Condições de crescimento</b>				
Temperatura ótima (°C)	28 - 33	20 - 30	30 - 37	30
NaCl (% p/v)	0,5 - 9	0,5 - 9	2*	1-10
Espectro de pH	6-8	6-8	7*	6-8
<b>Crescimento anaeróbio facultativo</b>	-	+	-	+
<b>Catalase</b>	+	+	+	+
<b>Hidrólise</b>				
Amido	-	-	-	-
<i>Tween</i> 20	+	+	+	+
<i>Tween</i> 60	+	+	+	-
<i>Tween</i> 80	+	+	+	-
<b>API ZYM†</b>				
Esterase lipase (C8)	+	+	+	W
Lipase (C14)	-	+	+	+
Valina arilamidase	+	+	+	+
Cistina arilamidase	+	+	+	+
Tripsina	+	+	+	+
α-quimiotripsina	+	+	+	+
Fosfatase ácida	+	+	+	+
Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	+	+	+	+
α-Galactosidase	+	+	+	W
β-Galactosidase	+	+	-	W
α-Manosidase	+	+	+	+
<b>API 20NE†</b>				
Urease	-	-	-	-
Hidrólise de gelatina	-	-	-	+
Assimilação de ácido cáprico	-	+	+	+
Assimilação de ácido fenilacético	-	-	-	+
Catalase	+	+	+	W
<b>Conteúdo DNA G+C (mol%)</b>	41,62	41	44,10 – 44,20	41,10

\* condição ótima.

† Informação sobre a linhagem disponível em Yang *et al.* 2013 [151].

A coloração amarela da colônia indicava a produção de carotenoides pela linhagem *Muricauda-K001*, que foi confirmada pela análise em RP-HPLC (Figura 3.6). Assim como em outras espécies do gênero, a análise por comparação do tempo de retenção na coluna e perfil de absorção de luz UV indica que o carotenoide presente é a zeaxantina [270,271].



**Figura 3.6.** Perfil cromatográfico da linhagem *Muricauda-K001*(A) mostrando os picos referente a pigmentos carotenoides. Condições da corrida em HPLC: coluna *RP-C18 Vydac* (218TP54), fase móvel 100% (v/v) MeOH, fluxo 1,0 ml/min. B e C mostram o perfil de absorção no espectro entre 400 e 600 nm dos dois picos apresentados em A.

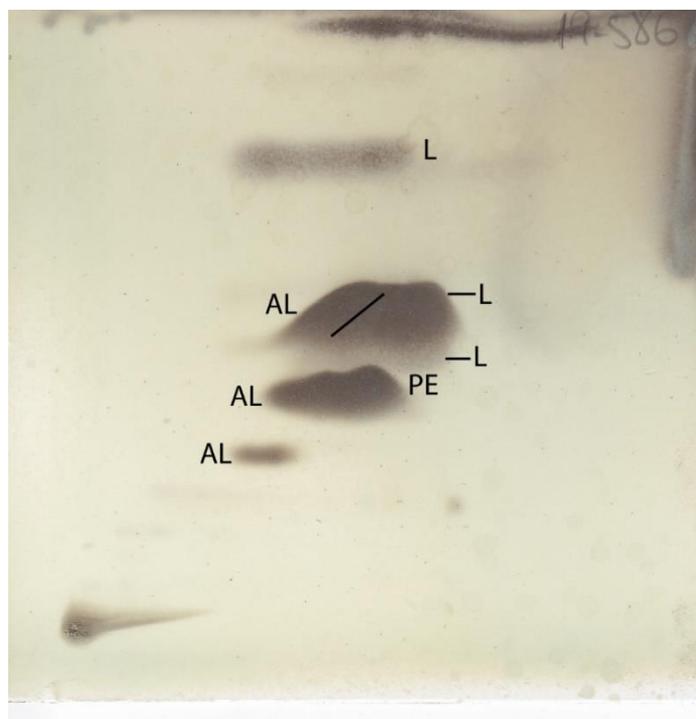
O perfil de ácidos graxos de *Muricauda-K001* (Tabela 3.2) é similar aos das linhagens de referência, exceto pela abundância dos ácidos graxos iso-C<sub>15:0</sub> (35.21%), iso-C<sub>15:1</sub>G(14.48%), iso-C<sub>17:0</sub>3-OH (22.55%) e *summed feature 3* (8.93%). Dentre os ácidos graxos menos abundantes, alguns padrões foram identificados apenas em *Muricauda-K001*: presença de C<sub>14:0</sub> (0.85%), C<sub>18:0</sub> (2.73%), iso-C<sub>17:0</sub> (0.67%), C<sub>18:1</sub>ω9c (0.98%) e a ausência de iso-C<sub>14:0</sub>, anteiso-C<sub>15:1</sub> A, C<sub>15:0</sub>3-OH e *summed feature 8*.

**Tabela 3.2.** Composição de ácidos graxos (%) da linhagem *Muricauda-K001* e espécies correlatas. Linhagens: 1, *Muricauda-K001*<sup>T</sup>; 2, *M. ruestringensis* DSM 13258<sup>T</sup>; 3, *M. aquimarina* SW-63<sup>T</sup>; 4, *M. lutimaris* SMK-108<sup>T</sup>. Dados de *Muricauda-K001*<sup>T</sup> e DSM 13258<sup>T</sup> foram gerados nesse trabalho; dados das demais linhagens foram gerados por Yang *et al.* 2013 [151]. A tabela apresenta os ácidos graxos com abundância >5% em relação ao total de ácidos graxos.

	1	2	3	4
<b>Straight-chain</b>				
C <sub>14</sub> :0	0.85	-	-	-
C <sub>16</sub> :0	4.20	1.73	1.4	1.8
C <sub>18</sub> :0	2.73	-	1.4	1.4
C <sub>18</sub> :0 10-methyl	-	-	-	-
<b>Branched</b>				
iso-C <sub>13</sub> :0	-	-	-	0.6
iso-C <sub>14</sub> :0	-	-	0.5	-
iso-C <sub>15</sub> :0	35.21	46.10	24.6	27.2
iso-C <sub>15</sub> :1 G	14.48	17.48	28.30	36.40
iso-C <sub>16</sub> :0	0.77	-	0.7	-
iso-C <sub>17</sub> :0	0.67	0.61	-	-
iso-C <sub>18</sub> :1 H	-	-	-	0.70
anteiso-C <sub>15</sub> :0	0.79	1.42	3.10	2.40
anteiso-C <sub>15</sub> :1 A	-	-	0.70	0.80
<b>Unsaturated</b>				
C <sub>12</sub> :1 at 11–12	-	-	-	2.20
C <sub>13</sub> :1 at 12–13	-	-	-	0.50
C <sub>15</sub> :1 ω6c	-	-	0.80	1
C <sub>17</sub> :1 ω6c	-	-	0.60	0.70
C <sub>17</sub> :1 ω8c	-	-	-	-
C <sub>18</sub> :1 ω5c	-	-	0.60	-
C <sub>18</sub> :1 ω9c	0.98	-	0.80	1.20
<b>Hydroxy</b>				
C <sub>15</sub> :0 2-OH	-	-	-	-
C <sub>15</sub> :0 3-OH	-	-	1.40	1.30
iso-C <sub>15</sub> :0 3-OH	4.24	3.65	5.20	3.30
C <sub>16</sub> :0 3-OH	0.82	0.51	-	-
iso-C <sub>16</sub> :0 3-OH	1.16	0.74	3.60	4.60
C <sub>17</sub> :0 2-OH	-	-	0.80	-
C <sub>17</sub> :0 3-OH	-	-	-	-
iso-C <sub>17</sub> :0 3-OH	22.55	18.68	15.20	5.20
<b>Summed features*</b>				
3	8.93	3.19	2.60	1.20
4	-	0.60	-	-
8	-	-	1.90	2.90
9	1.61	1.93	2.20	1.60

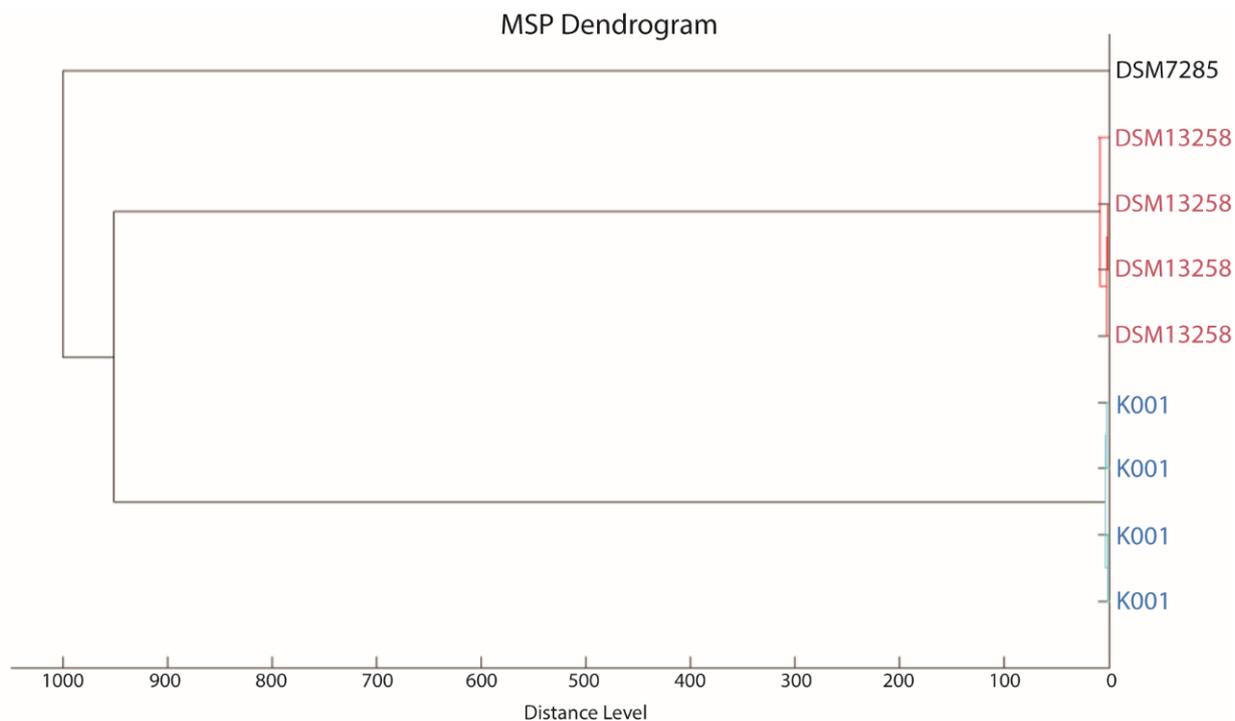
\**Summed Feature* ocorre quando há uma separação imperfeita do pico. *Summed feature 3* representa C<sub>16:1</sub> ω6c e/ou C<sub>16:1</sub> ω7c; *summed feature 4* representa iso-C<sub>17:1</sub> I e/ou anteiso-C<sub>17:1</sub> B; *summed feature 8* representa C<sub>18:1</sub> ω7c e/ou C<sub>18:1</sub> ω6c; *summed feature 9* representa iso-C<sub>17:1</sub> ω9ce/ou C<sub>16:0</sub>10-methyl.

A análise de lipídios polares demonstrou a presença de fosfatidiletanolamina, três aminolipídios não identificados e três lipídios polares não identificados; condizente com o padrão apresentado por membros do gênero *Muricauda*, porém diferindo de *M. ruestringensis* DSM 13258 pela presença dos aminolipídios (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** Cromatografia de camada delgada bi-dimensional apresentando o perfil de lipídios polares total da linhagem *Muricauda-K001*. PE fosfatidiletanolamina; AL, aminolipídios; L, lipídios polares não identificados.

Os perfis proteicos obtidos em MALDI-TOF, pelo plaqueamento direto de colônias e pelas proteínas extraídas de *Muricauda-K001* e *M. ruestringensis* DSM 13258, foram utilizados para criar o *MSP*. O plaqueamento direto das colônias teve baixa reprodutibilidade e não foram utilizados nas análises. Os *MSP* dos extratos proteicos analisados pelo *MALDI Biotyper 3.0 software* (Bruker Daltonics) mostraram identificação com *score* menor que dois para as duas espécies, indicando que as espécies não estão disponíveis no banco de dados próprio utilizado pelo *software*. No entanto, quando comparadas uma com a outra, foram encontrados *scores* menores que 2 para todas as réplicas, indicando que as duas linhagens pertencem a espécies diferentes. A Figura 3.8 apresenta o dendrograma gerado pelos *MSP*, indicando que *Muricauda-K001* e *M. ruestringensis* DSM 13258 agrupam em diferentes clados, mesmo quando um grupo externo é adicionado.



**Figura 3.8.** Dendrograma gerado com os *Main spectra profiles* (MSP) obtidos com *Muricauda-K001* e *DSM 13258* (*Muricauda ruestringensis*), com um grupo externo (*Novosphingobium rosa DSM 7285*). Cada MSP é composto por 6 espectros de massa independentes entre 2.000-20.000 m/z. Para a comparação dos MSP, quatro réplicas biológicas foram realizadas. Os MSP de *Novosphingobium rosa DSM 7285* foram gerados da mesma maneira descrita para *Muricauda-K001* e *DSM 13258*. As réplicas de *Muricauda-K001* e *DSM 13258* agrupam em clados diferentes, indicando espécies diferentes. A informação também pode ser confirmada pelo score menor do que 2 quando os MSP são comparados no *MALDI Biotyper 3.0 software*.

A abordagem polifásica que considerou os parâmetros genômicos *OGRI* (*ANI*, *dDDH*, árvore filogenética de multimarcadores, índice de contaminação e completude do genoma); a informação filogenética baseada no *rRNA 16S* e a caracterização fenotípica, indica que a linhagem *Muricauda-K001* é uma nova espécie dentro do gênero *Muricauda*, cujo nome proposto é *Muricauda brasiliensis* sp. nov.

#### 3.4.4 Descrição de *Muricauda brasiliensis* sp. nov.

*Muricauda brasiliensis* (bra.si.li.en'sis N.L. masc./fem. adj. *Brasiliensis* referente ao país onde a linhagem tipo da espécie foi isolada, Brasil).

As células são Gram-negativas, bacilares, não-flageladas, não móveis, com aproximadamente 0,3 – 0,5 µm de comprimento e 1,1 – 2,4 µm de largura e apresentam crescimento estritamente aeróbio. Apêndices estão presentes em muitas células após 48h de incubação em *DIFCO 2216*, característica comum no gênero *Muricauda*. Sob agitação, as células formam agregados em meio líquido após 24h. Em *DIFCO 2216* sólido as colônias são amarelas, pequenas, translúcidas, circulares, convexas, com bordas regulares e apresentam entre 1 e 2 mm de diâmetro após 48h. O crescimento

ocorre entre 15 e 37°C, mas não à 4 e 42°C, com temperatura ótima à 30°C. As concentrações de NaCl suportadas variam entre 0,5 e 9% e é possível crescimento em meio com NaCl como única fonte de sal (2,25%), porém não em ausência de sal. As células são catalase e oxidase positiva. A habilidade de hidrólise de tween 20, 60, 80 estão presentes, porém não foi observada hidrólise do amido. Pigmentos do tipo carotenoide estão presentes, mas do tipo flexirrubina não. As células são positivas para hidrólise de esculina, atividade  $\beta$ -galactosidase, assimilação de glicose, arabinose, manose, n-acetilglicosamina, maltose e malato. As células são negativas para a redução do nitrato, formação do indol, fermentação da glicose, arginina-hidrolase e atividade da urease, hidrólise de gelatina, e assimilação de manitol, gluconato, caprato, adipato, citrato e fenilacetato. As células são positivas para fosfatase alcalina, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucina-arilamidase, valina-arilamidase, cistina-arilamidase, tripsina, quimiotripsina, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfatase,  $\alpha$ -galactosidade,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, n-acetil- $\beta$ -glucosidase e  $\alpha$ -manosidase. As células são negativas para lipase (C14),  $\beta$ -glucuronidase e  $\alpha$ -fucosidase. *Muricauda-K001* é suscetível a ciprofloxacina, clindamicina, cloramphenicol, norfloxacin, ofloxacin, eritromicina, ceftazidima, ceftriaxona, tetraciclina, cefalexina, doxiciclina, ampicilina e piperacilina + tazobactam. Mas não é suscetível a amikacina, cefazolina, gentamicina, penicilina G, polymixina B, sulfonamidas, oxacilina e vancomicina. Os ácidos graxos mais abundantes são iso-C<sub>15:0</sub> (35.21%), iso-C<sub>17:0</sub>3-OH (22.55%) e iso-C<sub>15:1</sub> G (14.48%). MK-6 é a quinona respiratória predominante. Os principais lipídios polares incluem fosfatidiletanolamina, três aminolipídios não identificados e três lipídios polares não identificados.

A linhagem tipo é *Muricauda-K001* (=CBMAI 2315<sup>T</sup>=CBAS 752<sup>T</sup>), isolada a partir de co-cultivo de cianobactérias dos *turfs* dos recifes de Abrolhos. O conteúdo G+C (mol) é 41,62%. O número de acesso *GenBank/EMBL/DDBJ* do *rRNA* 16S e do genoma de *Muricauda-K001* são MN996941 e QBTW00000000, respectivamente.

### 3.4.5 A experiência de descrever uma nova espécie de bactéria no Brasil

A identificação de que uma estirpe não conjuga semelhanças suficientes com linhagens de táxons já descritos na literatura implica aos microbiologistas a responsabilidade de caracterização daquele micro-organismo. Para que o micro-organismo represente um novo táxon, considerando-se o exemplo de uma nova espécie dentro de um gênero, é necessário a investigação e comprovação de que a linhagem compartilha características suficientes com os demais integrantes do táxon hierárquico superior, o gênero. E, ao mesmo tempo, acumule diferenças suficientes para não ser classificada em nenhum táxon já descrito, nenhuma das espécies. A fase posterior a esse posicionamento taxonômico é determinar a nomenclatura do novo grupo, sendo o novo micro-organismo a linhagem tipo da nova espécie.

A taxonomia dos procariotos é ordenada pelo Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos (*International Committee on Systematics of Prokaryotes - ICSP*), que instituiu o

*International Code of Nomenclature of Prokaryotes (ICNP)*. O ICNP apresenta regras e recomendações para que novos táxons identificados e descritos sejam nomeados adequadamente. Na prática, o ICNP é um instrumento de comunicação científica. Novos táxons possuem valor taxonômico após terem sua nomenclatura incluída na *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)*. A sociedade possui um jornal específico para a publicação de novas descrições taxonômicas, o *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology (IJSEM)*. Porém, táxons descritos em outros jornais também podem ser incluídos na LPSN após validação pelo IJSEM, desde que tenham sido descritos seguindo as regras do ICNP [272,273].

Dentre vários princípios, considerações, regras e recomendações, o ICNP determina que a descrição de novas espécies tem como pré-requisito o depósito público e manutenção da linhagem tipo em coleções de culturas de acesso público filiadas a WFCC, em pelo menos dois países diferentes. E nesse ponto iniciam-se as complicações para os microbiologistas brasileiros. Segue a transcrição de trecho do ICNP:

**“Rule 18a ...**

*(2) As from 1 January 2001, a description, preserved (non-viable) specimen, or illustration may not serve as the type.”*

**“Rule 30 ...**

*(b) As of 1 January 2001, the description of a new species, or new combinations previously represented by viable cultures must include the designation of a type strain (see Rule 18a), and a viable culture of that strain must be deposited in at least two publicly accessible culture collections in different countries from which subcultures must be available.*

*The designations allotted to the strain by the culture collections should be quoted in the published description. Evidence must be presented that the cultures are present, viable, and available at the time of publication.*

*Note. In exceptional cases, such as organisms requiring specialized facilities (e.g. Risk Group/Biological Safety Level 3, high pressure requirements, etc.), exceptions may be made to this Rule. Exceptions will be considered on an individual basis by a committee consisting of the Chairman of the ICSP, the Chairman of the Judicial Commission and the Editor of the IJSEM. Exceptions will be made known at the time of publication.*

*(4) Organisms deposited in such a fashion that access is restricted, such as safe deposits or strains deposited solely for current patent purposes, may not serve as type strains.”*

<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000778>

Se um cientista tivesse que relatar em uma palavra a experiência de descrever uma nova espécie de bactéria do Brasil, talvez seria utilizado um adjetivo, desesperadora. Em 2015 foi sancionada a lei nº 13.123 “que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade”. Os problemas começam na organização interna de alguns centros de pesquisa. Várias e várias rodadas de palestras e esclarecimento sobre a necessidade de regularização

e preenchimento do SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) foram realizadas em parcerias com instituições, comitês e órgãos. Porém, em algumas instituições não houve avanço organizacional interno para definição de uma estrutura clara aos pesquisadores, com orientações práticas e padronizadas de como proceder nos vários aspectos de influência da lei. Como continuar trabalhando nas pesquisas sem adentrar a ilegalidade passou a ser uma das principais dúvidas de pesquisadores desses centros onde não houve clara estruturação interna. Quem é o representante legal? Quem pode assinar documentos? Qual departamento é o responsável? Onde encontrar as respostas? Como fazer solicitações? Nada disso ficou disponível na estrutura de algumas instituições de pesquisa.

Os efeitos e aplicações da Lei nº 13.123/2015 são amplos, mas a discussão que segue é estrita aos aspectos sobre a descrição de novas espécies de bactérias. A Lei foi regulamentada pelo decreto nº 8.772 que entrou em vigor em 11 de maio de 2016, data de sua publicação. Desde então novas espécies de bactérias do Brasil não podem ser descritas com o devido cumprimento de todas as normas nacionais e internacionais. Segue transcrição de trecho da Lei nº 13.123:

*“Art. 11. Ficam sujeitas às exigências desta Lei as seguintes atividades:*

*I – acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado;*

*II – remessa para o exterior de amostras de patrimônio genético; e*

*III - exploração econômica de produto acabado ou material reprodutivo oriundo de acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado realizado após a vigência desta Lei.*

*§ 1º É vedado o acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado por pessoa natural estrangeira.*

*§ 2º A remessa para o exterior de amostra de patrimônio genético depende de assinatura do termo de transferência de material, na forma prevista pelo CGen.*

**Art. 12. Deverão ser cadastradas as seguintes atividades:**

*I - acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado dentro do País realizado por pessoa natural ou jurídica nacional, pública ou privada;*

*II - acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado por pessoa jurídica sediada no exterior associada a instituição nacional de pesquisa científica e tecnológica, pública ou privada;*

*III - acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado realizado no exterior por pessoa natural ou jurídica nacional, pública ou privada;*

*IV - remessa de amostra de patrimônio genético para o exterior com a finalidade de acesso, nas hipóteses dos incisos II e III deste caput ; e*

*V - envio de amostra que contenha patrimônio genético por pessoa jurídica nacional, pública ou privada, para prestação de serviços no exterior como parte de pesquisa ou desenvolvimento tecnológico.*

*§ 1º O cadastro de que trata este artigo terá seu funcionamento definido em regulamento.*

*§ 2º O cadastramento deverá ser realizado previamente à remessa, ou ao requerimento de qualquer direito de propriedade intelectual, ou à comercialização do produto intermediário, ou à divulgação dos resultados, finais ou parciais, em meios científicos ou de comunicação, ou à notificação de produto acabado ou material reprodutivo desenvolvido em decorrência do acesso.*

*§ 3º São públicas as informações constantes do banco de dados de que trata o inciso IX do § 1º do art. 6º, ressalvadas aquelas que possam prejudicar as atividades de pesquisa ou desenvolvimento científico ou tecnológico ou as atividades comerciais de terceiros, podendo ser estas informações disponibilizadas mediante autorização do usuário.”*  
[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/ato2015-2018/2015/lei/13123.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2015-2018/2015/lei/13123.htm)

Seguindo os critérios propostos pela lei 13.123/2015, o depósito de uma linhagem de micro-organismo em coleções de cultura internacionais se encaixa na modalidade “Remessa” de patrimônio genético ao exterior. Para a remessa acontecer ela precisa ser cadastrada no SisGen e as duas partes devem assinar um TTM (Termo de Transferência do Material). No TTM devem constar condições que garantam o cumprimento do artigo 12, incisos I e II. Sendo uma coleção de culturas quem recebe a linhagem, ela deve se responsabilizar por informar ao usuário final a exigência de cumprimento das normas brasileiras. Segundo o Art. 11. § 1º (Lei 13128/2015) “É vedado o acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado por pessoa natural estrangeira”. Logo, para realizar o acesso ao patrimônio genético brasileiro os pesquisadores estrangeiros devem associar-se a uma instituição brasileira, que, através de um pesquisador, será a responsável pelo cadastro do acesso no SisGen.

O resultado real dos efeitos da lei 13.123/2015 é que as coleções de cultura internacionais não aceitam depósitos públicos de linhagens de bactérias brasileiras. A razão da recusa se baseia na compreensão de que essa exigência é compreendida pelas coleções de cultura, e pelo ICSP, como uma restrição ao uso desse material biológico, dificultando o processo como um todo, inclusive o repasse para terceiros [274]. Essa restrição não justificaria o investimento feito pelas coleções para a manutenção das linhagens, pois pesquisadores não teriam interesse em bactérias cujo uso poderia ser inviável [274]. Não há consenso sobre essas exigências para acessar o material brasileiro, uma vez que, no caso de novas espécies, o depósito da linhagem deveria ser público. Assim, não é possível cumprir a regra 30 do ICNP, que exige o depósito e acesso irrestrito às linhagens tipo para a publicação de novas espécies. Pelas vias legais atuais, nenhuma nova espécie de bactéria do Brasil pode ter seu nome validado e incluído na LSPN.

Durante a submissão do artigo com a descrição de *M. brasiliensis*, a revista *IJSEM* mostrou-se ainda mais rígida ao receber a proposta de nova espécie. Não eram aceitos depósitos da cultura em países que até aquele momento não haviam ratificado o protocolo de Nagoya, sob alegação de insegurança jurídica que não garantia em definitivo o acesso público à linhagem. Ou seja, caso alguma coleção aceitasse a linhagem brasileira para depósito público, essas coleções não poderiam ser da Índia, África Do Sul, Brasil E Coréia Do Sul (*Polar e Alpine Microbial Collection*). A mesma interpretação foi utilizada para o depósito em coleções de culturas com sede no Brasil, mesmo que filiadas à WFCC, esses depósitos não foram aceitos pela revista. O Brasil ratificou recentemente o protocolo de Nagoya, os possíveis impactos desse fato não foram avaliados nesse trabalho.

Em suma, o longo e laborioso processo metodológico para caracterização de novas espécies acaba sendo publicado em outras revistas, devido ao seu valor como pesquisa científica, mas não cumprem seu papel na taxonomia e outras áreas porque as espécies não têm nome validado e incluso na *LSPN*.

Enquanto a burocracia sobrecarrega os pesquisadores, o mundo gira e as publicações continuam. A descrição da espécie *Muricauda basiliensis*, linhagem tipo *K001* (*Muricauda-K001*), foi publicada no *Brazilian Journal of Microbiology* (*BJM*) em novembro de 2020. Desse período até agora (novembro 2021), praticamente dobrou o número de espécies do gênero *Muricauda* descritas e com taxonomia validada. Uma atualização da árvore com 31 marcadores moleculares foi gerada (Figura 3.9). Duas novas espécies agrupam no sub-clado da linhagem *Muricauda-K001*, sendo que uma delas faz parte do mesmo ramo (*M. chongwuensis*). A avaliação da hibridização do DNA (*dDDH*), apresentada na tabela 3.3, mostra que entre *M. basiliensis* e *M. chongwuensis* há uma hibridização teórica de 66%, muito próximo do limite que diferencia espécies (70%). *M. chongwuensis* ainda não é uma espécie com nomenclatura válida na *LSPN*.

A insegurança é inerente à situação dos microbiologistas brasileiros. O que resta é a esperança de que a situação alcance uma solução em breve. E que o *ICSP* não lance mão dos subterfúgios da regra 18c do *ICNP* e passe a estabelecer “*Neotypes strains*” como linhagem tipo para as espécies descritas a partir das bactérias de origem brasileira.

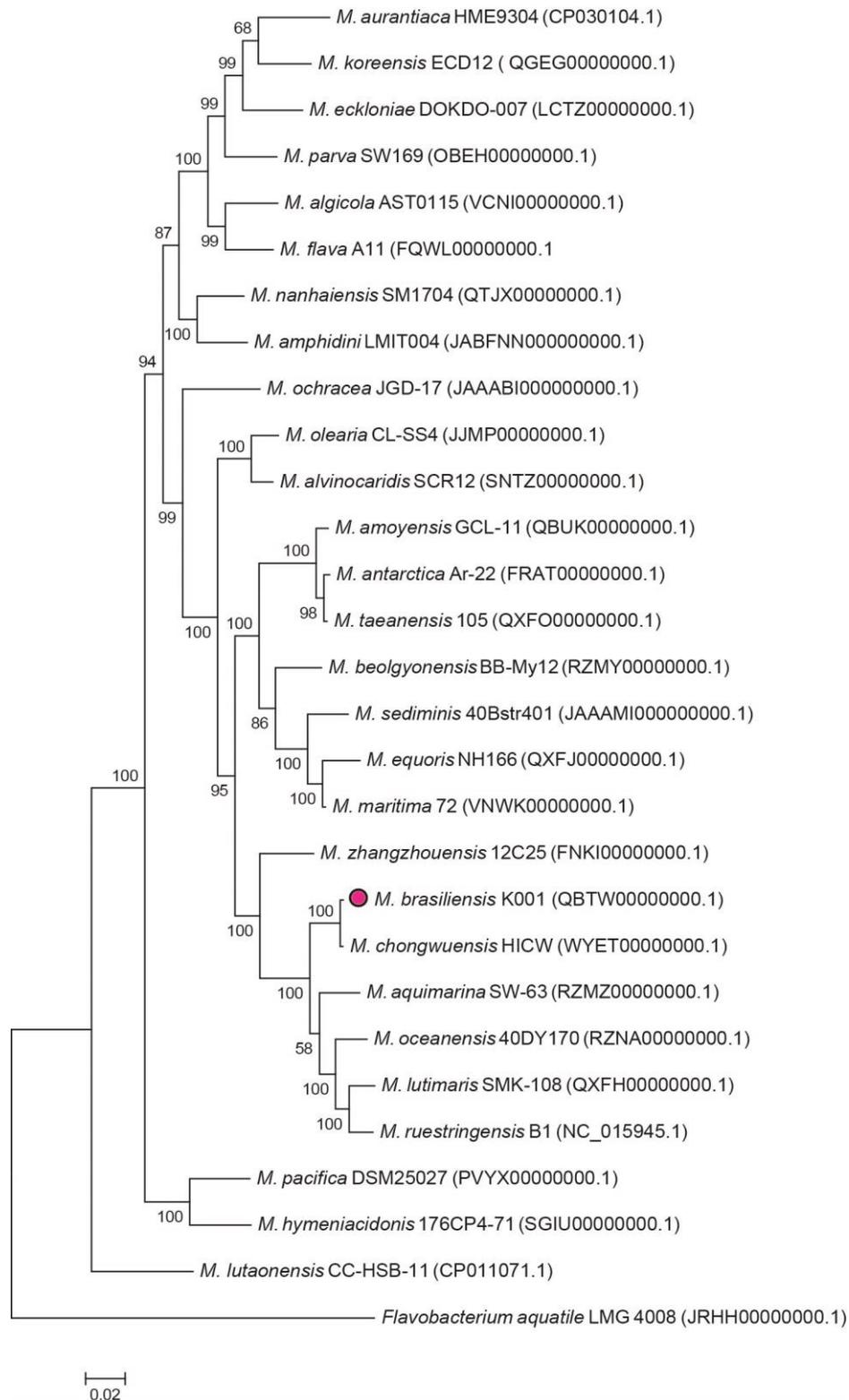
**“Rule 18c Designation as neotype**

*If a strain on which the original description was based cannot be found, a neotype strain may be proposed.*

*A neotype strain must be proposed (proposed neotype) in the IJSEM, together with citation of the author(s) of the name, a description or reference to an effectively published description, and a record of the permanently established culture collection(s) where the strain is deposited (see also Note 1 to Rule 24a).*

*The author should show that a careful search for the strains used in the original description has been made and that none of them can be found. The author should also demonstrate that the proposed neotype agrees closely with the description given by the original author. The neotype becomes established (established neotype) two years after the date of its publication in the IJSEM, provided that there are no objections, which must be referred within the first year of the publication of the neotype to the Judicial Commission for consideration.*

*Note. The term “strain” refers to the culture or subcultures of it, described in the original description. This is not restricted to the strain bearing the culture collection number mentioned in the valid publication, but refers to any culture knowingly derived from the original strain.” (<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000778>)*



**Figura 3.9.** Árvore filogenética (*Maximum-likelihood*) baseada em 31 marcadores moleculares proteicos indicando o posicionamento de *Muricauda-K001* entre as espécies descritas para o gênero *Muricauda* até novembro de 2021. A linhagem *Muricauda-K001* (*M. brasiliensis*) está marcada pelo ponto rosa. Alinhamento dos aminoácidos realizado com MAFFT, edição no MEGA (v. 7) e árvore gerada com o Fasttree. *Flavobacterium aquatile* LMG 4008 foi utilizada como *outgroup*.

**Tabela 3.3.** Hibridização digital do DNA (*dDDH*) entre o genoma de *Muricauda-K001* e as espécies descritas para o gênero *Muricauda* até novembro de 2021.

<i>Muricauda-K001</i>	<i>dDDH</i> Fórmula 2					
	Genoma Referência	<i>DDH</i>	<i>Model C.I.</i>	<i>Distance</i>	<i>Prob. DDH &gt;= 70%</i>	<i>G+C difference</i>
<i>M. chongwuensis</i>		66.90	[63.9 - 69.7%]	0.0405	72	0.24
<i>M. oceani</i>		28.00	[25.6 - 30.5%]	0.1538	0.04	1.10
<i>M. oceanensis</i>		24.20	[21.9 - 26.7%]	0.1800	0.01	0.74
<i>M. ruestringensis</i>		23.50	[21.2 - 26%]	0.1861	0	0.32
<i>M. lutimaris</i>		22.80	[20.5 - 25.3%]	0.1918	0	1.57
<i>M. aquimarina</i>		21.60	[19.4 - 24.1%]	0.2028	0	1.76
<i>M. zhangzhouensis</i>		20.70	[18.4 - 23.1%]	0.2126	0	1.80
<i>M. maritima</i>		19.70	[17.5 - 22.1%]	0.2232	0	1.70
<i>M. aequoris</i>		19.50	[17.3 - 21.9%]	0.2252	0	1.70
<i>M. algicola</i>		19.50	[17.3 - 21.9%]	0.2252	0	1.70
<i>M. sediminis</i>		19.50	[17.3 - 21.9%]	0.2255	0	1.25
<i>M. taenensis</i>		19.50	[17.3 - 21.8%]	0.2260	0	3.93
<i>M. hadalis</i>		19.40	[17.2 - 21.7%]	0.2272	0	3.94
<i>M. amoyensis</i>		19.30	[17.1 - 21.7%]	0.2280	0	4.00
<i>M. antarctica</i>		19.30	[17.1 - 21.7%]	0.2276	0	3.47
<i>M. alvinocaridis</i>		19.20	[17.1 - 21.6%]	0.2285	0	0.66
<i>M. beolgienensis</i>		18.90	[16.7 - 21.3%]	0.2328	0	1.95
<i>M. olearia</i>		18.70	[16.5 - 21%]	0.2355	0	2.19
<i>M. amphidinii</i>		18.00	[15.8 - 20.3%]	0.2448	0	2.75
<i>M. nanhanhaiensis</i>		17.90	[15.7 - 20.2%]	0.2462	0	0.97
<i>M. ochracea</i>		17.80	[15.6 - 20.1%]	0.2473	0	0.57
<i>M. ecklonie</i>		17.70	[15.5 - 20%]	0.2486	0	3.83
<i>M. flava</i>		17.70	[15.6 - 20.1%]	0.2479	0	0.32
<i>M. parva</i>		17.60	[15.5 - 19.9%]	0.2496	0	3.31
<i>M. koreensis</i>		17.50	[15.4 - 19.8%]	0.2512	0	4.06
<i>M. lutaonensis</i>		17.50	[15.3 - 19.8%]	0.2514	0	3.29
<i>M. aurantiaca</i>		17.40	[15.3 - 19.8%]	0.2518	0	3.61
<i>M. hymeniacionis</i>		17.30	[15.2 - 19.6%]	0.2538	0	0.00
<i>M. pacifica</i>		17.20	[15.1 - 19.5%]	0.2553	0	2.02

### 3.5 Conclusões

A caracterização polifásica da linhagem *Muricauda-K001* permitiu a determinação de sua posição taxonômica como uma nova espécie do gênero *Muricuda*. A linhagem tipo *Muricauda-K001* da nova espécie *Muricauda brasiliensis* está depositada em duas coleções de culturas filiadas à WFCC, garantindo assim a segurança, preservação e acesso à cultura.

Dentro de um dos co-cultivos de uma cianobactéria e bactérias heterotróficas associadas foi possível identificar uma nova espécie. Esse é apenas um apontamento da biodiversidade que ainda precisamos revelar nos recifes de Abrolhos e nas valiosas culturas laboratoriais já obtidas a partir desse ambiente.

## 4 - Perspectivas

A determinação da composição bacteriana dos co-cultivos, apresentada no primeiro capítulo, permite a predição de metabolismos e dinâmicas para aquela comunidade e servirá como base para a definição de estratégias a serem abordadas no futuro. As sucessões na composição da comunidade em relação ao tempo de cultivo e outras variáveis poderão ser avaliadas.

O avanço para determinação de características genômicas dos co-cultivos depende do (i) isolamentos de outras linhagens de bactérias heterotróficas em cultura pura e sequenciamentos metagenômicos com maiores coberturas, utilizando abordagens *long reads*. Assim, será possível a montagem de novos genomas e aprimoramento daqueles já montados.

Dados genômicos mais precisos são necessários para o delineamento de experimentos que respondam sobre dinâmica metabólica e populacional nos co-cultivos em condições que simulem situações ambientais variadas, como diferentes concentrações de nutrientes (N, P, S, C) e temperaturas, por exemplo.

A obtenção de culturas puras de outras espécies de bactérias heterotróficas, especialmente dos *taxa* menos abundantes, depende de estratégias diferentes de cultivo. O esforço é válido, uma vez que é alta a chance de espécies ainda incultiváveis ou não descritas formalmente estarem presentes nos co-cultivos.

A obtenção de culturas puras da cianobactéria *Adonia turfae* para a realização de experimentos não é recomendada. Após análise de literatura e diálogo com pesquisadores de ampla *expertise*, acredita-se que o esforço é grande e pode ser empreendido sem sucesso, devido à morfologia e nicho dessa cianobactéria.

O uso de técnicas como *RT-qPCR*, espectrometria de massa (proteínas/enzimas específicas, proteoma e metaproteoma), sequenciamento de *RNA* total (sequências específicas, transcrito e metatranscrito), citometria de fluxo e ensaios enzimáticos são alguns exemplos de estratégias que podem ser abordadas em desenhos experimentais futuros.

Os genomas já obtidos apontam que as culturas e co-cultivos podem ser utilizados para a prospecção de novas enzimas e metabólitos secundários com atividades de interesse, por exemplo atividade antimicrobiana. Para otimizar os esforços experimentais, é necessário a avaliação detalhada dos dados de maneira comparativa com relação aos bancos de dados específicos para cada aplicação de interesse.

## 5 - Referências bibliográficas

- [1] Guiry MD, Guiry GM. AlgaeBase. World-Wide Electronic Publication <https://www.algaebase.org>; Searched on December 3, 2021.
- [2] WoRMS Editorial Board. World Register of Marine Species Available from <https://www.marinespecies.org> at VLIZ Accessed 2021-12-03 2021.
- [3] Bastos AC., Moura R.L., Moraes F.C., Vieira LS, Braga JC, Ramalho LV, Amado-Filho GM, Magdalena UR, Webster JM. Bryozoans are Major Modern Builders of South Atlantic Oddly Shaped Reefs. *Scientific Rep* 8, 9638 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27961-6>.
- [4] Walter JM, Tschoeke DA, Meirelles PM, de Oliveira L, Leomil L, Tenório M, et al. Taxonomic and functional metagenomic signature of turfs in the Abrolhos reef system (Brazil). *PLoS ONE* 2016; 11:1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161168>.
- [5] Francini-Filho RB, Coni EOC, Meirelles PM, Amado-Filho GM, Thompson FL, Pereira-Filho GH, et al. Dynamics of Coral Reef Benthic Assemblages of the Abrolhos Bank, Eastern Brazil: Inferences on Natural and Anthropogenic Drivers. *PLoS ONE* 2013; 8:1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054260>.
- [6] Walter JM, Coutinho FH, Leomil L, Hargreaves PI, Campeão ME, Vieira V v., et al. Ecogenomics of the Marine Benthic Filamentous Cyanobacterium *Adonisia*. *Microbial Ecology* 2020; 80:249–65. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01480-x>.
- [7] Walter JM, Coutinho FH, Dutilh BE, Swings J. Ecogenomics and Taxonomy of *Cyanobacteria* Phylum 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02132>.
- [8] Barreira e Castro C, Zilberberg C. Recifes brasileiros, sua importância e conservação. In: Zilberg C, Abrantes DP, Marques JA, Machado LF, Marangoni LF de B, editors. *Conhecendo os Recifes Brasileiros: Rede de Pesquisas Coral Vivo*. 1st ed., Rio de Janeiro: Museu Nacional - UFRJ; 2016, p. 17–27.
- [9] Leão ZMAN, Kikuchi RKP, Testa V. Corals and coral reefs of Brazil. *Latin American Coral Reefs* 2003;9–52. <https://doi.org/10.1016/B978-044451388-5/50003-5>.
- [10] Tuckett CA, Wernberg T. High Latitude Corals Tolerate Severe Cold Spell. *Frontiers in Marine Science* 2018;5. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00014>.
- [11] Loiola M, Oliveira MDM, Kikuchi RKP. Tolerance of Brazilian brain coral *Mussismilia braziliensis* to sediment and organic matter inputs. *Marine Pollution Bulletin* 2013;77: 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.033>.
- [12] Hughes TP. Catastrophes, Phase Shifts, and Large-Scale Degradation of a Caribbean Coral Reef. *Science* 1994; 265:1547–51. <https://doi.org/10.1126/science.265.5178.1547>.
- [13] Leão ZMAN, Kikuchi RKP, Ferreira BP, Neves EG, Sovierzoski HH, Oliveira MDM, et al. Brazilian coral reefs in a period of global change: A synthesis. *Brazilian Journal of Oceanography* 2016; 64:97–116. <https://doi.org/10.1590/S1679-875920160916064sp2>.
- [14] NOAA. National Ocean Service website. In What Types of Water Do Corals Live? 2021.

- [15] Leão ZMAN, Kikuchi RKP. The Abrolhos Reefs of Brazil. In: Seeliger U, Kjerfve B, editors. Coastal Marine Ecosystems of Latin America, vol. 144, New York: Springer; 2001, p. 83–96.
- [16] Bruce T, Meirelles PM, Garcia G, Paranhos R, Rezende CE, De RL, et al. Abrolhos Bank Reef Health Evaluated by Means of Water Quality, Microbial Diversity, Benthic Cover, and Fish Biomass Data 2012;7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036687>.
- [17] Abrantes DP, Calderon EN, Castro CB. Mudança de fase em recifes de coral. In: Zilberberg C, Abrantes DP, Marques JA, Machado LF, Marangoni LF de B, editors. Conhecendo os Recifes Brasileiros: Rede de Pesquisas Coral Vivo. 1st ed., Rio de Janeiro: Museu Nacional - UFRJ; 2016, p. 195–204.
- [18] Vermeij MJA, van Moorselaar I, Engelhard S, Hörnlein C, Vonk SM, Visser PM. The effects of nutrient enrichment and herbivore abundance on the ability of turf algae to overgrow coral in the Caribbean. PLoS ONE 2010; 5:1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014312>.
- [19] Pedro Repinaldo FM. Parque Nacional Marinho dos Abrolhos Programa de Monitoramento dos Ambientes Recifais do Parque Nacional Marinho dos Abrolhos Equipe técnica n.d.
- [20] Sánchez-Baracaldo P. Origin of marine planktonic *Cyanobacteria*. Scientific Reports 2015; 5:14–7. <https://doi.org/10.1038/srep17418>.
- [21] Partensky F, Hess WR, Vaultot AD. *Prochlorococcus*, a Marine Photosynthetic Prokaryote of Global Significance. vol. 63. 1999.
- [22] Garcia-Pichel F, Belnap J, Neuer S, Schanz F. Estimates of global Cyanobacterial biomass and its distribution. Algological Studies 2003; 109:213–27. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2003/0109-0213>.
- [23] Welker M, von Döhren H. Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. FEMS Microbiology Reviews 2006; 30:530–63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00022.x>.
- [24] Zehr JP, Bench SR, Carter BJ, Hewson I, Niazi F, Shi T, et al. Globally distributed uncultivated oceanic N<sub>2</sub>-fixing *Cyanobacteria* lack oxygenic photosystem II. Science 2008; 322:1110–2. <https://doi.org/10.1126/science.1165340>.
- [25] Schirrmeister BE, Gugger M, Donoghue PCJ. *Cyanobacteria* and the Great Oxidation Event: Evidence from genes and fossils. Palaeontology 2015; 58:769–85. <https://doi.org/10.1111/pala.12178>.
- [26] Schirrmeister BE, Antonelli A, Bagheri HC. The origin of multicellularity in *Cyanobacteria*. BMC Evolutionary Biology 2011;11. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-45>.
- [27] Lyons TW, Reinhard CT, Planavsky NJ. The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. Nature 2014; 506:307–15. <https://doi.org/10.1038/nature13068>.
- [28] Sánchez-Baracaldo P, Bianchini G, Wilson JD, Knoll AH. *Cyanobacteria* and biogeochemical cycles through Earth history. Trends in Microbiology 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.05.008>.
- [29] Knoll AH, Nowak MA. The timetable of evolution. Science Advances 2017;3. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1603076>.

- [30] Garcia-Pichel F. *Cyanobacteria*. Encyclopedia of Microbiology, Elsevier; 2009, p. 107–24. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00250-9>.
- [31] Biller SJ, Berube PM, Lindell D, Chisholm SW. *Prochlorococcus*: the structure and function of collective diversity. Nature Reviews Microbiology 2015; 13:13–27. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3378>.
- [32] Flombaum P, Gallegos JL, Gordillo RA, Rincón J, Zabala LL, Jiao N, et al. Present and future global distributions of the marine *Cyanobacteria Prochlorococcus* and *Synechococcus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2013; 110:9824–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307701110>.
- [33] Stal LJ. Nitrogen Fixation in *Cyanobacteria*. eLS, Wiley; 2015, p. 1–9. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021159.pub2>.
- [34] Oren A, Tindall BJ. Nomenclature of the *Cyanophyta/Cyanobacteria/cyanoprokaryotes* under the International Code of Nomenclature of Prokaryotes. Algological Studies/Archiv Für Hydrobiologie, Supplement Volumes 2005;117:39–52. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2005/0117-0039>.
- [35] Oren A, Ventura S. The current status of Cyanobacterial nomenclature under the “prokaryotic” and the “botanical” code. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology 2017;110:1257–69. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0848-0>.
- [36] Kauff F, Büdel B. Phylogeny of *Cyanobacteria*: An Overview, 2010, p. 209–24. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-13145-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13145-5_8).
- [37] Dextro RB, Delbaje E, Cotta SR, Zehr JP, Fiore MF. Trends in Free-access Genomic Data Accelerate Advances in *Cyanobacteria* Taxonomy. Journal of Phycology 2021; 57:1392–402. <https://doi.org/10.1111/jpy.13200>.
- [38] HAUER T, KOMÁREK J. CyanoDB 2.0 - On-line database of Cyanobacterial genera. - World-wide electronic publication, Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR. <http://WwwCyanodbCz> 2021.
- [39] Komárek J, Kaštovský J, Mareš J, Johansen JR. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (Cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. vol. 86. 2014.
- [40] Nakao M, Okamoto S, Kohara M, Fujishiro T, Fujisawa T, Sato S, et al. CyanoBase: The *Cyanobacteria* genome database update 2010. Nucleic Acids Research 2009; 38:2009–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp915>.
- [41] Komárek J. Quo vadis, taxonomy of *Cyanobacteria* (2019). Fottea 2020; 20:104–10. <https://doi.org/10.5507/fot.2019.020>.
- [42] Zhao Z, Cristian A, Rosen G. Keeping up with the genomes: efficient learning of our increasing knowledge of the tree of life. BMC Bioinformatics 2020; 21:412. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03744-7>.
- [43] Cornet L, Bertrand AR, Hanikenne M, Javaux EJ, Wilmotte A, Baurain D. Metagenomic assembly of new (Sub)polar *Cyanobacteria* and their associated microbiome from non-axenic cultures. Microbial Genomics 2018;4. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000212>.

- [44] Blunt JW, Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Natural Product Reports* 2018; 35:8–53. <https://doi.org/10.1039/C7NP00052A>.
- [45] Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Natural Product Reports* 2020; 37:175–223. <https://doi.org/10.1039/C9NP00069K>.
- [46] Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Natural Product Reports* 2021; 38:362–413. <https://doi.org/10.1039/D0NP00089B>.
- [47] Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Natural Product Reports* 2019; 36:122–73. <https://doi.org/10.1039/C8NP00092A>.
- [48] Abed RMM, Dobretsov S, Sudesh K. Applications of *Cyanobacteria* in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* 2009; 106:1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x>.
- [49] Kumar J, Singh D, Tyagi MB, Kumar A. *Cyanobacteria: Applications in Biotechnology*. *Cyanobacteria*, Elsevier; 2019, p. 327–46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00016-7>.
- [50] Seymour JR, Amin SA, Raina JB, Stocker R. Zooming in on the phycosphere: The ecological interface for phytoplankton-bacteria relationships. *Nature Microbiology* 2017;2. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.65>.
- [51] Malfatti F, Azam F. Atomic force microscopy reveals microscale networks and possible symbioses among pelagic Marine Bacteria. *Aquatic Microbial Ecology* 2010; 58:1–14. <https://doi.org/10.3354/ame01355>.
- [52] Abdulaziz A, Sageer S, Chekidhenkuzhiyil J, Vijayan V, Pavanan P, Athiyathil S, et al. Unicellular *Cyanobacteria Synechocystis* accommodate heterotrophic bacteria with varied enzymatic and metal resistance properties. *Journal of Basic Microbiology* 2016; 56:845–56. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500693>.
- [53] Salomon PS, Janson S, Granéli E. Molecular identification of bacteria associated with filaments of *Nodularia spumigena* and their effect on the Cyanobacterial growth. *Harmful Algae* 2003; 2:261–72. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(03\)00045-3](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(03)00045-3).
- [54] SHI L, CAI Y, YANG H, XING P, LI P, KONG L, et al. Phylogenetic diversity and specificity of bacteria associated with *Microcystis aeruginosa* and other *Cyanobacteria*. *Journal of Environmental Sciences* 2009; 21:1581–90. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62459-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62459-6).
- [55] Aharonovich D, Sher D. Transcriptional response of *Prochlorococcus* to co-culture with a marine *Alteromonas*: Differences between strains and the involvement of putative infochemicals. *ISME Journal* 2016; 10:2892–906. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.70>.
- [56] Biller SJ, Coe A, Roggensack SE, Chisholm SW. Heterotroph Interactions Alter *Prochlorococcus* Transcriptome Dynamics during Extended Periods of Darkness. *MSystems* 2018;3:1–18. <https://doi.org/10.1128/msystems.00040-18>.
- [57] Coe A, Ghizzoni J, LeGault K, Biller S, Roggensack SE, Chisholm SW. Survival of *Prochlorococcus* in extended darkness. *Limnology and Oceanography* 2016; 61:1375–88. <https://doi.org/10.1002/lno.10302>.

- [58] Sher D, Thompson JW, Kashtan N, Croal L, Chisholm SW. Response of *Prochlorococcus* ecotypes to co-culture with diverse marine bacteria. *The ISME Journal* 2011; 5:1125–32. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.1>.
- [59] Guedes IA, Rachid CTCC, Rangel LM, Silva LHS. Close Link Between Harmful Cyanobacterial Dominance and Associated Bacterioplankton in a Tropical Eutrophic Reservoir 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00424>.
- [60] Ramanan R, Kim BH, Cho DH, Oh HM, Kim HS. Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances* 2016; 34:14–29. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.003>.
- [61] Ramanan R, Kang Z, Kim BH, Cho DH, Jin L, Oh HM, et al. Phycosphere bacterial diversity in green algae reveals an apparent similarity across habitats. *Algal Research* 2015; 8:140–4. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.003>.
- [62] Hester ER, Barott KL, Nulton J, Vermeij MJA, Rohwer FL. Stable and sporadic symbiotic communities of coral and algal holobionts. *ISME Journal* 2016; 10:1157–69. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.190>.
- [63] Paerl HW, Bebout BM, Prufert LE. Bacterial associations with marine *Oscillatoria* sp. (*trichodesmium* sp.) populations: ecophysiological implications. *Journal of Phycology* 1989; 25:773–84. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1989.00773.x>.
- [64] Kashtan N, Roggensack SE, Berta-Thompson JW, Grinberg M, Stepanauskas R, Chisholm SW. Fundamental differences in diversity and genomic population structure between Atlantic and Pacific *Prochlorococcus*. *The ISME Journal* 2017; 11:1997–2011. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.64>.
- [65] Chisholm SW, Frankel SL, Goericke R, Olson RJ, Palenik B, Waterbury JB, et al. *Prochlorococcus marinus* nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll a and b. *Archives of Microbiology* 1992; 157:297–300. <https://doi.org/10.1007/BF00245165>.
- [66] Biller SJ, Coe A, Chisholm SW. Torn apart and reunited: Impact of a heterotroph on the transcriptome of *Prochlorococcus*. *ISME Journal* 2016; 10:2831–43. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.82>.
- [67] Morris JJ, Kirkegaard R, Szul MJ, Johnson ZI, Zinser ER. Facilitation of robust growth of *Prochlorococcus* colonies and dilute liquid cultures by “helper” heterotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2008; 74:4530–4. <https://doi.org/10.1128/AEM.02479-07>.
- [68] Morris JJ, Johnson ZI, Szul MJ, Keller M, Zinser ER. Dependence of the cyanobacterium *Prochlorococcus* on hydrogen peroxide scavenging microbes for growth at the ocean’s surface. *PLoS ONE* 2011;6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016805>.
- [69] Guillard RRL. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals*, Boston, MA: Springer US; 1975, p. 29–60. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3).
- [70] Guillard RRL, Ryther JH. Studies of marine planktonic diatoms: *Cyclotella nana* hustedt, and *Detonula confervacea* (cleve) gran. *Canadian Journal of Microbiology* 1962; 8:229–39. <https://doi.org/10.1139/m62-029>.

- [71] Hawkins PR, Runnegar MT, Jackson AR, Falconer IR. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* 1985; 50:1292–5. <https://doi.org/10.1128/aem.50.5.1292-1295.1985>.
- [72] Soares RM, Magalhães VF, Azevedo SMFO. Accumulation and depuration of microcystins (Cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology* 2004; 70:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.06.013>.
- [73] Gorham PR, McLachlan J, Hammer UT, Kim WK. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *SIL Proceedings, 1922-2010* 1964;15:796–804. <https://doi.org/10.1080/03680770.1962.11895606>.
- [74] Souza W, editor. *Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas*. 3ª edição. Rio de Janeiro - RJ: Sociedade Brasileira de Microscopia; 2007.
- [75] Peixoto J. *Prospecção de microorganismos com potencial para biodegradação de polietileno*. 2013.
- [76] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73:5261–7. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>.
- [77] Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Research* 1998; 8:175–85. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>.
- [78] Togawa, R. C.; Brigido, M. M.; Santos CMRJMT. The use of the PHPH tool to assembly the gene sequences that are candidate to the biotic and abiotic stress in *Musa acuminata*. XXXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Aguas de Lindoia - SP - Brasil: 2006.
- [79] Togawa, R. C. & Brigido MM. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology -IcoBiCoBi, Ribeirão Preto - SP - Brasil: 2003.
- [80] Edgar RC. UCHIME2: improved chimera prediction for amplicon sequencing 2016. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/074252>.
- [81] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39:783–91. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
- [82] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 1980; 16:111–20. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
- [83] Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree: Computing Large Minimum Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. *Molecular Biology and Evolution* 2009; 26:1641–50. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp077>.
- [84] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 2016; 33:1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

- [85] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; 108:4516–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>.
- [86] Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* 2014; 30:614–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>.
- [87] Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 2019; 37:852–7. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- [88] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBNetJournal* 2011; 17:10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
- [89] Amir A, McDonald D, Navas-Molina JA, Kopylova E, Morton JT, Zech Xu Z, et al. Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. *MSystems* 2017;2. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00191-16>.
- [90] Nearing JT, Douglas GM, Comeau AM, Langille MGI. Denoising the Denoisers: an independent evaluation of microbiome sequence error-correction approaches. *PeerJ* 2018;6:e5364. <https://doi.org/10.7717/peerj.5364>.
- [91] Pérez-Cobas AE, Gomez-Valero L, Buchrieser C. Metagenomic approaches in microbial ecology: an update on whole-genome and marker gene sequencing analyses. *Microbial Genomics* 2020;6. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000409>.
- [92] Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, et al. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* 2007; 35:7188–96. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>.
- [93] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 2012; 41:D590–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- [94] Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, et al. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research* 2014; 42:D643–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>.
- [95] Glöckner FO, Yilmaz P, Quast C, Gerken J, Beccati A, Ciuprina A, et al. 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology* 2017; 261:169–76. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1198>.
- [96] R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2020.
- [97] RStudio Core Team. RStudio: Integrated Development for R. 2020.
- [98] McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 2013;8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.

- [99] Kim M, Shin B, Lee J, Park HY, Park W. Culture-independent and culture-dependent analyses of the bacterial community in the phycosphere of cyanobloom-forming *Microcystis aeruginosa*. *Scientific Reports* 2019; 9:20416. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56882-1>.
- [100] Shaw C, Brooke C, Hawley E, Connolly MP, Garcia JA, Harmon-Smith M, et al. Phototrophic Co-cultures From Extreme Environments: Community Structure and Potential Value for Fundamental and Applied Research. *Frontiers in Microbiology* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.572131>.
- [101] Pascault N, Rué O, Loux V, Pédrón J, Martin V, Tambosco J, et al. Insights into the cyanosphere: capturing the respective metabolisms of *Cyanobacteria* and chemotrophic bacteria in natural conditions? *Environmental Microbiology Reports* 2021; 13:364–74. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12944>.
- [102] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2014; 64:346–51. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059774-0>.
- [103] Zhu L, Zancarini A, Louati I, de Cesare S, Duval C, Tambosco K, et al. Bacterial communities associated with four Cyanobacterial genera display structural and functional differences: Evidence from an experimental approach. *Frontiers in Microbiology* 2016;7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01662>.
- [104] Li Q, Lin F, Yang C, Wang J, Lin Y, Shen M, et al. A Large-Scale Comparative Metagenomic Study Reveals the Functional Interactions in Six Bloom-Forming *Microcystis*-Epibiont Communities. *Frontiers in Microbiology* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00746>.
- [105] Echenique-Subiabre I, Zancarini A, Heath MW, Wood SA, Quiblier C, Humbert JF. Multiple processes acting from local to large geographical scales shape bacterial communities associated with *Phormidium* (*Cyanobacteria*) biofilms in French and New Zealand rivers. *Scientific Reports* 2018; 8:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32772-w>.
- [106] Woodhouse JN, Ziegler J, Grossart HP, Neilan BA. Cyanobacterial community composition and bacteria-bacteria interactions promote the stable occurrence of particle-associated bacteria. *Frontiers in Microbiology* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00777>.
- [107] Tanabe Y, Okazaki Y, Yoshida M, Matsuura H, Kai A, Shiratori T, et al. A novel alphaproteobacterial ectosymbiont promotes the growth of the hydrocarbon-rich green alga *Botryococcus braunii*. *Scientific Reports* 2015;5:1–11. <https://doi.org/10.1038/srep10467>.
- [108] Ndlela LL, Oberholster PJ, van Wyk JH, Cheng PH. Bacteria as biological control agents of freshwater *Cyanobacteria*: is it feasible beyond the laboratory? *Applied Microbiology and Biotechnology* 2018; 102:9911–23. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9391-9>.
- [109] Niu Y, Shen H, Chen J, Xie P, Yang X, Tao M, et al. Phytoplankton community succession shaping bacterioplankton community composition in Lake Taihu, China. *Water Research* 2011; 45:4169–82. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.022>.
- [110] Thompson LR, Sanders JG, McDonald D, Amir A, Ladau J, Locey KJ, et al. A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature* 2017; 551:457–63. <https://doi.org/10.1038/nature24621>.

- [111] Rambo IM, Dombrowski N, Constant L, Erdner D, Baker BJ. Metabolic relationships of uncultured bacteria associated with the microalgae *Gambierdiscus*. *Environmental Microbiology* 2020; 22:1764–83. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14878>.
- [112] Spring S, Scheuner C, Göker M, Klenk HP. A taxonomic framework for emerging groups of ecologically important marine *Gammaproteobacteria* based on the reconstruction of evolutionary relationships using genome-scale data. *Frontiers in Microbiology* 2015; 6:1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00281>.
- [113] Spring S, Bunk B, Spröer C, Rohde M, Klenk H. Genome biology of a novel lineage of *Planctomycetes* widespread in anoxic aquatic environments. *Environmental Microbiology* 2018; 20:2438–55. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14253>.
- [114] Tang K, Yang Y, Lin D, Li S, Zhou W, Han Y, et al. Genomic, physiologic, and proteomic insights into metabolic versatility in *Roseobacter* clade bacteria isolated from deep-sea water. *Scientific Reports* 2016; 6:35528. <https://doi.org/10.1038/srep35528>.
- [115] Burkhardt I, Lauterbach L, Brock NL, Dickschat JS. Chemical differentiation of three DMSP lyases from the marine *Roseobacter* group. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2017; 15:4432–9. <https://doi.org/10.1039/C7OB00913E>.
- [116] Yao S, Lyu S, An Y, Lu J, Gjermansen C, Schramm A. Microalgae-bacteria symbiosis in microalgal growth and biofuel production: a review. *Journal of Applied Microbiology* 2019; 126:359–68. <https://doi.org/10.1111/jam.14095>.
- [117] Zeng YX, Qiao ZY, Yu Y, Li HR, Luo W. Diversity of bacterial dimethylsulfoniopropionate degradation genes in surface seawater of Arctic Kongsfjorden. *Scientific Reports* 2016; 6:1–9. <https://doi.org/10.1038/srep33031>.
- [118] Carvalho FM, Souza RC, Barcellos FG, Hungria M, Vasconcelos ATR. Genomic and evolutionary comparisons of diazotrophic and pathogenic bacteria of the order *Rhizobiales*. *BMC Microbiology* 2010; 10:37. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-37>.
- [119] Wang S, Meade A, Lam H-M, Luo H. Evolutionary Timeline and Genomic Plasticity Underlying the Lifestyle Diversity in *Rhizobiales*. *MSystems* 2020;5. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00438-20>.
- [120] Sweet MJ, Bythell JC, Nugues MM. Algae as Reservoirs for Coral Pathogens. *PLoS ONE* 2013;8:e69717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069717>.
- [121] Cai H, Shi Y, Wang Y, Cui H, Jiang H. *Aquidulcibacter paucihalophilus* gen. nov., sp. nov., a novel member of family *Caulobacteraceae* isolated from Cyanobacterial aggregates in a eutrophic lake. *Antonie van Leeuwenhoek* 2017; 110:1169–77. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0889-4>.
- [122] Driscoll CB, Otten TG, Brown NM, Dreher TW. Towards long-read metagenomics: complete assembly of three novel genomes from bacteria dependent on a diazotrophic cyanobacterium in a freshwater lake co-culture. *Standards in Genomic Sciences* 2017; 12:9. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0224-8>.
- [123] den Uyl PA, Richardson LL, Jain S, Dick GJ. Unraveling the Physiological Roles of the Cyanobacterium *Geitlerinema* sp. BBD and Other Black Band Disease Community Members through Genomic Analysis of a Mixed Culture. *PLOS ONE* 2016; 11:e0157953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157953>.

- [124] Grettenberger CL, Pearce AR, Bibby KJ, Jones DS, Burgos WD, Macalady JL. Efficient low-pH iron removal by a microbial iron oxide mound ecosystem at Scalp Level Run. *Applied and Environmental Microbiology* 2017;83. <https://doi.org/10.1128/AEM.00015-17>.
- [125] Howard EC, Sun S, Biers EJ, Moran MA. Abundant and diverse bacteria involved in DMSP degradation in marine surface waters. *Environmental Microbiology* 2008; 10:2397–410. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01665.x>.
- [126] Park CH, Kim KM, Kim OS, Jeong G, Hong SG. Bacterial communities in Antarctic lichens. *Antarctic Science* 2016; 28:455–61. <https://doi.org/10.1017/S0954102016000286>.
- [127] Dubé CE, Ziegler M, Mercière A, Boissin E, Planes S, Bourmaud CA-F, et al. Naturally occurring fire coral clones demonstrate a genetic and environmental basis of microbiome composition. *Nature Communications* 2021; 12:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26543-x>.
- [128] Jasmin C, Anas A, Singh D, Purohit HJ, Gireeshkumar TR, Nair S. Aberrations in the microbiome of *Cyanobacteria* from a tropical estuary polluted by heavy metals. *Marine Pollution Bulletin* 2020; 160:111575. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111575>.
- [129] Wang Z, Pane VE, Criddle CS. Metabolic model of nitrite reduction to nitrous oxide coupled to alternating consumption and storage of glycogen and polyhydroxyalkanoate. *Bioresource Technology Reports* 2020; 9:100370. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100370>.
- [130] Zadjelovic V, Chhun A, Quareshy M, Silvano E, Hernandez-Fernaud JR, Aguilo-Ferretjans MM, et al. Beyond oil degradation: enzymatic potential of *Alcanivorax* to degrade natural and synthetic polyesters. *Environmental Microbiology* 2020; 22:1356–69. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14947>.
- [131] Lea-Smith DJ, Biller SJ, Davey MP, Cotton CAR, Perez Sepulveda BM, Turchyn A v., et al. Contribution of Cyanobacterial alkane production to the ocean hydrocarbon cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015; 112:13591–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507274112>.
- [132] Coates RC, Podell S, Korobeynikov A, Lapidus A, Pevzner P, Sherman DH, et al. Characterization of Cyanobacterial Hydrocarbon Composition and Distribution of Biosynthetic Pathways. *PLoS ONE* 2014; 9:e85140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085140>.
- [133] Neufeld JD, Schäfer H, Cox MJ, Boden R, McDonald IR, Murrell JC. Stable-isotope probing implicates *Methylophaga* spp and novel *Gammaproteobacteria* in marine methanol and methylamine metabolism. *The ISME Journal* 2007; 1:480–91. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.65>.
- [134] Boden R, Kelly DP, Murrell JC, Schäfer H. Oxidation of dimethylsulfide to tetrathionate by *Methylophaga thiooxidans* sp. nov.: a new link in the sulfur cycle. *Environmental Microbiology* 2010:no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02238.x>.
- [135] Du ZJ, Wang ZJ, Zhao JX, Chen GJ. *Woeseia oceani* gen. Nov., sp. nov., a chemoheterotrophic member of the order Chromatiales, and proposal of Woeseiaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2016; 66:107–12. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000683>.

- [136] Hoffmann K, Bienhold C, Buttigieg PL, Knittel K, Laso-Pérez R, Rapp JZ, et al. Diversity and metabolism of *Woeseiales* bacteria, global members of marine sediment communities. *The ISME Journal* 2020; 14:1042–56. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0588-4>.
- [137] Buongiorno J, Sipes K, Wasmund K, Loy A, Lloyd KG. *Woeseiales* transcriptional response to shallow burial in Arctic fjord surface sediment. *PLOS ONE* 2020; 15:e0234839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234839>.
- [138] Hwang CY, Cho BC. *Spongiibacter tropicus* sp. nov., isolated from a *Synechococcus* culture. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; 59:2176–9. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.005819-0>.
- [139] Gallucci KK, Paerl HW. *Pseudomonas aeruginosa* Chemotaxis Associated with Blooms of N<sub>2</sub>-Fixing Blue-Green Algae (*Cyanobacteria*). *Applied and Environmental Microbiology* 1983; 45:557–62. <https://doi.org/10.1128/aem.45.2.557-562.1983>.
- [140] LewisOscar F, Nithya C, Alharbi SA, Alharbi NS, Thajuddin N. Microfouling inhibition of human nosocomial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* using marine *Cyanobacteria*. *Microbial Pathogenesis* 2018; 114:107–15. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.048>.
- [141] Han J, Zhang L, Wang S, Yang G, Zhao L, Pan K. Co-culturing bacteria and microalgae in organic carbon containing medium. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 2016; 23:8. <https://doi.org/10.1186/s40709-016-0047-6>.
- [142] le Chevanton M, Garnier M, Bougaran G, Schreiber N, Lukomska E, Bérard J-B, et al. Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Research* 2013; 2:212–22. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.05.003>.
- [143] Brauer VS, Stomp M, Bouvier T, Fouilland E, Leboulanger C, Confurius-Guns V, et al. Competition and facilitation between the marine nitrogen-fixing cyanobacterium *Cyanothece* and its associated bacterial community. *Frontiers in Microbiology* 2015;5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00795>.
- [144] le Chevanton M, Garnier M, Lukomska E, Schreiber N, Cadoret JP, Saint-Jean B, et al. Effects of nitrogen limitation on *Dunaliella* sp.-*Alteromonas* sp. interactions: From mutualistic to competitive relationships. *Frontiers in Marine Science* 2016; 3:1–11. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00123>.
- [145] Seyedsayamdost MR, Case RJ, Kolter R, Clardy J. The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nature Chemistry* 2011; 3:331–5. <https://doi.org/10.1038/nchem.1002>.
- [146] Buchan A, LeCleir GR, Gulvik CA, González JM. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nature Reviews Microbiology* 2014; 12:686–98. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3326>.
- [147] Hwang CY, Kim MH, Bae GD, Zhang GI, Kim YH, Cho BC. *Muricauda olearia* sp. nov., isolated from crude-oil-contaminated seawater, and emended description of the genus *Muricauda*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; 59:1856–61. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.007708-0>.

- [148] Bruns A, Rohde M, Berthe-Corti L. *Muricauda ruestringensis* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, appendaged bacterium from German North Sea intertidal sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2001; 51:1997–2006. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-1997>.
- [149] Arun AB, Chen WM, Lai WA, Chao JH, Rekha PD, Shen FT, et al. *Muricauda lutaonensis* sp. nov., a moderate thermophile isolated from a coastal hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; 59:2738–42. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.007930-0>.
- [150] Liu L, Yu M, Zhou S, Fu T, Sun W, Wang L, et al. *Muricauda alvinocaridis* sp. nov., isolated from shrimp gill from the Okinawa Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2020. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003953>.
- [151] Yang C, Li Y, Guo Q, Lai Q, Wei J, Zheng T, et al. *Muricauda zhangzhouensis* sp. nov., isolated from mangrove sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2013; 63:2320–5. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.040881-0>.
- [152] Zhang X, Liu X, Lai Q, Du Y, Sun F, Shao Z. *Muricauda indica* sp. nov., isolated from deep sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2018; 68:881–5. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.002602>.
- [153] Lee SY, Park S, Oh TK, Yoon JH. *Muricauda beolgyonensis* sp. nov., isolated from a tidal flat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2012; 62:1134–9. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.032581-0>.
- [154] Wu YH, Yu PS, Zhou YD, Xu L, Wang CS, Wu M, et al. *Muricauda antarctica* sp. nov., a marine member of the *Flavobacteriaceae* isolated from Antarctic seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2013; 63:3451–6. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.048355-0>.
- [155] Mohr KI, Garcia RO, Gerth K, Irschik H, Müller R. *Sandaracinus amylolyticus* gen. nov., sp. nov., a starch-degrading soil myxobacterium, and description of *Sandaracinaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2012; 62:1191–8. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033696-0>.
- [156] Suzuki E, Onoda M, Colleoni C, Ball S, Fujita N, Nakamura Y. Physicochemical Variation of Cyanobacterial Starch, the Insoluble  $\alpha$ -Glucans in *Cyanobacteria*. *Plant and Cell Physiology* 2013; 54:465–73. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs190>.
- [157] Deschamps P, Colleoni C, Nakamura Y, Suzuki E, Putaux J-L, Buleon A, et al. Metabolic Symbiosis and the Birth of the *Plant* Kingdom. *Molecular Biology and Evolution* 2008; 25:536–48. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm280>.
- [158] Scheuner C, Tindall BJ, Lu M, Nolan M, Lapidus A, Cheng J-F, et al. Complete genome sequence of *Planctomyces brasiliensis* type strain (DSM 5305T), phylogenomic analysis and reclassification of *Planctomycetes* including the descriptions of *Gimesia* gen. nov., *Planctopirus* gen. nov. and *Rubinisphaera* gen. nov. and emended descriptions of the order *Planctomycetales* and the family *Planctomycetaceae*. *Standards in Genomic Sciences* 2014; 9:10. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-9-10>.
- [159] Schlesner H. *Planctomyces brasiliensis* sp. nov., a Halotolerant Bacterium from a Salt Pit. *Systematic and Applied Microbiology* 1989; 12:159–61. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(89\)80008-6](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(89)80008-6).

- [160] Gama SR, Vogt M, Kalina T, Hupp K, Hammerschmidt F, Pallitsch K, et al. An Oxidative Pathway for Microbial Utilization of Methylphosphonic Acid as a Phosphate Source. *ACS Chemical Biology* 2019; 14:735–41. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00024>.
- [161] Sosa OA, Casey JR, Karl DM. Methylphosphonate Oxidation in *Prochlorococcus* Strain MIT9301 Supports Phosphate Acquisition, Formate Excretion, and Carbon Assimilation into Purines. *Applied and Environmental Microbiology* 2019;85. <https://doi.org/10.1128/AEM.00289-19>.
- [162] Sayem SA, Manzo E, Ciavatta L, Tramice A, Cordone A, Zanfardino A, et al. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories* 2011; 10:74. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-74>.
- [163] Watanabe M, Kojima H, Fukui M. Proposal of *Effusibacillus lacus* gen. nov., sp. nov., and reclassification of *Alicyclobacillus pohliae* as *Effusibacillus pohliae* comb. nov. and *Alicyclobacillus consociatus* as *Effusibacillus consociatus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2014; 64:2770–4. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.055814-0>.
- [164] Hofer U. Climate change boosts *Cyanobacteria*. *Nature Reviews Microbiology* 2018; 16:122. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.15>.
- [165] Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2018; 68:461–6. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>.
- [166] Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio. Unidades de conservação federais, rppn, centros de pesquisa e coordenações regionais 2019.
- [167] Vizzotto CS, Lopes FAC, Green SJ, Steindorff AS, Walter JM, Thompson FL, et al. Draft Genome Sequence of *Muricauda* sp. Strain K001 Isolated from a Marine Cyanobacterial Culture. *Genome Announcements* 2018;6. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00451-18>.
- [168] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014; 30:2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- [169] Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment. *Genome Research* 1998; 8:175–85. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>.
- [170] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology* 2012; 19:455–77. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- [171] Fraser BA, Whiting JR, Paris JR, Weadick CJ, Parsons PJ, Charlesworth D, et al. Improved Reference Genome Uncovers Novel Sex-Linked Regions in the Guppy (*Poecilia reticulata*). *Genome Biology and Evolution* 2020; 12:1789–805. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa187>.
- [172] Loman NJ, Quick J, Simpson JT. A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. *Nature Methods* 2015; 12:733–5. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3444>.

- [173] Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AM. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive *k*-mer weighting and repeat separation. *Genome Research* 2017; 27:722–36. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>.
- [174] Ultsch A, Mörchen F. ESOM-Maps: tools for clustering, visualization, and classification with Emergent SOM. vol. 46. Citeseer; 2005.
- [175] Kang DD, Li F, Kirton E, Thomas A, Egan R, An H, et al. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ* 2019;7:e7359. <https://doi.org/10.7717/peerj.7359>.
- [176] Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research* 2015; 25:1043–55. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>.
- [177] Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 2013; 29:1072–5. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
- [178] Meier-Kolthoff JP, Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications* 2019;10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>.
- [179] Meier-Kolthoff JP, Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications* 2019; 10:2182. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>.
- [180] Meier-Kolthoff JP, Carbasse JS, Peinado-Olarte RL, Göker M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research* 2021. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab902>.
- [181] Arkin AP, Cottingham RW, Henry CS, Harris NL, Stevens RL, Maslov S, et al. KBase: The United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase. *Nature Biotechnology* 2018; 36:566–9. <https://doi.org/10.1038/nbt.4163>.
- [182] Chaumeil P-A, Mussig AJ, Hugenholtz P, Parks DH. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* 2019. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>.
- [183] Parks DH, Chuvochina M, Rinke C, Mussig AJ, Chaumeil P-A, Hugenholtz P. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. *Nucleic Acids Research* 2021. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab776>.
- [184] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014; 30:2068–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
- [185] Hyatt D, Chen G-L, LoCascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 2010; 11:119. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>.

- [186] Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, Stærfeldt H-H, Rognes T, Ussery DW. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research* 2007; 35:3100–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm160>.
- [187] Laslett D. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research* 2004; 32:11–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh152>.
- [188] Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 2009; 10:421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>.
- [189] Finn RD, Clements J, Eddy SR. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research* 2011; 39:W29–37. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr367>.
- [190] Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 2011; 8:785–6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>.
- [191] Kolbe DL, Eddy SR. Fast filtering for RNA homology search. *Bioinformatics* 2011; 27:3102–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr545>.
- [192] Bland C, Ramsey TL, Sabree F, Lowe M, Brown K, Kyrpides NC, et al. CRISPR Recognition Tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. *BMC Bioinformatics* 2007; 8:209. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-209>.
- [193] Huerta-Cepas J, Forslund K, Coelho LP, Szklarczyk D, Jensen LJ, von Mering C, et al. Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by eggNOG-Mapper. *Molecular Biology and Evolution* 2017; 34:2115–22. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx148>.
- [194] Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M, Hirakawa M, Itoh M, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Research* 2007; 36:D480–4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm882>.
- [195] Blin K, Shaw S, Kloosterman AM, Charlop-Powers Z, van Wezel GP, Medema MH, et al. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research* 2021; 49:W29–35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>.
- [196] Shirakawa M, Ueda H, Nagano AJ, Shimada T, Kohchi T, Hara-Nishimura I. FAMA Is an Essential Component for the Differentiation of Two Distinct Cell Types, Myosin Cells and Guard Cells, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 2014; 26:4039–52. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.129874>.
- [197] Yamamoto T, Liu Y, Hasegawa Y, Iwaki H. Complete Genome Sequence of *Mameliella alba* Strain KU6B, a Cyclohexylamine-Utilizing Marine Bacterium. *Microbiology Resource Announcements* 2020; 9:18–9. <https://doi.org/10.1128/mra.00273-20>.
- [198] Zheng Q, Chen C, Yan X-J, Wang Y-N, Zeng Y-H, Hao L-K, et al. *Mameliella alba* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium of the *Roseobacter* clade in the order *Rhodobacterales*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2010; 60:953–7. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.011437-0>.
- [199] Liu Y, Zhang X, Lai Q, Shao Z. Reclassification of *Mameliella phaeodactyli*, *Mameliella atlantica*, *Ponticoccus lacteus* and *Alkalimicrobium pacificum* as later heterotypic synonyms of *Mameliella alba* and

an emended description of *Mameliella alba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2018; 68:1047–51. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002617>.

- [200] Parks DH, Chuvochina M, Chaumeil P-A, Rinke C, Mussig AJ, Hugenholtz P. A complete domain-to-species taxonomy for *Bacteria* and *Archaea*. *Nature Biotechnology* 2020; 38:1079–86. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0501-8>.
- [201] Tatusov RL, Koonin E v., Lipman DJ. A Genomic Perspective on Protein Families. *Science* 1997; 278:631–7. <https://doi.org/10.1126/science.278.5338.631>.
- [202] Galperin MY, Wolf YI, Makarova KS, Vera Alvarez R, Landsman D, Koonin E v. COG database update: focus on microbial diversity, model organisms, and widespread pathogens. *Nucleic Acids Research* 2021; 49:D274–81. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1018>.
- [203] Galperin MY, Kristensen DM, Makarova KS, Wolf YI, Koonin E v. Microbial genome analysis: the COG approach. *Briefings in Bioinformatics* 2019; 20:1063–70. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx117>.
- [204] Pascault N, Rué O, Loux V, Pédrón J, Martin V, Tambosco J, et al. Insights into the cyanosphere: capturing the respective metabolisms of *Cyanobacteria* and chemotrophic bacteria in natural conditions? *Environmental Microbiology Reports* 2021; 13:364–74. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12944>.
- [205] Biller SJ, Schubotz F, Roggensack SE, Thompson AW, Summons RE, Chisholm SW. Bacterial Vesicles in Marine Ecosystems. *Science* 2014; 343:183–6. <https://doi.org/10.1126/science.1243457>.
- [206] Biller SJ, McDaniel LD, Breitbart M, Rogers E, Paul JH, Chisholm SW. Membrane vesicles in sea water: heterogeneous DNA content and implications for viral abundance estimates. *The ISME Journal* 2017; 11:394–404. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.134>.
- [207] Hofer U. Message in a bottle. *Nature Reviews Microbiology* 2014; 12:153–153. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3214>.
- [208] Zhang H, Yohe T, Huang L, Entwistle S, Wu P, Yang Z, et al. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research* 2018; 46:W95–101. <https://doi.org/10.1093/nar/gky418>.
- [209] Woodhouse JN, Ziegler J, Grossart HP, Neilan BA. Cyanobacterial community composition and bacteria-bacteria interactions promote the stable occurrence of particle-associated bacteria. *Frontiers in Microbiology* 2018; 9:1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00777>.
- [210] Remminghorst U, Rehm BHA. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters* 2006; 28:1701–12. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9156-x>.
- [211] Fu H, Chen L, Ge Y, Wu A, Liu H, Li W, et al. Linking human activities and global climatic oscillation to phytoplankton dynamics in a subtropical lake. *Water Research* 2022; 208:117866. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117866>.
- [212] Fan C, Glibert PM, Alexander J, Lomas MW. Characterization of urease activity in three marine phytoplankton species, *Aureococcus anophagefferens*, *Prorocentrum minimum*, and *Thalassiosira weissflogii*. *Marine Biology* 2003; 142:949–58. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1017-8>.

- [213] Bartosiewicz M, Maranger R, Przytulska A, Laurion I. Effects of phytoplankton blooms on fluxes and emissions of greenhouse gases in a eutrophic lake. *Water Research* 2021; 196:116985. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116985>.
- [214] Bouma-Gregson K, Kudela RM, Power ME. Widespread anatoxin-a detection in benthic Cyanobacterial mats throughout a river network. *PLOS ONE* 2018; 13:e0197669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197669>.
- [215] Bouma-Gregson K, Olm MR, Probst AJ, Anantharaman K, Power ME, Banfield JF. Impacts of microbial assemblage and environmental conditions on the distribution of anatoxin-a producing *Cyanobacteria* within a river network. *The ISME Journal* 2019; 13:1618–34. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0374-3>.
- [216] Liang J-L, Liu J, Jia P, Yang T, Zeng Q, Zhang S, et al. Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining. *The ISME Journal* 2020; 14:1600–13. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0632-4>.
- [217] Jackson RJ, Binet MRB, Lee LJ, Ma R, Graham AI, McLeod CW, et al. Expression of the PitA phosphate/metal transporter of *Escherichia coli* is responsive to zinc and inorganic phosphate levels. *FEMS Microbiology Letters* 2008; 289:219–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01386.x>.
- [218] Santos-Beneit F. The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in Microbiology* 2015;6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00402>.
- [219] Ghorbel S, Kormanec J, Artus A, Virolle M-J. Transcriptional Studies and Regulatory Interactions between the *phoR* - *phoP* Operon and the *phoU* , *mtpA* , and *ppk* Genes of *Streptomyces lividans* TK24. *Journal of Bacteriology* 2006; 188:677–86. <https://doi.org/10.1128/JB.188.2.677-686.2006>.
- [220] Iverson V, Morris RM, Frazar CD, Berthiaume CT, Morales RL, Armbrust EV. Untangling genomes from metagenomes: Revealing an uncultured class of marine euryarchaeota. *Science* 2012; 335:587–90. <https://doi.org/10.1126/science.1212665>.
- [221] Ma M, Eaton JW. Multicellular oxidant defense in unicellular organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992; 89:7924–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.7924>.
- [222] Gerringa LJA, Rijkenberg MJA, Timmermans R, Buma AGJ. The influence of solar ultraviolet radiation on the photochemical production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the equatorial Atlantic Ocean. *Journal of Sea Research* 2004; 51:3–10. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2003.03.002>.
- [223] Lesser MP. OXIDATIVE STRESS IN MARINE ENVIRONMENTS: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology* 2006; 68:253–78. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>.
- [224] Suggett DJ, Warner ME, Smith DJ, Davey P, Hennige S, Baker NR. Photosynthesis and production of hydrogen peroxide by *Symbiodinium* (*Pyrrhophyta*) phylotypes with different thermal tolerances. *Journal of Phycology* 2008; 44:948–56. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00537.x>.

- [225] Silva-Lima AW, Walter JM, Garcia GD, Ramires N, Ank G, Meirelles PM, et al. Multiple *Symbiodinium* Strains Are Hosted by the Brazilian Endemic Corals *Mussismilia* spp. *Microbial Ecology* 2015;70:301–10. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0573-z>.
- [226] Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD). Acompanhando a agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável: subsídios iniciais do Sistema das Nações Unidas no Brasil sobre a identificação de indicadores nacionais referentes aos objetivos de desenvolvimento sustentável/Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. Brasília: 2015.
- [227] Jurelevicius D, Alvarez VM, Marques JM, de Sousa Lima LRF, Dias F de A, Seldin L. Bacterial Community Response to Petroleum Hydrocarbon Amendments in Freshwater, Marine, and Hypersaline Water-Containing Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 2013; 79:5927–35. <https://doi.org/10.1128/AEM.02251-13>.
- [228] Nie Y, Chi C-Q, Fang H, Liang J-L, Lu S-L, Lai G-L, et al. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. *Scientific Reports* 2015; 4:4968. <https://doi.org/10.1038/srep04968>.
- [229] Peixoto J. Estudo do metabolismo de polietileno: desvendando as estratégias metabólicas microbianas envolvidas na biodegradação de plásticos. 2018.
- [230] Smith HJ, Schmit A, Foster R, Littman S, Kuypers MMM, Foreman CM. Biofilms on glacial surfaces: Hotspots for biological activity. *Npj Biofilms and Microbiomes* 2016;2. <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.8>.
- [231] Unfried F, Becker S, Robb CS, Hehemann JH, Markert S, Heiden SE, et al. Adaptive mechanisms that provide competitive advantages to marine *Bacteroidetes* during microalgal blooms. *ISME Journal* 2018; 12:2894–906. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0243-5>.
- [232] Krüger K, Chafee M, ben Francis T, Glavina del Rio T, Becher D, Schweder T, et al. In marine *Bacteroidetes* the bulk of glycan degradation during algae blooms is mediated by few clades using a restricted set of genes. *ISME Journal* 2019; 13:2800–16. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0476-y>.
- [233] Gavriilidou A, Gutleben J, Versluis D, Forgiarini F, van Passel MWJ, Ingham CJ, et al. Comparative genomic analysis of *Flavobacteriaceae*: insights into carbohydrate metabolism, gliding motility and secondary metabolite biosynthesis. *BMC Genomics* 2020; 21:569. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06971-7>.
- [234] Wang Y, Yang X, Liu J, Wu Y, Zhang XH. *Muricauda lutea* sp. nov., isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2017; 67:1064–9. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001792>.
- [235] Yoon JH, Lee MH, Oh TK, Park YH. *Muricauda flavescens* sp. nov. and *Muricauda aquimarina* sp. nov., isolated from a Salt Lake near Hwajinpo Beach of the East Sea in Korea, and emended description of the genus *Muricauda*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; 55:1015–9. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.03051-0>.
- [236] Kim JM, Jin HM, Jeon CO. *Muricauda taeanensis* sp. nov., isolated from a marine tidal flat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2013; 63:2672–7. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.047647-0>.

- [237] Park JS. *Muricauda hymeniacidonis* sp. Nov., isolated from sponge of *Hymeniacidon sinapium*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2019; 69:3800–5. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003683>.
- [238] Su Y, Yang X, Wang Y, Liu Y, Ren Q, Zhang XH. *Muricauda marina* sp. Nov., isolated from marine snow of yellow sea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2017; 67:2446–51. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001992>.
- [239] Zhang Z, Gao X, Qiao Y, Wang Y, Zhang XH. *Muricauda pacifica* sp. Nov., Isolated from seawater of the South Pacific Gyre. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2015; 65:4087–92. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000542>.
- [240] Yoon JH, Kang SJ, Jung YT, Oh TK. *Muricauda lutimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2008; 58:1603–7. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.65659-0>.
- [241] Liu SQ, Sun QL, Sun YY, Yu C, Sun L. *Muricauda iocasae* sp. Nov., isolated from deep sea sediment of the south China sea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2018; 68:2538–44. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002870>.
- [242] Li G, Lai Q, Yan P, Shao Z. *Roseovarius amoyensis* sp. nov. and *Muricauda amoyensis* sp. nov., isolated from the Xiamen coast. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2019; 69:3093–101. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003595>.
- [243] Dang Y, Sun Y, Sun L, Yuan X, Li Y, Qin Q, et al. *Muricauda nanhaiensis* sp. nov., isolated from seawater of the South China Sea 2019:10–5. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003437>.
- [244] Reddy, Beveridge, Breznak, Marzluf, Schmidt, Snyder, editors. Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition. 3<sup>rd</sup> edition. American Society of Microbiology; 2007.
- [245] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution 2016; 33:1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- [246] Chun J, Rainey FA. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the *Bacteria* and *Archaea*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2014; 64:316–24. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.054171-0>.
- [247] Yoon S-H, Ha S, Lim J, Kwon S, Chun J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. Antonie van Leeuwenhoek 2017; 110:1281–6. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0844-4>.
- [248] Meier-Kolthoff JP, Göker M, Spröer C, Klenk HP. When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? Archives of Microbiology 2013; 195:413–8. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0888-4>.
- [249] Meier-Kolthoff JP, Klenk H-P, Göker M. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA–DNA hybridization in the genomic age. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2014; 64:352–6. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.056994-0>.

- [250] Meier-Kolthoff JP, Hahnke RL, Petersen J, Scheuner C, Michael V, Fiebig A, et al. Complete genome sequence of DSM 30083T, the type strain (U5/41T) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. *Standards in Genomic Sciences* 2014; 9:2. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-9-2>.
- [251] Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 2013; 14:60. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>.
- [252] Ha S-M, Kim CK, Roh J, Byun J-H, Yang S-J, Choi S-B, et al. Application of the Whole Genome-Based Bacterial Identification System, TrueBac ID, Using Clinical Isolates That Were Not Identified With Three Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Systems. *Annals of Laboratory Medicine* 2019; 39:530. <https://doi.org/10.3343/alm.2019.39.6.530>.
- [253] Seppey M, Manni M, Zdobnov EM. BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness, 2019, p. 227–45. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_14).
- [254] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009; 25:1754–60. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.
- [255] Wu M, Scott AJ. Phylogenomic analysis of bacterial and archaeal sequences with AMPHORA2. *Bioinformatics* 2012; 28:1033–4. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts079>.
- [256] Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30:772–80. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
- [257] Raney F, Oren A. *Methods in Microbiology* Recent titles in the series. vol. 38. n.d.
- [258] Bernardet J-F, Segers P, Vancanneyt M, Berthe F, Kersters K, Vandamme P. Cutting a Gordian Knot: Emended Classification and Description of the Genus *Flavobacterium*, Emended Description of the Family *Flavobacteriaceae*, and Proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *International Journal of Systematic Bacteriology* 1996; 46:128–48. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-1-128>.
- [259] Nassar N, Vizzotto CS, Schwartz CA, Pires OR. Cassava diversity in Brazil: The case of carotenoid-rich landraces. *Genetics and Molecular Research* 2007; 6:116–21.
- [260] Bligh EG, Dyer WJ. A Rapid Method Of Total Lipid Extraction And Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 1959; 37:911–7. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
- [261] Tindall B. Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiology Letters* 1990; 66:199–202. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90282-U](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90282-U).
- [262] Tindall BJ. A Comparative Study of the Lipid Composition of *Halobacterium saccharovororum* from Various Sources. *Systematic and Applied Microbiology* 1990; 13:128–30. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80158-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80158-X).

- [263] Sasser M. Technical Note # 101 Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids. *Stat* 2001:1–6.
- [264] Sasser M. Fatty acid profiling by gas chromatography 1990.
- [265] Ramasamy D, Mishra AK, Lagier JC, Padhmanabhan R, Rossi M, Sentausa E, et al. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2014; 64:384–91. <https://doi.org/10.1099/ijcs.0.057091-0>.
- [266] Vandamme P, Peeters C. Time to revisit polyphasic taxonomy. *Antonie van Leeuwenhoek* 2014; 106:57–65. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0148-x>.
- [267] Schumann P, Maier T. MALDI-TOF mass spectrometry applied to classification and identification of bacteria. vol. 41. 1st ed. Elsevier Ltd.; 2014. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.06.002>.
- [268] Agustini BC, Silva LP, Bloch C, Bonfim TMB, da Silva GA. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2014; 98:5645–54. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5686-7>.
- [269] International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology – About | Microbiology Society n.d. <https://www.microbiologyresearch.org/journal/ijsem/scope> (accessed November 20, 2021).
- [270] PRABHU S, REKHA PD, ARUN AB. Zeaxanthin Biosynthesis by Members of the Genus *Muricauda*. *Polish Journal of Microbiology* 2014; 63:115–9. <https://doi.org/10.33073/pjm-2014-017>.
- [271] Prabhu S, PD R, Young C-C, Hameed A, Lin S-Y, AB A. Zeaxanthin Production by Novel Marine Isolates from Coastal sand of India and its Antioxidant Properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2013; 171:817–31. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0397-6>.
- [272] International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2019; 69:S1–111. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000778>.
- [273] de Vos P, Truper H. Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology; IXth International (IUMS) Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2000; 50:2239–44. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-6-2239>.
- [274] da Silva M, Marinoni L, Bustamante M, Bensusan N, Winter LMF. Como problemas na Lei da Biodiversidade (Lei 13.123/2015) estão impedindo o registro de novas bactérias encontradas no Brasil. *Jornal Da Ciência - SBPC* 2021.

\* As imagens e fotos apresentadas nesse trabalho são autorais ou retiradas de documentos e *websites* com licença para uso livre de direitos autorais (*Creative Commons license*), conforme autoria e referência indicada em cada figura.

## 6 - Anexos

### 6.1 Produção acadêmica durante o doutorado

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. **VIZZOTTO, Carla Simone**; PEIXOTO, JULIANNA; GREEN, STEFAN JOSHUA; LOPES, FABYANO ALVARES C.; RAMADA, MARCELO HENRIQUE S.; PIRES JÚNIOR, O. R.; PINTO, OTÁVIO HENRIQUE B.; TÓTOLA, MARCOS ROGÉRIO; THOMPSON, FABIANO LOPES; KRÜGER, RICARDO HENRIQUE. *Muricauda brasiliensis* sp. nov., isolated from a mat-forming cyanobacterial culture. BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, 2020.
2. **VIZZOTTO, CARLA S.**; LOPES, FABYANO A. C.; GREEN, STEFAN J.; STEINDORFF, ANDREI S.; WALTER, JULINE M.; THOMPSON, FABIANO L.; KRÜGER, RICARDO H. Draft Genome Sequence of *Muricauda* sp. Strain K001 Isolated from a Marine Cyanobacterial Culture. GENOME ANNOUNCEMENTS., v.6, p.e00451-18, 2018.
3. FREDERICO, TAYNÁ DINIZ; PEIXOTO, JULIANNA; DE SOUSA, JÉSSICA FERNANDES; **VIZZOTTO, Carla Simone**; STEINDORFF, ANDREI STECCA; PINTO, OTÁVIO HENRIQUE BEZERRA; KRÜGER, RICARDO HENRIQUE. Draft Genome Sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* Strain PE591, a Polyethylene-Degrading Bacterium Isolated from Savanna Soil. Microbiology Resource Announcements., v.10, p.1 - 1, 2021.
4. SILVEIRA, RAFAELLA; MELLO, THIAGO DE ROURE BANDEIRA DE; SARTORI, MARIA REGINA SILVEIRA; ALVES, GABRIEL SÉRGIO COSTA; FONSECA, FERNANDO CAMPOS DE ASSIS; **VIZZOTTO, Carla Simone**; KRÜGER, RICARDO HENRIQUE; BUSTAMANTE, MERCEDES MARIA DA CUNHA. Seasonal and long-term effects of nutrient additions and liming on the nifH gene in cerrado soils under native vegetation. Iscience., v.24, p.102349, 2021.
5. SODRÉ, FERNANDO; BRANDÃO, CRISTINA; **VIZZOTTO, CARLA**; MALDANER, ADRIANO EPIDEMIOLOGIA DO ESGOTO COMO ESTRATÉGIA PARA MONITORAMENTO COMUNITÁRIO, MAPEAMENTO DE FOCOS EMERGENTES E ELABORAÇÃO DE SISTEMAS DE ALERTA RÁPIDO PARA COVID-19. QUÍMICA NOVA (ONLINE)., v.43, p.515 - 519, 2020.
6. PINTO, OTÁVIO H. B.; SILVA, THAIS F.; **VIZZOTTO, Carla Simone**; SANTANA, RENATA H.; LOPES, F. A. C.; SILVA, BRUNO S.; THOMPSON, FABIANO L.; KRUGER, RICARDO H. Genome-resolved metagenomics analysis provides insights into the ecological role of *Thaumarchaeota* in the Amazon River and its plume. BMC MICROBIOLOGY., v.20, p.1 - 11, 2020.

#### Capítulo de livro publicado

1. **VIZZOTTO, C. S.**; KRÜGER, RICARDO H.; ARAUJO JUNIOR, S. D. Antimicrobianos de origem marinha In: Biotecnologia Marinha.1 ed.Rio Grande: FURG, 2020, v.1, p. 497-517.

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **VIZZOTTO, CARLA S.**; LOPES, F. A. C.; PEIXOTO, JULIANNA; PINTO, OTÁVIO H. B.; GUIMARAES, H. I. P.; WALTER, J. M.; THOMPSON, F.; KRÜGER, RICARDO H. CYANOBACTERIAL CULTURES ASSOCIATED MICROBIOME FROM ABROLHOS REEF BANK In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Macéio. **Livro de Resumos do 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2019. p.R1316-2 - R1316-2
2. CARVALHO JUNIOR, R. P.; **VIZZOTTO, C. S.**; AMORIM, A. B.; GOMES, L. N. L. Avaliação da eficiência de

biodegradação de Benzeno em quimiostato In: 70ª Reunião Anual da SBPC, 2018, Maceió. **Anais/Resumos da 70ª Reunião Anual da SBPC**, 2018.

3. **VIZZOTTO, C. S.**; LOPES, F. A. C.; GREEN, STEFAN J.; WALTER, J. M.; THOMPSON, F.; KRÜGER, RICARDO H. BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL ASSOCIATED WITH CYANOBACTERIA AND HETEROTROPHIC BACTERIA IN CULTURE In: XXIV Congresso Latinoamericano de Microbiología, 2018, Santiago. **Libro de Resúmenes XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología**, 2018. p.1188 - 1188

4. CARVALHO JUNIOR, R. P.; **VIZZOTTO, Carla Simone**; AMORIM, A. B.; GOMES, L. N. L. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO DO BENZENO POR MICROORGANISMOS AUTÓCTONES NOS SOLOS DO DISTRITO FEDERAL. In: 69ª Reunião Anual da SBPC, 2017, Belo Horizonte/MG. **Resumos de Comunicações Livres - ISSN: 2176-1221**, 2017.

5. CARVALHO JUNIOR, R. P.; **VIZZOTTO, Carla Simone**; BARBOSA, A. K. A.; GOMES, L. N. L. Avaliação da Eficiência de Biodegradação de Benzeno em Quimiostato In: 23º Congresso de Iniciação Científica da Unb e 14º do DF, 2017, BRASÍLIA. **Portal de Conferências da UnB, 23º Congresso de Iniciação Científica da Unb e 14º do DF**, 2017.

6. **VIZZOTTO, Carla Simone**; LIMA, R. A. T.; WALTER, J. M.; THOMPSON, F.; KRUGER, R. H. ECONOMICAL POTENTIAL ASSOCIATED WITH CYANOBACTERIA OF THE ABROLHOS BANK In: 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2017, 2017, Foz do Iguaçu. **Resumos - 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2017**, 2017.

7. CARVALHO JUNIOR, R. P.; **VIZZOTTO, Carla Simone**; AMORIM, A. B.; GOMES, L. N. L. Avaliação da capacidade de biodegradação do benzeno por micro-organismos autóctones nos solos do Distrito Federal In: 22º Congresso de IC da UnB e 13º do DF, 2016, BRASÍLIA. **22º Congresso de IC da UnB e 13º do DF**, 2016.

## **Demais produções bibliográficas**

1. **VIZZOTTO, C. S. Marine Biotechnology in Brazil: Recent Developments and Its Potential for Innovation.** PERSPECTIVE ARTICLE - Colaboração Rede BiotecMar - CNPq, 2018. (Outra produção bibliográfica)

## **Prêmios e títulos**

**2018** - Menção Honrosa, 70ª Reunião Anual da SBPC.

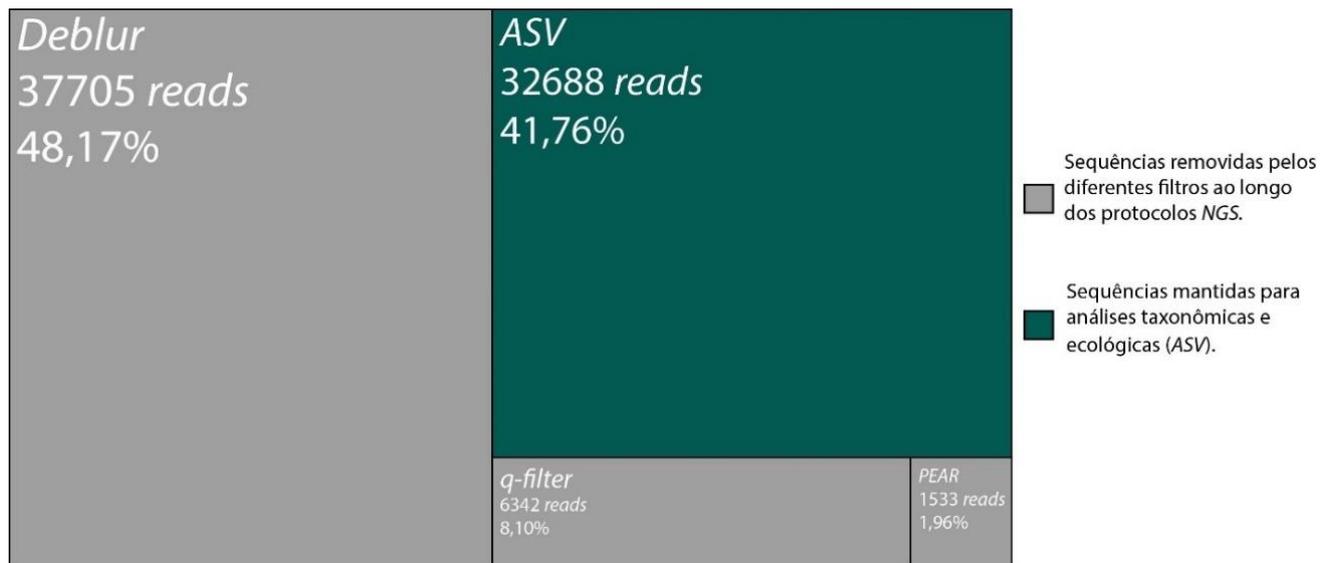
**2017** - *GRC Carl Storm Diversity Award, Gordon Research Conference.*

**2017** - Menção Honrosa, 69ª Reunião Anual da SBPC.

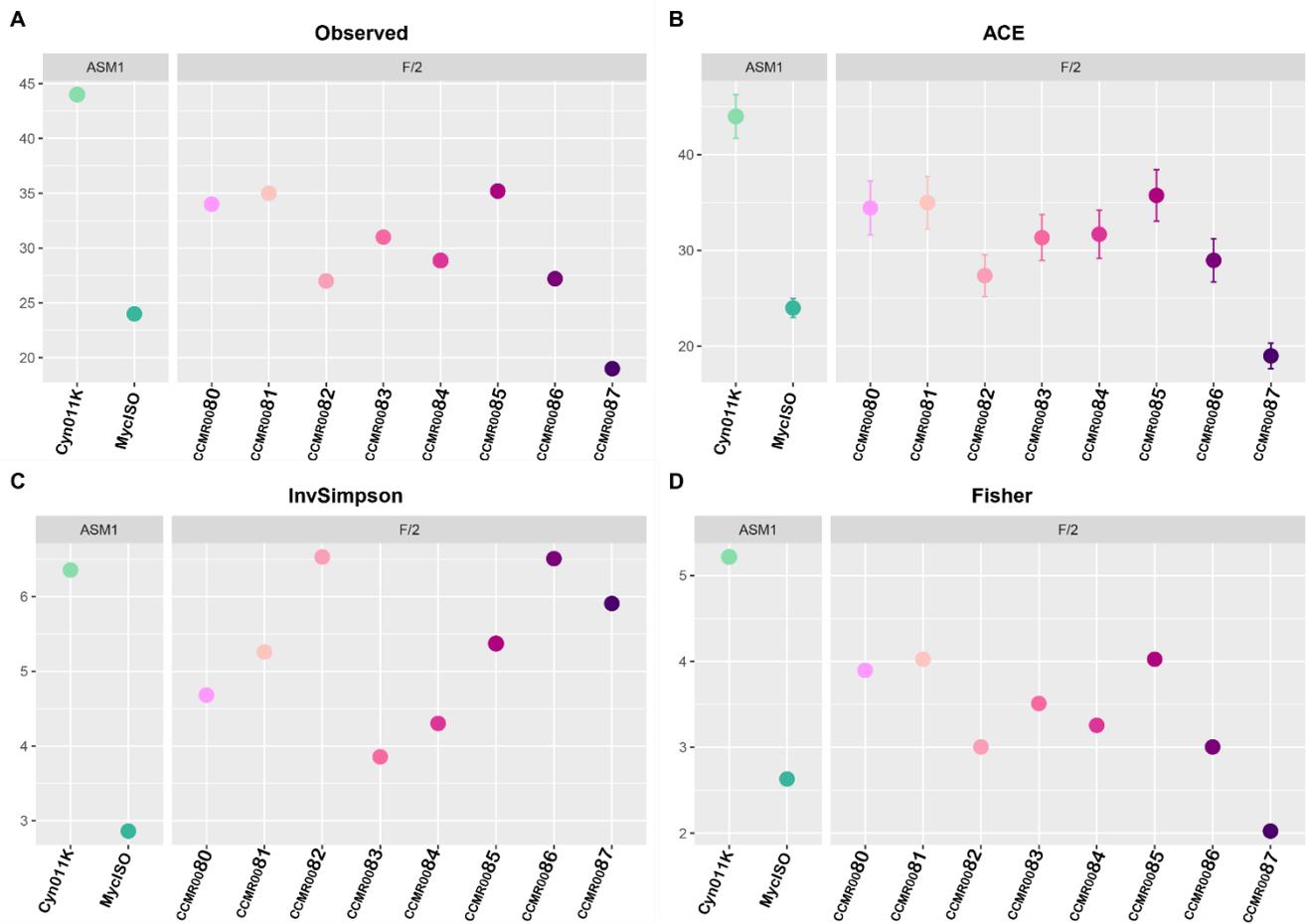
**2017** - Menção Honrosa - Aluno Romário Pereira de Carvalho Júnior, 23º Congresso de Iniciação Científica da UnB e 14º Congresso de Iniciação Científica do DF.

## 6.2 Material Suplementar

**Figura S.1.** *Treemap* indicando a quantidade e proporção dos *reads* removidos das análises em cada etapa de filtragem dos dados do sequenciamento NGS Illumina do rRNA 16S dos co-cultivos de cianobactérias. O *Pear* removeu 1,96% do total de *reads*, que não parearam a sequência *forward* e *reverse*. O *plugin q-filter* do QIIME2 removeu 8,10% do total de *reads*, com baixa qualidade (*Phred score*), menor que o tamanho mínimo ou quimeras. O *Deblur* foi o *plugin* escolhido para a determinação das *Amplicon Sequence Variants (ASV)*. A alta cobertura no sequenciamento permitiu a escolha do anotador mais estrito, diminuindo a possibilidade de falsos positivos na anotação.



**Figura S.2.** Índices de diversidades calculados para os co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087 (tons de roxo), Cyn011K e MyciISO (tons de verde) com base nos *reads* gerados pelo sequenciamento NGS Illumina do rRNA 16S dos co-cultivos.



**Tabela S1** Metadados com as informações de coordenadas geográficas de onde foram coletados os *turfs* a partir dos quais foram isolados os co-cultivos CCMR0080 à CCMR0087.

Amostras enviadas para UnB - junho 2016												
Amostras: cianobactérias marinhas						Endereço para envio:						
Locais de coleta: Abrolhos						Aos cuidados de Carla Simone Vizzotto						
Ano de coleta: 2013						Laboratório de Saneamento Ambiental - Departamento de Engenharia Civil e Ambiental (ENC) - U						
Meio de cultivo: F/2 (Guillard and Ryther 1962; Guillard 1975)						Campus Universitário Darcy Ribeiro, Prédio SG-12, 1º Andar						
Luminosidade: ~200 µmol. photons m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>						Asa Norte, Brasília - DF						
Temperatura: 22 +/- 2 °C						CEP: 70910-900						
Responsável: Juline Walter												
<a href="mailto:juline.walter@gmail.com">juline.walter@gmail.com</a>												
ID Banco	Local de Coleta	Recife	Latitude	Longitude	Data de coleta	Fonte de isolamento	Profundidade	Bioma	Cultivo	DNA extraído	Genoma	
CI-1A1	ABROLHOS	AR	-17,959	-38,701	Out / 2013	turf	~10m	Marinho	ok	ok	ok	CCMR 0080
CI-1A2	ABROLHOS	AR	-17,959	-38,701	Out / 2013	turf	~10m	Marinho	ok	ok	ok	CCMR 0081
CI-1C3	ABROLHOS	AR	-17,959	-38,701	Out / 2013	turf	~10m	Marinho	ok	ok	ok	CCMR 0082
CI-1B5	ABROLHOS	PAB	-17,998	-38,671	Out / 2013	turf	~10m	Marinho	ok	ok	ok	CCMR 0083
CI-1C6	ABROLHOS	PAB	-17,998	-38,671	Out / 2013	turf	~10m	Marinho	ok	ok	ok	CCMR 0084
CI-1D1	ABROLHOS	PAB	-17,998	-38,671	Out / 2013	turf	~10m	Marinho	ok	ok	ok	CCMR 0085
CI-1C2	ABROLHOS	PL	-17,783	-39,051	Out / 2013	turf	~10m	Marinho	ok	ok	ok	CCMR 0086
*Prioridade												

**Tabela S2** Pacotes de dados instalados no programa R/RStudio para a realização das análises apresentadas neste trabalho.

<b>Pacote</b>	<b>Referência</b>	<b>Disponibilidade</b>
adespatial	Stéphane Dray, David Bauman, Guillaume Blanchet, Daniel Borcard, Sylvie Clappe, Guillaume Guenard, Thibaut Jombart, Guillaume Laroque, Pierre Legendre, Naima Madi and Helene H Wagner (2021). adespatial: Multivariate Multiscale Spatial Analysis. R package version 0.3-14.	<a href="https://CRAN.R-project.org/package=adespatial">https://CRAN.R-project.org/package=adespatial</a>
ape	Paradis E. & Schliep K. 2019. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. Bioinformatics 35: 526-528.	<a href="http://cran.r-project.org/package=ape">http://cran.r-project.org/package=ape</a>
btools	Thomas Battaglia (2021). btools: A suite of R function for all types of microbial diversity analyses. R package version 0.0.1.	<a href="https://github.com/twbattaglia/btools">https://github.com/twbattaglia/btools</a>
DECIPHER	Wright ES (2016). "Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R." The R Journal, *8*(1), 352-359.	<a href="https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DECIPHER.html">https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DECIPHER.html</a>
DESeq2	Love, M.I., Huber, W., Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 Genome Biology 15(12):550 (2014)	
devtools	Hadley Wickham, Jim Hester and Winston Chang (2021). devtools: Tools to Make Developing R Packages Easier. R package version 2.4.0.	<a href="https://CRAN.R-project.org/package=devtools">https://CRAN.R-project.org/package=devtools</a>
dplyr	Hadley Wickham, Romain François, Lionel Henry and Kirill Müller (2021). dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.0.4.	<a href="https://CRAN.R-project.org/package=dplyr">https://CRAN.R-project.org/package=dplyr</a>
extrafont	Winston Chang, (2014). extrafont: Tools for using fonts. Rpackage version 0.17.	<a href="https://CRAN.R-project.org/package=extrafont">https://CRAN.R-project.org/package=extrafont</a>
ggplot2	H. Wickham. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016.	<a href="https://ggplot2.tidyverse.org/">https://ggplot2.tidyverse.org/</a>
ggrepel	Kamil Slowikowski (2021). ggrepel: Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with 'ggplot2'. R package version 0.9.1.	<a href="https://CRAN.R-project.org/package=ggrepel">https://CRAN.R-project.org/package=ggrepel</a>
ggtree	Guangchuang Yu. Using ggtree to visualize data on tree-like structures. Current Protocols in Bioinformatics,	<a href="https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/ggtree.html">https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/ggtree.html</a>

	2020, 69:e96. doi: 10.1002/cpbi.96	
	Guangchuang Yu, Tommy Tsan-Yuk Lam, Huachen Zhu, Yi Guan. Two methods for mapping and visualizing associated data on phylogeny using ggtree. <i>Molecular Biology and Evolution</i> 2018, 35(2):3041-3043. doi: 10.1093/molbev/msy194	
	Guangchuang Yu, David Smith, Huachen Zhu, Yi Guan, Tommy Tsan-Yuk Lam. ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. <i>Methods in Ecology and Evolution</i> 2017, 8(1):28-36. doi:10.1111/2041-210X.12628	
<b>gplots</b>	Gregory R. Warnes, Ben Bolker, Lodewijk Bonebakker, Robert Gentleman, Wolfgang Huber, Andy Liaw, Thomas Lumley, Martin Maechler, Arni Magnusson, Steffen Moeller, Bill Venables (2020). gplots: Various R Programming Tools for Marc Schwartz and Plotting Data. R package version 3.1.1.	<a href="https://CRAN.R-project.org/package=gplots">https://CRAN.R-project.org/package=gplots</a>
<b>Heatplus</b>	Alexander Ploner (2020). Heatplus: Heatmaps with row and/or column covariates and colored clusters. R package version 2.36.0.	<a href="https://github.com/alexploner/Heatplus">https://github.com/alexploner/Heatplus</a>
<b>microbiome</b>	Leo Lahti et al. microbiome R package.	<a href="http://microbiome.github.io">http://microbiome.github.io</a>
<b>philr</b>	Justin D Silverman, Alex D Washburne, Sayan Mukherjee, Lawrence A David. A phylogenetic transform enhances analysis of compositional microbiota data. <i>eLife</i> 2017;6:e21887	<a href="https://github.com/jsilve24/philr">https://github.com/jsilve24/philr</a>
<b>phyloseq</b>	phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. Paul J. McMurdie and Susan Holmes (2013) <i>PLoS ONE</i> 8(4):e61217.	<a href="https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/phyloseq.html">https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/phyloseq.html</a>
<b>plotly</b>	C. Sievert. Interactive Web-Based Data Visualization with R, plotly, and shiny. Chapman and Hall/CRC Florida, 2020.	<a href="https://plotly-r.com/">https://plotly-r.com/</a>
<b>qiime2R</b>	qiime2R: Importing QIIME2 artifacts and associated data into R sessions. Jordan E Bisanz (2018)	<a href="https://github.com/jbisanz/qiime2R">https://github.com/jbisanz/qiime2R</a> .

ranacapa	Gaurav Kandlikar (2021). ranacapa: Utility Functions and 'shiny' App for Simple Environmental DNA Visualizations and Analyses. R package version 0.1.0.	<a href="https://github.com/gauravsk/ranacapa">https://github.com/gauravsk/ranacapa</a>
RColorBrewer	Erich Neuwirth (2014). RColorBrewer: ColorBrewer Palettes. R package version 1.1-2.	<a href="https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer">https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer</a>
readxl	Hadley Wickham and Jennifer Bryan (2019). readxl: Read Excel Files. R package version 1.3.1.	<a href="https://CRAN.R-project.org/package=readxl">https://CRAN.R-project.org/package=readxl</a>
Tax4Fun2	Bernd and Franziska Wemheuer (2020). Tax4Fun2: Tax4Fun2: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data.. R package version 1.1.6.	<a href="https://github.com/bwemheu/Tax4Fun2">https://github.com/bwemheu/Tax4Fun2</a>
tibble	Kirill Müller and Hadley Wickham (2021). tibble: Simple Data Frames. R package version 3.1.0.	<a href="https://CRAN.R-project.org/package=tibble">https://CRAN.R-project.org/package=tibble</a>
tidyverse	Wickham et al., (2019). Welcome to the tidyverse. Journal of Open Source Software, 4(43), 1686,	<a href="https://doi.org/10.21105/joss.01686">https://doi.org/10.21105/joss.01686</a>
vegan	Jari Oksanen, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGlinn, Peter R. Minchin, R. B. O'Hara, Gavin L. Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs and Helene Wagner (2020). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-7.	<a href="https://CRAN.R-project.org/package=vegan">https://CRAN.R-project.org/package=vegan</a>
treemap		<a href="https://cran.r-project.org/web/packages/treemap/index.html">https://cran.r-project.org/web/packages/treemap/index.html</a>
reshape	Wickham H (2007). "Reshaping Data with the reshape Package." Journal of Statistical Software, 21(12), 1–20.	<a href="http://www.jstatsoft.org/v21/i12/">http://www.jstatsoft.org/v21/i12/</a> .

**Tabela S3** Nomenclatura das bactérias que tiveram suas sequências utilizadas para a montagem da árvore filogenética (figura 1.9), de acordo com a LSPN – DSMZ.

Espécie	Linhagem	Nomenclatura oficial atualizada	Acesso GenBank	Endereço LSPN
<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i>	ICPB3707	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i>	NR_104911.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/vampirovibrio-chlorellavorus">https://lpsn.dsmz.de/species/vampirovibrio-chlorellavorus</a>
<i>Leptolyngbya sp.</i>	PCC7375	<i>Leptolyngbya sp.</i>	AF132786.1	<a href="https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43604&amp;sk=0">https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43604&amp;sk=0</a>
<i>Synechococcus elongatus</i>	PCC 6301	<i>Synechococcus elongatus</i>	NR_074309.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/synechococcus-elongatus/">https://lpsn.dsmz.de/species/synechococcus-elongatus/</a>
<i>Prochlorothrix hollandica</i>	PCC 9006	<i>Prochlorothrix hollandica</i>	NR_126312.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/prochlorothrix-hollandica/">https://lpsn.dsmz.de/species/prochlorothrix-hollandica/</a>
<i>Muricauda marina</i>	H19-56	<i>Muricauda marina</i>	NR_157633.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/Muricauda-marina">https://lpsn.dsmz.de/species/Muricauda-marina</a>
<i>Muricauda antarctica</i>	Ar-22	<i>Muricauda teanensis</i>	NR_109455.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/Muricauda-antarctica">https://lpsn.dsmz.de/species/Muricauda-antarctica</a>
<i>Muricauda aquimarina</i>	SW-63	<i>Muricauda aquimarina</i>	NR_042909.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/Muricauda-aquimarina">https://lpsn.dsmz.de/species/Muricauda-aquimarina</a>
<i>Muricauda ruestringensis</i>	DSM 13258	<i>Muricauda ruestringensis</i>	NR_074562.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/Muricauda-ruestringensis">https://lpsn.dsmz.de/species/Muricauda-ruestringensis</a>
<i>Muricauda beolgyonensis</i>	BB-My12	<i>Muricauda beolgyonensis</i>	NR_117844.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/Muricauda-beolgyonensis">https://lpsn.dsmz.de/species/Muricauda-beolgyonensis</a>
<i>Alteromonas marina</i>	SW-47	<i>Alteromonas marina</i>	NR_025260.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/alteromonas-marina">https://lpsn.dsmz.de/species/alteromonas-marina</a>
<i>Alteromonas macleodii</i>	NBRC 102226	<i>Alteromonas macleodii</i>	NR_114053.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/alteromonas-macleodii">https://lpsn.dsmz.de/species/alteromonas-macleodii</a>
<i>Marinobacter lutaoensis</i>	T5054	<i>Marinobacter lutaoensis</i>	NR_025116.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/marinobacter-lutaoensis">https://lpsn.dsmz.de/species/marinobacter-lutaoensis</a>
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	ATCC49840	<i>Marinobacter nauticus</i>	NR_074619.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/marinobacter-hydrocarbonoclasticus">https://lpsn.dsmz.de/species/marinobacter-hydrocarbonoclasticus</a>
<i>Woeseia oceani</i>	XK5	<i>Woeseia oceani</i>	NR_147719.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/woeseia-oceani">https://lpsn.dsmz.de/species/woeseia-oceani</a>
<i>Thioalkalivibrio nitratireducens</i>	DSM14787	<i>Thioalkalivibrio nitratireducens</i>	NR_102486.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/thioalkalivibrio-nitratireducens">https://lpsn.dsmz.de/species/thioalkalivibrio-nitratireducens</a>
<i>Thioalkalivibrio denitrificans</i>	ALJD	<i>Thioalkalivibrio denitrificans</i>	NR_028745.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/thioalkalivibrio-denitrificans">https://lpsn.dsmz.de/species/thioalkalivibrio-denitrificans</a>
<i>Spiribacter aquaticus</i>	SP30	<i>Spiribacter roseus</i>	NR_157798.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/spiribacter-aquaticus">https://lpsn.dsmz.de/species/spiribacter-aquaticus</a>
<i>Pelagibaca abyssi</i>	JLT2014	nomenclatura ainda não validada*	NR_148263.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/pelagibaca-abyssi">https://lpsn.dsmz.de/species/pelagibaca-abyssi</a>
<i>Salipiger bermudensis</i>	HTCC2601	<i>Pelagibaca bermudensis</i>	NR_043611.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/salipiger-bermudensis">https://lpsn.dsmz.de/species/salipiger-bermudensis</a>
<i>Mameliella alba</i>	F15	<i>Mameliella alba</i>	NR_136781.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/mameliella-alba">https://lpsn.dsmz.de/species/mameliella-alba</a>

<i>Ponticoccus litoralis</i>	CL-GR66	<i>Ponticoccus litoralis</i>	NR_044174.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/ponticoccus-litoralis">https://lpsn.dsmz.de/species/ponticoccus-litoralis</a>
<i>Tropicibacter naphthalenivorans</i>	C02	<i>Tropicibacter naphthalenivorans</i>	NR_041596.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/tropicibacter-naphthalenivorans">https://lpsn.dsmz.de/species/tropicibacter-naphthalenivorans</a>
<i>Aquisalinus flavus</i>	D11M-2	<i>Aquisalinus flavus</i>	NR_041596.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/aquisalinus-flavus">https://lpsn.dsmz.de/species/aquisalinus-flavus</a>
<i>Parvularcula flava</i>	NH6-79	<i>Parvularcula flava</i>	NR_151999.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/parvularcula-flava">https://lpsn.dsmz.de/species/parvularcula-flava</a>
<i>Hyphococcus flavus</i>	HSF6	<i>Hyphococcus flavus</i>	NR_158135.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/hyphococcus-flavus">https://lpsn.dsmz.de/species/hyphococcus-flavus</a>
<i>Rhodobium orientis</i>	MB312	<i>Rhodobium orientis</i>	NR_029128.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/rhodobium-orientis">https://lpsn.dsmz.de/species/rhodobium-orientis</a>
<i>Microbaculum marinum</i>	HSF11	<i>Microbaculum marinum</i>	NR_156846.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/microbaculum-marinum">https://lpsn.dsmz.de/species/microbaculum-marinum</a>
<i>Stappia indica</i>	B106	<i>Stappia indica</i>	NR_116431.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/stappia-indica">https://lpsn.dsmz.de/species/stappia-indica</a>
<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	DN34	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	NR_029112.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/pseudovibrio-denitrificans">https://lpsn.dsmz.de/species/pseudovibrio-denitrificans</a>
<i>Labrenzia aggregata</i>	NBRC16684	<i>Roseibium aggregatum</i>	NR_113861.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/labrenzia-aggregata">https://lpsn.dsmz.de/species/labrenzia-aggregata</a>
<i>Labrenzia salina</i>	DSM29163	<i>Roseibium salinum</i>	NR_153733.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/labrenzia-salina">https://lpsn.dsmz.de/species/labrenzia-salina</a>
<i>Labrenzia alba</i>	5OM6	<i>Roseibium album</i>	NR_042378.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/labrenzia-alba">https://lpsn.dsmz.de/species/labrenzia-alba</a>
<i>Ahrensia marina</i>	LZD062	<i>Ahrensia marina</i>	NR_148642.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/ahrensia-marina">https://lpsn.dsmz.de/species/ahrensia-marina</a>
<i>Hoeflea marina</i>	LMG128	<i>Hoeflea marina</i>	NR_043007.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/hoeflea-marina">https://lpsn.dsmz.de/species/hoeflea-marina</a>
<i>Hoeflea phototrophica</i>	NCIMB	<i>Hoeflea phototrophica</i>	NR_118230.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/hoeflea-phototrophica">https://lpsn.dsmz.de/species/hoeflea-phototrophica</a>
<i>Cohaesibacter gelatinilyticus</i>	CL-GR15	<i>Cohaesibacter gelatinilyticus</i>	NR_043777.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/cohaesibacter-gelatinilyticus">https://lpsn.dsmz.de/species/cohaesibacter-gelatinilyticus</a>
<i>Cohaesibacter haloalkalitolerans</i>	JC131	<i>Cohaesibacter haloalkalitolerans</i>	NR_108886.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/cohaesibacter-haloalkalitolerans">https://lpsn.dsmz.de/species/cohaesibacter-haloalkalitolerans</a>
<i>Cohaesibacter marisflavi</i>	DQHS21	<i>Cohaesibacter marisflavi</i>	NR_104499.1	<a href="https://lpsn.dsmz.de/species/cohaesibacter-marisflavi">https://lpsn.dsmz.de/species/cohaesibacter-marisflavi</a>

**Tabela S4 – Best hits das OTU obtidas pela clonagem do rRNA 16S dos co-cultivos CCMR0081, CCMR0082 e CCMR0086.**

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015													
Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 16													
Query File: trimm_ccmr0081_CBM.fas													
Submit Date: Wed Oct 02 20:06:44 EDT 2019													
Confidence threshold (for classification to Root ONLY): 80%													
Symbol +/- indicates predicted sequence orientation													
CCMR0081_102	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_103	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_104	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_105	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_106	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_107	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_108	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Alphaproteobacteria	100%	Rhodobacterales	100%	Rhodobacteraceae	100%	Pelagibaca	99%
CCMR0081_109	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_110	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_111	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_112	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_114	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_115	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_116	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Alteromonadales	100%	Alteromonadaceae	100%	Alteromonas	100%
CCMR0081_117	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_119	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_120	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_121	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_122	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_123	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Alteromonadales	100%	Alteromonadaceae	100%	Marinobacter	100%



CCMR0081_158	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_159	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_160	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_161	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_162	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_165	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_167	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_168	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Alteromonadales	100%	Alteromonadaceae	100%	Alteromonas	100%
CCMR0081_171	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_173	+	Bacteria	100%	Bacteroidetes	100%	Flavobacteriia	100%	Flavobacteriales	100%	Flavobacteriaceae	100%	<i>Muricauda</i>	100%
CCMR0081_175	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_176	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_177	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_178	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_179	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_180	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_181	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	99%	Family IV	99%	GpIV	99%
CCMR0081_182	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_184	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0081_185	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015													
Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 16													
Query File: trimm_ccmr0082-1.fas													
Submit Date: Wed Oct 02 20:09:39 EDT 2019													
Confidence threshold (for classification to Root ONLY): 80%													
Symbol +/- indicates predicted sequence orientation													
CCMR0082_201	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0082_202	+	Bacteria	100%	Bacteroidetes	100%	Flavobacteriia	100%	Flavobacteriales	100%	Flavobacteriaceae	100%	<i>Muricauda</i>	100%



CCMR0082_252	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0082_253	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0082_254	+	Bacteria	100%	Bacteroidetes	100%	Flavobacteriia	100%	Flavobacteriales	100%	Flavobacteriaceae	100%	<i>Muricauda</i>	100%
CCMR0082_255	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0082_217	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Alphaproteobacteria	100%	Rhodobacterales	100%	Rhodobacteraceae	100%	Ponticoccus	96%
CCMR0082_218	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0082_219	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Alteromonadales	100%	Alteromonadaceae	100%	Marinobacter	100%
Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015													
Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 16													
Query File: trimm_ccmr0086_CBM.fas													
Submit Date: Wed Oct 02 20:07:54 EDT 2019													
Confidence threshold (for classification to Root ONLY): 80%													
Symbol +/- indicates predicted sequence orientation													
CCMR0086_301	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_303	+	Bacteria	100%	Bacteroidetes	100%	Flavobacteriia	100%	Flavobacteriales	100%	Flavobacteriaceae	100%	<i>Muricauda</i>	100%
CCMR0086_304	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_305	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_306	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_307	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	99%	Family IV	99%	GpIV	99%
CCMR0086_308	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_309	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_311	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteria	100%	Chromatiales	97%	Ectothiorhodospiraceae	55%	Thiogranum	43%
CCMR0086_312	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Alphaproteobacteria	100%	Parvularculales	93%	Parvularculaceae	93%	Parvularcula	91%
CCMR0086_313	+	Bacteria	100%	Bacteroidetes	100%	Flavobacteriia	100%	Flavobacteriales	100%	Flavobacteriaceae	100%	<i>Muricauda</i>	100%
CCMR0086_314	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_318	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	99%	Family IV	99%	GpIV	99%
CCMR0086_319	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Alphaproteobacteria	100%	Parvularculales	93%	Parvularculaceae	93%	Parvularcula	86%

CCMR0086_320	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	99%	Family IV	99%	GpIV	99%
CCMR0086_321	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_326	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_327	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_329	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_330	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	90%	Gammaproteobacteria	90%	Chromatiales	75%	Ectothiorhodospiraceae	72%	Spiribacter	48%
CCMR0086_331	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_332	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_334	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_335	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_336	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_337	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Alphaproteobacteria	100%	Rhizobiales	92%	Phyllobacteriaceae	65%	Lentilitoribacter	59%
CCMR0086_338	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_339	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_340	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_341	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Alphaproteobacteria	100%	Parvularculales	98%	Parvularculaceae	98%	Parvularcula	98%
CCMR0086_342	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_343	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086344_	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_345	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_346	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_347	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_349	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_351	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_352	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_353	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_354	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_355	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_356	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%

CCMR086_357	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_358	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_361	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	99%	Family IV	99%	GpIV	99%
CCMR0086_363	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_364	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Alphaproteobacteria	100%	Parvularculales	96%	Parvularculaceae	96%	Parvularcula	92%
CCMR0086_365	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_366	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_367	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_368	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_369	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	99%	Family IV	99%	GpIV	99%
CCMR0086_370	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_371	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_372	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_373	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_381	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_382	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_383	+	Bacteria	100%	Bacteroidetes	100%	Flavobacteriia	100%	Flavobacteriales	100%	Flavobacteriaceae	100%	<i>Muricauda</i>	100%
CCMR0086_384	+	Bacteria	100%	Bacteroidetes	100%	Flavobacteriia	100%	Flavobacteriales	100%	Flavobacteriaceae	100%	<i>Muricauda</i>	100%
CCMR0086_385	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_386	+	Bacteria	100%	Bacteroidetes	100%	Flavobacteriia	100%	Flavobacteriales	100%	Flavobacteriaceae	100%	<i>Muricauda</i>	100%
CCMR0086_389	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_390	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Alphaproteobacteria	100%	Parvularculales	100%	Parvularculaceae	100%	Parvularcula	100%
CCMR0086_391	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	99%	Family IV	99%	GpIV	99%
CCMR0086_392	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Alphaproteobacteria	100%	Parvularculales	92%	Parvularculaceae	92%	Parvularcula	82%
CCMR0086_393	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Alphaproteobacteria	100%	Parvularculales	92%	Parvularculaceae	92%	Parvularcula	89%
CCMR0086_394	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_395	+	Bacteria	100%	Cyanobacteria/Chloroplast	100%	Cyanobacteria	100%	Family IV	100%	Family IV	100%	GpIV	100%
CCMR0086_398	+	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Alphaproteobacteria	100%	Rhodobacterales	100%	Rhodobacteraceae	100%	Labrenzia	100%